UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

Diversidade de genes catabólicos em solos de "Terra Preta de Índio" da Amazônia sob diferentes coberturas vegetais

MARIA JULIA DE LIMA BROSSI

Piracicaba

2012

MARIA JULIA DE LIMA BROSSI

Diversidade de genes catabólicos em solos de "Terra Preta de Índio" da Amazônia sob diferentes coberturas vegetais

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Siu Mui Tsai

Piracicaba

2012

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE 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

Brossi, Maria Julia de Lima

Diversidade de genes catabólicos em solos de "Terra Preta de Índio" da Amazônia sob diferentes coberturas vegetais / Maria Julia de Lima Brossi; orientador Siu Mui Tsai. - Piracicaba, 2012.

164 p.: il.

Tese (Doutorado – 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. Biodegradação 2. Biodiversidade 3. Biologia molecular 4. Ecologia microbiana 5. Enzimas 6. Hidrocarbonetos I. Título

CDU 579.26 + 574.1

Aos meus queridos pais, Salma e Ednir, que foram bases na minha tragetória, pelo amor, educação e suporte, DEDICO

> À minha irmã Maria Luiza, que é luz e alegria em minha vida, com quem compartilho cada momento, OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por fornecer alimento ao meu espírito e me garantir saúde em toda minha empreitada.

Este é o momento de expressar sinceros agradecimentos a todos familiares e amigos, que foram imprescindíveis para o desenvolvimento deste trabalho e nesta fase da minha vida.

Desta maneira, após quatro anos de no laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA/USP), deixo aqui meu agradecimento a todas as pessoas e agências de fomento, que foram de grande valia em minha formação profissional e contribuíram de grande maneira para a conclusão desta etapa da minha vida. Meus sinceros agradecimentos:

À Profa. Dra. Siu Mui Tsai, minha orientadora e amiga, por todo apoio, carinho, ensinamentos e confiança a mim dedicados. Obrigada querida Tsai.

Aos professores Dr. Wenceslau G. Teixeira, Dr. James M. Tiedje, Dra. Shoko Iwai pela ajuda concedida para realização do meu trabalho.

À Adriana Martineli e às funcionárias da Pós-graduação do Cena, Neuda, Sonia, Claudia e Alzira, por toda a ajuda durante o doutorado, pela paciência e compreensão.

À Marilia Henyei, pela imensa ajuda com a formatação das referências e normas.

À nossa querida secretária multi tarefas, Lud, por toda ajuda, conversas, risadas, por sua amizade e por ser tão prestativa.

Aos queridos técnicos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Fábio Duarte, Elias Gomes, Wagner Piccinini e Francisco Montrazi (*in memorian*), pela ajuda sempre, pela disposição, pela amizade.

À todos os amigos de laboratório que tornaram meu trabalho mais leve, e meu dia a dia mais feliz. É difícil falar de todos, mas acredito que cada um foi especial à sua maneira:

Às minhas amigas, parceiras, as meninas da "Terra Preta" Mari, Fabica e Amanda. Obrigado por tanta ajuda, pelas discussões, por me permitirem ensinar e principalmente aprender. Adoro vocês!

Ao querido amigo Lucas, que tanto me ajudou no meu trabalho, pelos conselhos e amizade. Obrigado pelo companheirismo em Wageningen e por proporcionar minha amizade com sua querida esposa Edilaine (*Di*), outra pessoa especial a quem também agradeço pela amizade.

Aos queridos Ana Beraldo e Enéas (*do CENA*!!), pela amizade, carinho, almoços, conversas e por serem tão dedicados à nossa amizade.

À nossa querida Pós-Doc, Dani Caldas, pelos ensinamentos, pelas aulas incríveis, pelas boas risadas, e viagens animadas.

Aos colegas Acácio, Felippe, Gustavo, Fernanda, Marcela, Milena, Monita, Taketani, Ademir, Lillian, Andressa, Marília, Carol, Bia, Clóvis, Lina, Caio, Bia Furlan, Naíssa, Ézio, Fernandinha, Aline, Dennis e Jane. Obrigado por compartilharem dúvidas e conhecimento comigo, por me ensinarem tanto.

Ao meu namorado Francisco Dini Andreote (*Fan*), por participar desta etapa tão importante da minha vida. Obrigada pela ajuda prestada no meu trabalho, por todo amor, carinho e amizade. Agradeço-te por cuidar tão bem de mim.

Aos meus avós Júlia de Lima, Zezinho Nascimento (*in memorian*), Marly Brossi (*in memorian*) e Tavinho Brossi, que também foram bases na construção do meu caminho.

À minha família "emprestada", Fátima Dini, Paula, Cardena, Fernando, Fellipe, Cris e Giovanni (*Giggio*), pelo carinho.

À CNPq (Processo 474455/2007-6), CAPES e FAPESP (Processo 2011/50914 BIOTA/FAPESP) pelas concessões de bolsa e financiamento da pesquisa.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou, sobre aquilo que todo mundo vê"

Arthur Schopenhauer

RESUMO

BROSSI, M. J. L. Diversidade de genes catabólicos em solos de "Terra Preta de Índio" da Amazônia sob diferentes coberturas vegetais 2012. 164 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

"Terra Preta de Índio" (TPI) é um termo utilizado para designar horizontes antrópicos A em solos Amazônicos. Estes solos se destacam pela alta concentração de nutrientes, matéria orgânica e carvão pirogênico. Do ponto de vista microbiológico, a importância destes solos reside no fato de que constituem um habitat de alta diversidade microbiana, sendo também um ambiente propício para a realização de processos de biodegradação, amplamente dependente de enzimas microbianas, como as dioxigenases, que podem utilizar hidrocarbonetos aromáticos como fonte de carbono e energia. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo o estudo da diversidade funcional de genes catabólicos e também de bactérias potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos, com base em métodos de isolamento e cultivo, seguidos de abordagens moleculares (sequenciamento e quantificação de genes que codificam para a enzima dioxigenase), além do estudo da influência da incubação desses solos com hidrocarbonetos aromáticos, na diversidade e quantidade de cópias de genes catabólicos. Este trabalho pretende aprimorar a compreensão da relação entre a abundância, riqueza, diversidade e funcionalidade destes genes em bactérias presentes em amostras de solo de TPI, comparativamente à amostras de seus solos originais, também chamados de adjacentes (ADJ) e sob diferentes cultivos (floresta secundária - FS e cultívo agrícola - CULT). Os resultados gerados a partir do isolamento e bioensaio mostraram grande diversidade de gêneros e espécies descritas como degradadores de compostos aromáticos e foi possível observar a predominância de gêneros bacterianos estreitamente relacionados a processos de biodegradação, como por exemplo, Pseudomonas, Burkholderia, Sphingomonas além de representantes dos gêneros Bacillus, Enterobacter, Serratia, entre outros. Com esses resultados foi possível observar diferenças nas comunidades bacterianas quando comparados os diferentes sítios analisados. Alguns gêneros foram exclusivos de cada sítio, o que mostra uma diferença na comunidade bacteriana de acordo com o tipo de solo (TPI e ADJ) e seu uso (FS e CULT), sendo que os solos de TPI apresentaram maior quantidade e número de filotipos potencialmente degradadores do que os sítios ADJ o que demonstra o imenso potencial das bactérias dos solos de TPI para processos de importância biotecnológica. As bibliotecas de clones e o pirosequenciamento do gene catabólico bph mostraram maior diversidade e riqueza de espécies nos sítios de TPI quando comparados com os sítios ADJ. A abundância deste gene determinada por PCR quantitativa mostrou uma maior quantidade de cópias em solos de TPI comparados aos solos ADJ. Os resultados dos microcosmos permitiram observar uma mudança na estrutura da comunidade em relação aos genes de degradação, após a incubação dos solos com compostos aromáticos, além de mostrar um aumento do número de cópias do gene catabólico após a incubação dos solos. De maneira geral este trabalho demonstrou o potencial dos solos de Terra Preta para estudo da diversidade funcional de genes catabólicos e permitiu observar que a diversidade deste gene é mais influênciada pelo tipo de solo (TPI ou ADJ) do que pela cobertura vegetal (floresta secundária ou cultivo agrícola).

Palavras-chave: - Terra Preta de Índio. Diversidade funcional. Genes catabólicos.

ABSTRACT

BROSSI, M. J. L. Catabolic genes diversity in "Amazon Dark Earth" under different land uses 2012. 164 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

"Amazon Dark Earths" (ADE) is a term used to describe the anthropic horizons in Amazon soils. These soils are characterized by high concentrations of nutrients, organic matter and black carbon. From the microbiological point of view, the importance of these soils mainly resides in the fact that they constitute a highly diverse microbial habitat, and also an environment for performing various biodegradation processes largely dependent of microbial enzymes, as dioxygenases, that can transform organic compounds in source of carbon and energy. In this context, this study aimed to analyze the functional diversity of bacteria catabolic genes and also analyze potentially hydrocarbons degrader bacteria, based on methods of isolation and culture, followed by molecular approaches (sequencing and quantification of genes encoding the dioxygenase enzyme) additionally to a study of aromatic hydrocarbons incubation of soils and its influence in the diversity and quantity of the catabolic gene. This study aims to understand the relationship between the abundance, richness, diversity and functionality of these genes in ADE soil samples compared to their original soil samples, also called adjacent soils (ADJ), under different land uses (secondary forest - SF and agricultural cultivation - CULT). The results generated from the isolation and bioassay showed wide variety of genera and species described as degrading aromatic compounds and it was possible to observe the predominance of bacterial genera closely related to biodegradation processes, e.g., Pseudomonas, Burkholderia, Sphingomonas and representatives the genera Bacillus, Enterobacter, Serratia, among others. With these results was also observed differences in bacterial communities compared the different sites analyzed. Some genera were unique to each site, which shows a difference in bacterial community according to the soil type (ADE and ADJ) and its use (FS and CULT), and the ADE soils showed a higher amount and number of phylotypes potentially degrading than the ADJ sites which demonstrates the immense potential of ADE soils in bacteria processes with biotechnological importance. The clone libraries and pyrosequencing of catabolic bph gene showed greater diversity and species richness at TPI sites when compared to ADJ sites. The abundance of this gene determined by quantitative PCR showed a greater number of copies of this gene in TPI soils compared to ADJ soils. The results of the microcosms allowed observing changes in the community structure of bph gene after incubation of soil. In this study it was observed a rise in the number of catabolic gene copies after the incubation. Generally this work demonstrated the potential of ADE soils for functional diversity study of catabolic genes and allowed to observe that the diversity of this gene is more influenced by soil type (ADE or ADJ) than by land uses (secondary forest or agricultural cultivation).

Keywords – Amazon Dark Earth. Functional diversity. Catabolic genes.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Revisão de Literatura	16
1.1.1 Terra Preta de Índio (TPI)	16
1.1.2 Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos	19
1.1.3 Diversidade funcional em solos de Terra Preta	27
1.1.4 Técnicas Moleculares em Ecologia Microbiana	29
1.2 Hipótese do trabalho	32
1.3 Objetivos	32
1.3.1 Objetivo Geral	32
1.3.2 Objetivos específicos	33
1.4 Materiais e Métodos	33
1.4.1 Fluxograma metodológico	33
1.4.2 Áreas de estudo e amostragem	35
REFERÊNCIAS	38
	20
2 Isolamento e caracterização genética de bactérias potencialmente degradadoras de Hidrocarbonetos	
Aromáticos em solos de Terra Preta de Índio e seus adiacentes	44
RESUMO	44
ABSTRACT	45
2 1 Introdução	46
2.2 Objetivos	40
2.2 Objetivos	47
2.3 1 Áreas de estudo	40
2.3.1 Arcas de estudo	40
2.3.2 Calacterização do solo	40
2.3.5 isolamento de iniciologanismos	49 50
2.3.4 Extração de DINA genomico total dos isolados	50
2.3.5 Teste de biodegradação utilizando o indicador redox 2,6-diciorofenol indorenol (DCPIP)	50
2.3.6 Analise dos dados obtidos pelo bioensaio com DCPIP	52
2.3.7 Amplificação por PCR do gene 168 rRNA dos isolados positivos no bioensaio	53
2.3.8 Purificação dos produtos de PCR	54
2.3.9 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA	54
2.3.10 Processamento de dados e identificação filogenética dos isolados	55
2.4 Resutados e discussões	55
2.4.1 Coleta e caracterização dos solos	55
2.4.2 Isolamento dos microrganismos do solo	59
2.4.3 Extração de DNA genômico total dos isolados	60
2.4.4 Teste de biodegradação utilizando o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP)	61
2.4.5 Amplificação por PCR do gene 16S rRNA dos isolados positivos no bioensaio	71
2.4.6 Sequenciamento parcial do gene 16S RNAR e análise das sequências	72
2.5 Conclusões	90
Referências	91
3 Diversidade de genes catabólicos em solos de Terra Preta de Índio e seus adjacentes	95
RESUMO	95
ABSTRACT	96
3.1 Introdução	97
3.2 Objetivos	99
3.3 Materiais e Métodos	99
3.3.1 Áreas de estudo	99
3.3.2 Extração do DNA total da comunidade microbiana do solo	100
3.3.3 Amplificação por PCR do gene <i>bph</i> e purificação dos amplicons	100

3.3.4 Construção de bibliotecas funcionais	101
3.3.4.1 Clonagem dos fragmentos amplificados	101
3.3.4.2 Detecção do inserto nos clones e preparo das sequências para sequenciamento	102
3.3.4.3 Análise das sequências e medidas de diversidade	104
3.3.5 Pirosequenciamento de genes funcionais em solos TPI e ADJ	106
3.3.5.1 Amplificação do gene <i>bph</i> nas amostras dos sítios TPI e ADJ	106
3.3.5.2 Determinação das sequências válidas	107
3.3.5.3 Análises das sequências, parâmetros ecológicos e medidas de diversidade	108
3.3.6 PCR quantitativo em tempo real	108
3.3.6.1 Amplificação de genes de dioxigenases aromáticas	109
3.3.6.2 Amplificação do gene ribossomal 16S rRNA	109
3.4 Resultados e discussão	110
3.4.1 Extração do DNA genômico total da comunidade microbiana a partir dos solos TPI e ADJ	110
3.4.2 Amplificação do gene <i>bph</i> a partir de solos TPI e ADJ e construção das bibliotecas funcionais	111
3.4.3 Análises das sequências, parâmetros ecológicos e medidas de diversidade, e construções filogenéticas a	110
partir dos resultados de bibliotecas funcionais para o gene bph para os solos TPI e ADJ	112
3.4.4 Análises das sequências, parâmetros ecológicos e medidas de diversidade, e construções filogenéticas a	104
partir dos resultados obtidos por pirosequenciamento para o gene <i>bph</i> para os solos TPI e ADJ	124
3.4.5 PCR quantitativo em tempo real	130
3.5 Conclusões	134
Referências	135
rRNA e <i>bph</i>	140 140
ABSTRACT	141
4.1 Introdução	142
4.2 Objetivos	143
4.3 Materiais e Métodos	143
4.3.1 Åreas de estudo	143
4.3.2 Produção dos microcosmos para incubação do solo na presença de hidrocarbonetos aromáticos4.3.3 Extração do DNA total da comunidade microbiana do solo	144 145
4.3.4 Amplificação do gene 16S rRNA	145
4.3.5 Amplificação do gene <i>bph</i>	146
4.3.6 Purificação dos produtos de PCR	146
4.3.7 Reação de restrição dos produtos de PCR para análise de T-RFLP	147
4.3.8 Precipitação dos produtos de digestão	147
4.3.9 Processamento e análises do Polimorfismo dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP) do gene	147
16S rRNA e <i>bph</i>	147
4.3.10 PCR quantitativa em tempo real	148
4.3.10.1 Amplificação de genes <i>bph</i> e 16S rRNA para qPCR	148
4.4 Resultados e Discussão	149
4.4.1 Extração do DNA total da comunidade microbiana do solo	149
4.4.2 Análise do Polimorfismo dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP) do gene 16S rRNA e bph.	150
4.4.3 Estruturas das comunidades microbianas (gene 16S) e do gene catabólico (bph) no perfil dos solos dos	153
sítios de TPI e ADJ	155
4.4.4 Análise de riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais	155
4.4.5 PCR quantitativo em tempo real	158
4.5 Conclusões	161
Referências	162

1 Introdução

O termo "Terra Preta de Índio" (TPI) é utilizado para designar horizontes antrópicos A em solos da Amazônia, diferenciados de seus solos adjacentes pela ação de atividades antrópicas, ocorridas em assentamentos pré-colombianos nesta região. Estes solos também se destacam pela alta concentração de nutrientes, matéria orgânica e elevada quantidade de carvão pirogênico, além de sua alta fertilidade, que o difere dos solos de baixa fertilidade encontrados na mesma região.

Os solos de Terra Preta constituem um habitat de alta diversidade microbiana e um ambiente propício para a realização de diversos processos de biossíntese e biodegradação, amplamente dependente de enzimas microbianas que podem utilizar compostos orgânicos como fonte de carbono e energia.

Nesse sentido, a caracterização de genes funcionais em solos de TPI pode gerar informações sobre a influência da microbiota no equilíbrio e na fertilidade desses solos e seu envolvimento nos ciclos biogeoquímicos. A compreensão de funções exercidas por comunidades bacterianas no solo e suas interações com outros componentes, podem auxiliar no estudo ecológico destes solos, bem como na descoberta de microrganismos potencialmente exploráveis em processos biotecnológicos.

Sendo assim, este estudo teve como objetivo analisar isolados de bactérias com potencial de degradação, obtidos de amostras de solos de TPI e seus solos originais, também chamados de adjacentes (ADJ), além da análise da diversidade funcional e quantificação do gene catabólico que codifica para a bifenil dioxigenase (*bph*) nos mesmos solos, e detectar possíveis mudanças na estrutura das comunidades microbianas de bactéria (16S rRNA) e do gene *bph* após encubamento de amostras dos solos com hidrocarbonetos aromáticos. Estes objetivos e a metodologia utilizada para alcançá-los estão claramente explicadas nos próximos capítulos.

O conhecimento das comunidades microbianas em relação à sua função consiste numa importante fonte de informação para o entendimento da dinâmica de um ecossistema. Dessa forma, a fim de contextualizar o trabalho e os resultados obtidos, este capítulo introdutório apresenta uma revisão de literatura sobre solos de TPI e seu potencial como área de estudo de genes catabólicos, informações relevantes sobre a biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos e as técnicas de microbiologia e biologia molecular utilizadas nesta pesquisa.

1.1 Revisão da Literatura

1.1.1 Terra Preta de Índio (TPI)

A floresta Amazônica estende-se por nove países do continente Sul Americano e representa 70 % das florestas tropicais do mundo. No Brasil sua extensão atinge uma área com cerca de 5,1 milhões de km² representada por uma grande variedade de solos. As características da maioria dos solos presentes na floresta Amazônica incluem solos de baixa fertilidade natural, baixa capacidade de retenção de nutrientes e baixos valores de pH, sendo considerados solos ácidos (COCHRANE; SÁNCHEZ, 1982). Levando em consideração estas características, esses solos da região amazônica limitam a produtividade agrícola, sendo um forte impacto social, já que a agricultura de subsistência é fundamental aos habitantes locais.

Apesar da quantidade de solos com baixa fertilidade, nessa região também é encontrado um dos tipos de solos com características favoráveis à agricultura, a chamada "Terra Preta Arqueológica" (TPA), também conhecida como "Terra Preta de Índio" (TPI), ou Amazon Dark Earth (ADE). Estes solos são conhecidos por apresentarem evidências arqueológicas que indicam que as atividades humanas antigas transformaram significativamente as paisagens na vizinhança dos seus assentamentos, especialmente no período pré-histórico colombiano entre 500 e 8700 atrás (KERN; COSTA, 1997). Estudos afirmam que sociedades indígenas formaram extensos depósitos de resíduos que contribuíram para a alteração das propriedades do solo. De origem vegetal houve o depósito de folhas, cascas de mandioca e sementes; de origem animal houve o depósito de ossos, sangue e carapaças de quelônios; também apresentam resíduos de fogueiras que contribuíram na formação do carvão vegetal (LEHMANN et al., 2003).

Esses solos com horizonte superficial A antrópico, sendo mais comuns em Latossolos e Agrissolos (KERN et al., 2003), representam um dos mais marcantes registros da antiga ocupação humana na região amazônica, e encontram-se distribuídos aleatoriamente, comumente localizados ao longo de rios e interflúvios, ocupando várzeas, elevações marginais adjacentes e terra firme. Estima-se que os solos TPI representem de 0,1 a 0,3 % (aproximadamente de 6 a 18 mil km^2) da Bacia Amazônica (SOMBROEK et al., 2003).

A TPI pode ser identificada por sua cor escura (Figura 1.1), resultado da concentração de substâncias orgânicas depositadas no solo. Esses solos apresentam altos teores de cálcio, carbono, magnésio, manganês, fósforo e zinco, elementos que contribuem para a fertilidade dos mesmos. Também apresentam elevados níveis de capacidade de troca catiônica (CTC) e soma de bases (SB), abundância de carvão vegetal e intensa atividade biológica quando confrontados aos solos não antrópicos, chamados de solos originais ou solos adjacentes (ADJ) (GLASER et al., 2001; LIMA et al., 2002). Os solos de TPI, comparados aos solos adjacentes apresentam maior quantidade e diferença qualitativa da sua matéria orgânica. Isto provavelmente está relacionado às características mineralógicas desses solos orgânicos ou à presença de maior quantidade de carvão pirogênico (carvão vegetal ou orgânico). A quantidade de carvão pirogênico em TPI pode ser até 70 vezes maior que em solos adjacentes, onde ocorre rápida decomposição da matéria orgânica devido às altas temperaturas, precipitações elevadas e deficiência de minerais estáveis (McCANN et al., 2001; GLASER, 2007). Os níveis de matéria orgânica, N e P encontrados em TPI chegam a ser três vezes maiores do que nos solos originais (GLASER, 2007). Os elevados teores destes nutrientes são resultantes da deposição antropogênica de cinzas, resíduos de peixes, conchas, caça, dejetos humanos, fragmentos cerâmicos, carvão e artefatos líticos (de pedra), entre outros compostos orgânicos. Por essa razão, a fertilidade química da TPI é significativamente superior à maioria dos solos adjacentes (RODRIGUES, 1996; KERN; KÄMPF, 1989; WOODS; MCCANN, 1999; MCCANN et al., 2001; LIMA et al., 2002). Neste contexto, os solos de TPI são considerados peças-chave na busca de soluções para a agricultura sustentável na região Amazônica, já que a agricultura de subsistência é fundamental aos habitantes locais (FALESI, 1972).

Os sítios de TPI ocupam normalmente posições em áreas mais elevadas do terreno, entre 5 a 25 m de altura em relação à água corrente mais próxima, onde não ocorrem inundações periódicas (KERN et al., 2009). Quanto à espessura, as TPI apresentam entre 30 a 60 cm de profundidade, podendo eventualmente chegar a dois metros (KERN et al., 2003). Essas variações de profundidades estão diretamente relacionadas com o padrão de assentamento do homem pré-histórico, pela diferença de intensidade, duração e a natureza das atividades culturais que formaram estes solos, bem como os processos naturais e outras atividades ocorridas após o abandono dos sítios.



Figura 1.1 - Perfis de solos de Terra Preta de Índio localizado no sítio Caldeirão (Embprapa Amazônia) – (a) Solos de TPI sob Floresta Secundária; (b) Solos de TPI sob agricultura

Fotos: Maria Julia Brossi, 2010.

Comunidades microbianas em solos são responsáveis por atuar em diversos processos biogeoquímicos, os quais influenciam diretamente na ciclagem, produção e incorporação de nutrientes neste sistema. Nos ecossistemas amazônicos, os microrganismos atuam em grande parte na liteira (profundidade de 0-10 cm do solo) a fim de garantir a incorporação dos elementos minerais no perfil do solo. A presença de material orgânico estável e a grande atividade biológica indicam que os solos TPI podem ser sítios de alta diversidade microbiana, constituindo uma extensa fonte de germoplasma microbiano. Estudos que avaliaram a diversidade bacteriana em TPI, com base na análise de sequências do gene 16S rRNA, encontraram elevada ocorrência de sequências homólogas à bactérias não cultiváveis. Isto demonstra a necessidade de se intensificar estudos nesses ambientes, que podem ser fontes de diversidade bacteriana e de produtos biotecnológicos pouco conhecidos e ainda não explorados (FERREIRA, 2007).

Neste contexto, a elaboração de uma prospecção da diversidade microbiana e diversidade funcional em solos de TPI podem fornecer dados para a compreensão das funções exercidas pelas comunidades presentes nestes solos e o conhecimento das suas interações com outros componentes da biodiversidade, além de benefícios econômicos e estratégicos, como a descoberta de microrganismos potencialmente exploráveis em processos biotecnológicos.

1.1.2 Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos

Hidrocarbonetos ou hidratos de carbono são basicamente compostos apolares constituídos de moléculas de hidrogênio e carbono, (ATKINS; LORETTA, 2001) de natureza hidrofóbica, que constituem a matéria orgânica presente em vegetais, animais e outros compostos, tais como o petróleo (FIGUEIREDO, 1999).

Os hidrocarbonetos podem ser divididos em grupos de acordo com suas características estruturais, sendo assim classificados como alifáticos ou aromáticos. Os hidrocarbonetos alifáticos são aqueles que não contêm anel benzênico e as suas cadeias carbonadas podem ser abertas ou fechadas. Os hidrocarbonetos alifáticos de cadeia fechada são os alicíclicos. Os de cadeia aberta tomam o nome de: alcanos, quando os átomos de carbono estão ligados uns aos outros por ligações covalentes simples; alcenos, quando existe pelo menos uma ligação covalente dupla entre dois átomos de carbono e alcinos, quando existe pelo menos uma ligação covalente tripla entre dois átomos de carbono (Figura 1.2). Os hidrocarbonetos aromáticos (HAs) são aqueles que apresentam pelo menos um anel benzênico (Figura 1.3) e esse núcleo é formado por uma cadeia fechada de seis átomos de carbono que possuem alternadamente duplas e simples ligações (HABE; OMORI, 2003).



Figura 1.2 - Grupos de Hidrocarbonetos



Figura 1.3 - Representação gráfica de um anel benzênico (Fórmula química: C₆H₆)

A presença dos hidrocarbonetos no ambiente ocorre naturalmente e de forma contínua, pela combustão incompleta da matéria orgânica, como biomassa vegetal, madeira e outros materiais orgânicos. Porém a contaminação ambiental está associada à geração antropogênica destes compostos, que ocorre através das indústrias petroquímicas, que produzem hidrocarbonetos aromáticos para serem utilizados na fabricação de corantes, de fibras sintéticas, de conservantes de madeira e outros. Além disso, as atividades de produção de carvão vegetal, de extração e gaseificação do carvão mineral e a cadeia de extração, transporte, refino, transformação e utilização do petróleo e seus derivados são também responsáveis pela introdução de grandes quantidades de hidrocarbonetos aromáticos no ambiente (BAMFORTH; SINGLETON, 2005).

Dentre os hidrocarbonetos aromáticos, estão os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), que formam um conjunto de compostos orgânicos hidrofóbicos que consistem na fusão de dois ou mais anéis benzênicos em arranjos lineares e angulares ou em agrupamentos específicos (HABE; OMORI, 2003), e são encontrados no ambiente em conseqüência da eliminação de carvão e madeira processados, lama de petróleo e asfalto, entre outros. Estes contaminantes podem ser tóxicos, mutagênicos e/ou carcinogênicos, e persistem nos ecossistemas por anos como consequência da baixa solubilidade em água e da adsorção em partículas do solo.

Com base na sua abundância e toxicidade, os HPAs têm sido considerados pela EPA (*Environmental Protection Agency*) como poluentes prioritários na busca por soluções de descontaminação. O tratamento biológico de solos contaminados com HPAs parece ser uma via eficiente, econômica e versátil em alternativa ao tratamento físico-químico, porque oferece vantagens potenciais como a destruição completa do poluente, baixo custo, grande segurança e menor perturbação ambiental. Nesse sentido, muitas pesquisas atualmente têm seu foco na degradação biológica destes poluentes, e vários microrganismos, como bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Burkholderia*, têm sido descritos como potencialmente degradadores de HPAs via metabolismo e cometabolismo (SENTCHILO et al., 2001; SMETS et al., 1993; MA; SHAO, 2008).

Ainda entre os hidrocarbonetos aromáticos, o acrograma BTEX refere-se ao benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno. Esses compostos são constituídos por hidrocarbonetos aromáticos simples, voláteis, presentes no petróleo cru e em seus subprodutos, como a gasolina, além de serem tipicamente encontrados em óleos e resinas vegetais. Também são produzidos em grande quantidade na forma de produtos químicos para uso industrial, tais como solventes e precursores na produção de pesticidas, plásticos e fibras sintéticas (HARWOOD; GIBSON, 1997). Os BTEXs são considerados compostos causadores de poluição ambiental devido à ocorrência generalizada de vazamentos de petróleo a partir de tanques de armazenamento, refinarias, oleodutos e terminais de distribuição (FRIES et al., 1994).

O bifenil ou fenilbenzeno é o hidrocarboneto aromático em que dois anéis benzênicos estão ligados por uma ligação simples. A partir desses hidrocarbonetos é possível a geração dos bifenilos policlorados (PCBs), através da união da molécula de bifenil com um ou mais átomos de cloro. Esses compostos são constituídos por moléculas orgânicas produzidas

comercialmente pela cloração direta da molécula de bifenil usando cloreto férrico como catalisador. A molécula de bifenil contém em sua estrutura dois anéis conectados com seis átomos de carbono cada, portanto uma molécula de PCB é qualquer molécula que apresente um ou múltiplos cloros ligados ao núcleo do bifenil. As moléculas de cloro podem estar ligadas a qualquer um ou a todos dos dez sítios disponíveis, sendo teoricamente possível a formação de 209 diferentes compostos de PCBs (BEDARD et al., 1987).

Sendo assim, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), os compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX), os bifenilos e os bifenilos policlorados (PCBs) constituem os principais hidrocarbonetos com potencial para a contaminação de ecosistermas e, portanto têm sido foco em estudos de biodegradação, principalmente na busca de genes microbianos associados à degradação total e/ou parcial destes compostos em diferentes sistemas.

A capacidade das bactérias em utilizar hidrocarbonetos aromáticos (HAs) como fonte de carbono e energia tem sido amplamente documentada ao longo das últimas décadas (CERNIGLIA, 1992). Embora estes estudos tenham sido essenciais para o estabelecimento de vias metabólicas para a biodegradação de HAs individuais, há também um interesse crescente na compreensão de como poluentes orgânicos afetam a estrutura global das comunidades microbianas.

Neste contexto, grande atenção tem sido dada aos processos metabólicos de degradação de hidrocarbonetos mediados por bactérias. O conhecimento de genes catabólicos envolvidos na biodegradação dos hidrocarbonetos por diferentes espécies pode fornecer informações sobre as relações entre a função e as estruturas enzimáticas, e sobre a evolução e diversidade de genes catabólicos via transferência horizontal, eventos de transposição, rearranjos de DNA, fusão de genes e mutações pontuais (HABE; OMORI, 2003).

A capacidade de degradação e a via de degradação de um determinado hidrocarboneto variam de um microrganismo para outro. A biodegradação destes compostos envolve diferentes genes e enzimas específicas, tanto para as reações catalisadas quanto na seleção do substrato utilizado. A biodegradação bacteriana e fúngica de hidrocarbonetos aromáticos são realizadas inicialmente por enzimas chamadas oxigenases. Na biodegradação, o oxigênio molecular tem duas funções principais, sendo a primeira como aceptor final de elétrons, a fim de que ocorra a liberação de elétrons durante as reações metabólicas e a segunda função como oxidante direto do anel aromático (LEAHY; COLWELL, 1990).

Os genes envolvidos na biodegradação de compostos aromáticos são aqueles que codificam as subunidades de complexos enzimáticos. Como já citado anteriormente, esses complexos enzimáticos são as oxigenases, e podem ser divididos em mono e dioxigenases aromáticas.

Em ambientes aeróbios, as enzimas oxigenases codificadas por genes funcionais distribuídos em plasmídeos bacterianos, no cromossomo, ou em ambos, iniciam o processo de degradação através da incorporação de um ou dois átomos de oxigênio aos substratos, resultando em vários bioprodutos de grande interesse biotecnológico, como estereoquímicos, e precursores de inúmeras vias biossintéticas (BOYD et al., 2001). Essas enzimas estão envolvidas no processo inicial de clivagem do anel benzênico de hidrocarbonetos aromáticos (Figura 1.4) tornando-os suscetíveis ao metabolismo para um grande número de microrganismos. A evolução dessas enzimas em bactérias, tanto Gram positivas como Gram negativas, pode ser observada como resultado da adaptação microbiana frente a novos compostos químicos inseridos no ambiente (WACKETT, 2004).



Figura 1.4 - Clivagem inicial do anel benzênico da molécula de bifenil pela enzima bifenil 2,3 dioxigenase (Arnett et al., 2000)

A família das dioxigenases aromáticas ou ARHDs (do inglês, *Aromatic Ring Hydroxylating Dioxygenases*) é composta por sequências bastante diversas, devido provavelmente à dispersão destes genes via transposons e plasmídeos, proporcionando mobilidade e acelerando o potencial evolucionário destes genes (KUMAMARU et al., 1998).

As dioxigenases que degradam hidrocarbonetos aromáticos possuem uma ou mais proteínas envolvidas no transporte de elétrons, dependendo do substrato e da origem da enzima, sendo geralmente uma redutase e uma ferrodoxina, além de duas subunidades de proteína ferro-enxofre: a subunidade beta (menor) e a subunidade alfa (maior), que pode ser dividida em dois domínios: um centro catalítico Rieske-[2Fe-2S] e um átomo de ferro mononuclear (CERNIGLIA, 1992). Paralelamente, as dioxigenases para degradação de benzoato, bifenil, tolueno e benzeno são complexos enzimáticos formados por três ou quatro subunidades proteicas, que catalisam uma reação redox dependente de NADH.

Estudos sobre as dioxigenases por técnica de cristalografia com raios-X têm disponibilizado um modelo estrutural desta proteína (Figura 1.5) que serve como base para a análise de outras dioxigenases (CARREDANO et al., 2000). O domínio catalítico de uma dioxigenase, que facilita tanto a ativação da dioxigenase como do substrato, contém vários aminoácidos hidrofóbicos dispostos em uma cavidade alongada, capaz de aceitar substratos aromáticos, como por exemplo, naftaleno, bifenil e tolueno.

Os principais substratos das dioxigenases geralmente são derivados de óleo bruto e lignina, uma vez que constituem as maiores fontes de compostos aromáticos no ambiente. Entretanto, uma enorme quantidade e diversidade de outros compostos podem ser degradadas por estas mesmas enzimas. Estudos em relação às subunidades alfa e beta das dioxigenases e sua importância no reconhecimento do substrato, indicam que a subunidade maior pode desempenhar individualmente o controle desta função e, devido às suas características conservadas, esta subunidade tem sido utilizada como alvo para detecção de microrganismos envolvidos na degradação de hidrocarbonetos aromáticos em ambientes contaminados ou não por estes compostos (WILSON et al., 1999).



Figura 1.5 - Estrutura em 3D do complexo Bifenil dioxigenase da bactéria *Burkholderia Xenovorans* LB400, por técnica de cristalografia com raios-X (NCBI, 2012)

As evidências em relação à conservação da subunidade alfa de dioxigenases aromáticas, juntamente com o reconhecimento de sua função como sítio catalítico, permitiram o uso de genes catabólicos como marcadores moleculares em análises de diversidade funcional através do uso de primers degenerados para a amplificação de uma gama muito maior de dioxigenases. Em um estudo envolvendo a diversidade funcional de genes de dioxigenases no ambiente, Iwai et al. (2010), utilizou regiões altamente conservadas das sequências de aminoácidos de genes de dioxigenases das famílias de tolueno e bifenil, retiradas do banco de dados The **Functional** Gene Pipeline/Repository (www.fungene.cme.msu.edu/) para servir como molde na construção de primers degenerados para a região da subunidade alfa de dioxigenases (Figura 1.6).



Figura 1.6 - Região conservada do gene da dioxigenase da bactéria *Burkholderia Xenovorans* LB400 e primers degenerados construídos para a amplificação desta região

Paralelamente, esta ferramenta tornou possível a identificação de microrganismos degradadores de inúmeros substratos orgânicos em vários ecossistemas, além da descrição de novas sequências de ARHDs em microrganismos cultiváveis e não cultiváveis (KIM; CROWLEY, 2007).

A conservação das sequências de aminoácidos de centros ativos de inúmeros tipos de enzimas catabólicas pode fornecer uma base sólida para a identificação de proteínas e variantes gênicas que executam a mesma reação ou reações similares. Neste ponto reside a importância do uso de técnicas baseadas em similaridade de sequência para a identificação e isolamento de genes que codificam variantes enzimáticas envolvidas na biodegradação e biotransformação de contaminantes e/ou compostos xenobióticos. O uso de análises estatísticas, técnicas de *"fingerprinting*" de genes catabólicos, similaridade em relação à genes conservados (16S rRNA, por exemplo), bibliotecas funcionais, piroseqüenciamento, entre outras técnicas, podem constituir importantes ferramentas na caracterização e no levantamento de atividades catalíticas em determinados ambientes, além de possibilitar estudos sistemáticos da sequência do gene e sua abundância em condições heterogêneas (SILVA, 2011).

Nesse contexto, a compreensão da diversidade funcional associada com a degradação da matéria orgânica, não somente em solos de TPI, mas nos solos de maneira geral, pode constituir um grande desafio para o entendimento de processos microbiológicos, como uma tentativa de descrever a diversidade funcional desses ambientes (TSAI et al., 2009).

1.1.3 Diversidade funcional em solos de Terra Preta

Os solos estão entre os habitats mais produtivos e ricos em espécies na Terra, onde cada componente diferente da fração sólida (areia, silte, argila e matéria orgânica) oferece uma infinidade de diferentes micro-habitats para o estabelecimento e colonização microbiana (VAN ELSAS; TREVORS, 1997). Além disso, a variação temporal nos fatores físico-químicos do solo, tais como temperatura, umidade e nutrientes em cada um destes micro-habitats espaciais, aumenta ainda mais a diversidade de nichos disponíveis para suportar as populações microbianas (ROESCH et al., 2007). A quantidade de espécies bacterianas que são descritas na literatura está crescendo nos últimos anos. O interesse em conhecer a diversidade bacteriana, assim como o papel que desempenham na qualidade do solo, aumentou o número de estudos voltados a esta área, juntamente com avanços no desenvolvimento de ferramentas de biologia molecular, as quais possibilitam estudos mais robustos e abrangentes, por realizarem a análise de sequências de DNA a partir de material genômico extraído diretamente do solo.

Essas novas técnicas moleculares evidenciam a grandeza da diversidade genética de bactérias presentes no solo. Estima-se que um grama de solo pode conter entre 10^6 a 10^9 células microbianas (WHITMAN et al., 1998; TØRSVIK; ØVREAS, 2002) correspondentes a cerca de 1000 Gbp de sequências genômicas microbiana (VOGEL et al., 2009). O desenvolvimento nos métodos de seqüenciamento de alto rendimento ajudam na elucidação da diversidade e da composição de comunidades microbianas em solos em todo o mundo, com base no padrão filogenético das sequências do gene ribossômico 16S rRNA.

Uma informação relevante em estudos de solo é que sua estrutura microbiológica vem sendo pesquisada no mundo todo, e nunca foram reportadas duas amostras de solo com exatamente a mesma composição de comunidade (JANSSEN, 2006; ELSHAHED et al., 2008). No entanto, a um nível mais elevado da taxonomia, os solos exibem uma estrutura de comunidade notavelmente estável, em que a maioria das sequências sempre pertencem à nove filos bacterianos: Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi, Bacteroidetes, Firmicutes, Planctomycetes, Verrucomicrobia e Gemmatimonadetes, dentre um número estimado de 84 filos ou filos candidatos reconhecidos atualmente de acordo com o quadro taxonômico de Hugenholtz no banco de dados *Greengenes* (2012) (DE SANTIS et al., 2006a, 2006b). Esta estabilidade presente na estrutura da comunidade, em nível de filo, é notável,

considerando as grandes variações de pH, temperatura, propriedades do solo, regimes de uso da terra e da vegetação entre os vários solos.

Além da busca pela diversidade de comunidades bacterianas no solo, vem crescendo a busca e o entendimento da diversidade funcional dos mesmos. A diversidade funcional é um aspecto que envolve a diversidade do solo em relação às funções que os microrganismos realizam e podem envolver diferentes atividades. A relação entre a diversidade e função microbiana ainda não é completamente conhecida, porém sabe-se que a biodiversidade pode influenciar na estabilidade, produtividade, resistência e resiliência do ecossistema. Após eventos de perturbação (i.e. queimada, erupção vulcânica, deslizamentos, etc.) têm sido observadas mudanças marcantes na diversidade funcional em ecossistemas de solos (SCHIPPER et al., 2001).

Os solos de Terra Preta de Índio, que sofreram eventos de antropização, são destacados por sua intensa atividade biológica em comparação aos solos adjacentes originais, portanto o estudo da microbiota destes solos é de extrema importância, a fim de explorar sua diversidade microbiana e funcional, e entender o papel da população microbiana nos ciclos biogeoquímicos e nas taxas de decomposição da matéria orgânica (LIMA, 2012).

Proteobactérias pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia* são comumente encontradas no solo e têm sido descritas como capazes de expressar genótipos catabólicos envolvidos na biodegradação de compostos altamente poluentes, como os hidrocarbonetos aromáticos. Estes organismos executam reações enzimáticas que são incomuns em outros domínios filogenéticos, e adquiriram enorme vantagem adaptativa pela capacidade de utilizar estes substratos. Grupos semelhantes de bactérias foram recentemente encontrados em amostras de Terra Preta de Índio (TPI) na Amazônia Central, além da detecção de genes catabólicos que participam da degradação de hidrocarbonetos aromáticos (SILVA, 2011).

A caracterização de genes envolvidos na síntese de enzimas degradadoras de poluentes e xenobióticos, juntamente com estudos sobre a diversidade genética de estirpes potencialmente degradadoras poderão disponibilizar informações importantes sobre a síntese de genes envolvidos em vias degradadoras para estudos de bioprospecção gênica, visando a busca por novas atividades catalíticas para fins químicos e biotecnológicos, refletindo a imensa riqueza de genes microbianos em solos tropicais, como o solo de Terra Preta de Índio da Amazônia. A busca pela biodiversidade e bioprospecção de novos microrganismos tornou-se uns dos principais focos da era biotecnológica, na qual a utilização destes organismos vem crescendo, não apenas pela extraordinária capacidade em produzir uma grande variedade de metabólitos, mas também pela sua adaptabilidade genética.

Sendo assim, a busca por genes catabólicos e bactérias potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos em solos de TPI, pode gerar informações indicativas da qualidade biológica destes solos, além de prover dados sobre a diversidade funcional desses genes em solos antrópicos.

1.1.4 Técnicas moleculares em ecologia microbiana

Historicamente a microbiologia baseou-se no isolamento e cultivo de estirpes microbianas, visando principalmente sua caracterização morfológica e metabólica. Estas técnicas têm permitido uma ampla caracterização e exploração de microrganismos obtidos nos mais diversos ambientes. Juntamente com técnicas de microbiologia, é possível a utilização de bioensaios, nos quais grupos de organismos de interesse podem ser estudados quanto ao seu crescimento e atividade, por meio da manipulação de condições específicas de interesse. Os bioensaios são experimentos *in vitro*, que permitem investigar o efeito de substâncias específicas no crescimento e/ou atividade de um determinado organismo. Estes ensaios também podem auxiliar na triagem e busca por determinadas funções e organismos. Isto se dá principalmente por meio da manipulação de compostos (e.g. contaminantes orgânicos) em meio de cultura, visando buscar organismos capazes de processar (i.e. degradação parcial ou total) estes compostos, de acordo com condições externas constantes.

Apesar do uso de métodos microbiológicos, os avanços nas técnicas moleculares, aplicados ao estudo da ecologia de microrganismos em sistemas complexos, têm contribuído significativamente para o entendimento das comunidades microbianas do solo, principalmente por acessar a grande maioria dos microrganismos, os quais são ainda considerados não cultiváveis (ROSADO et al., 1997; HANDELSMAN; SMALLA, 2003).

Métodos baseados na amplificação de ácidos nucléicos por reação de polimerase em cadeia (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), como bibliotecas de genes, sequenciamento de DNA, pirosequenciamento, PCR em tempo real, análise de "*fingerprint*"

(e.g. T-RFLP - *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*), entre outras, permitem aos pesquisadores comparar diferentes comunidades de microrganismos derivados de diferentes ambientes (MARSH, 1999).

As bibliotecas genômicas consistem em coleções de sequências de DNA, construídas considerando-se material genético de qualquer organismo, bem como em sequências obtidas de amostras ambientais (TINGRE; RUBIN, 2005).

O processo de construção de bibliotecas genômicas consiste na extração do DNA/RNA de organismos ou de uma comunidade total; as seqüências de interesse são amplificadas por PCR utilizando *primers* seletivos e específicos para o gene de interesse; os fragmentos amplificados são clonados em vetores, geralmente plasmídeos; os plasmídeos são inseridos em células competentes de *Escherichia coli*, onde são multiplicados; o vetor é extraído das células e o fragmento clonado é sequenciado. O seqüenciamento realizado nas diferentes cópias do gene obtidas por PCR e sua comparação com bases de dados fornecem informações sobre a diversidade do gene de interesse do material estudado (JESUS, 2008).

As sequências geradas a partir do sequenciamento podem ser comparadas com os bancos de dados públicos. Os bancos de dados do *GenBank* e do RDP (*Ribosomal Database Project*) permitem a determinação do organismo ou gene com sequência mais similar (BENSON et al., 2005; COLE et al, 2007; CURY, 2006). Adicionalmente a esta análise de identificação, diversos outros softwares vêm sendo desenvolvidos, visando principalmente inferir sobre a riqueza e a diversidade de espécies nas bibliotecas de genes analisadas, bem como estabelecer um padrão comparativo entre bibliotecas de genes construídas a partir de diferentes amostras [e.g. MOTHUR, S-Libshuff, FastGroupII, TreeClimber, SONS e o Unifrac (SINGLETON et al., 2001; SCHLOSS; LARGETE; HANDELSMAN, 2004; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2006)].

O pirosequenciamento foi inicialmente descrito por Ronaghi et al. (1996), ao demonstrar que a molécula de pirofosfato (PPi) produzida durante a reação de polimerização do DNA poderia ser utilizada para detectar a incorporação de um nucleotídeo específico. O método foi denominado "sequenciamento por síntese", uma vez que a sequência-alvo é determinada na medida em que é sintetizada a fita complementar. Todo o processo envolve a participação de quatro enzimas, responsáveis pela síntese da fita complementar através da incorporação de nucleotídeos, e da conversão do PPi em ATP e consequentemente em sinal luminoso, que pode ser detectado pelo equipamento. A conversão de PPi em luz é um

processo estequiométrico, onde cada molécula de PPi gera uma quantidade definida de fótons e a intensidade luminosa emitida pela reação é captada pelos sensores do seqüenciador (RONAGHI, 2001). Outro avanço significativo da técnica de pirosequenciamento deve-se ao trabalho de Parameswaran et al. (2007), que adaptaram ao *primer* utilizado para a detecção do gene-alvo uma sequência curta de nucleotídeos, denominada "código de barras" ou *barcode*. Este código permitiu o uso da técnica de piroseqüenciamento para várias amostras diferentes em paralelo, pois as sequências podem ser utilizadas posteriormente como referência na identificação e separação de diferentes amostras por ferramentas de bioinformática.

Assim como as bibliotecas genômicas, o pirosequenciamento também possibilita que as sequências geradas sejam comparadas com os bancos de dados públicos, e que *softwares* auxiliem na análise dos dados gerados, mas vale ressaltar que pela grande quantidade de seqüencias geradas, técnicas de bioinformática se tornam essenciais nas análises dos resultados obtidos.

Outra técnica molecular utilizada no estudo da ecologia microbiana é a PCR em tempo real, que possibilita a quantificação de genes de interesse. A reação de polimerização em cadeia em tempo real combina a metodologia de PCR convencional com um mecanismo de detecção e quantificação por fluorescência. A metodologia permite que os processos de amplificação, detecção e quantificação de DNA sejam realizados em uma única etapa, agilizando a obtenção de resultados e com maior acurácia.

Ainda em estudos de ecologia microbiana, quando quer se comparar uma comunidade com outra, é possível utilizar técnicas de *fingerprint*. Uma conhecida técnica de comparação de estruturas de comunidades é o T-RFLP, que ganhou popularidade nos últimos anos devido à alta reprodutibilidade e o acesso a um grande número de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) (OSBORN; MOORE; TIMMIS, 2000). Essa técnica determina o polimorfismo no comprimento dos fragmentos terminais de uma reação de restrição, provenientes de um produto de amplificação de PCR, sendo um dos *primers* marcado com fluorescência. É um método muito sensível a mudanças nas estruturas de comunidades microbianas do solo, além de possuir alta capacidade de processamento disponível, permitindo a análise de uma grande quantidade de amostras (LIU et al., 1997; TIEDJE et al., 1999). A técnica pode ser utilizada como uma triagem rápida de algum gene para buscar diferenças entre comunidades em amostras ambientais. Os fragmentos de restrição terminal resultantes são medidos e

comparados entre as amostras, podendo ser convertidos em matrizes de similaridade e estudados por meio da análise de componentes principais.

De maneira geral conclui-se, portanto, que técnicas de cultivo têm auxiliado amplamente estudos de caracterização e manipulação de linhagens bacterianas. Por outro lado, devido a não culturabilidade da grande maioria das bactérias (conhecido como "*the great plate count anomaly*") técnicas de biologia molecular tornam-se indispensáveis quando se tem como objetivo obter uma visão mais aprofundada da constituição filogenética e funcional de diversos ecossistemas.

1.2 Hipótese do trabalho

No presente trabalho a principal hipótese estabelecida, a qual é argumentada e discutida durante todo o estudo, é de que existem diferenças significativas na diversidade de genes catabólicos em solos de Terra Preta de Índio quando comparados aos seus respectivos solos adjacentes e considerando diferentes coberturas vegetais.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral o estudo da diversidade funcional de genes catabólicos, além do estudo de bactérias potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos, com base em métodos de isolamento e cultivo, seguidos de abordagens moleculares (sequenciamento e quantificação de genes que codificam a enzima dioxigenase), a fim de compreender a relação entre a abundância, riqueza, diversidade e funcionalidade destes genes em bactérias presentes em amostras de solo de Terra Preta de Índio, comparativamente à amostras de solos adjacentes e sob diferentes coberturas vegetais.

1.3.2 Objetivos específicos

 Isolar e identificar bactérias de solos de sítios de Terra Preta de Índio e seus adjacentes, a fim de verificar seu potencial de degradação de hidrocarbonetos aromáticos e atividade enzimática através de bioensaios;

• Estudar a diversidade funcional do gene que codifica para a enzima bifenil dioxigenase (*bph*) em solos de sítios de Terra Preta de Índio e adjacente por meio de construção de bibliotecas funcionais e piroseqüenciamento;

• Quantificar o número de cópias do gene *bph*, por meio de técnica de PCR quantitativa, com a finalidade de estabelecer relações entre o número de cópias do gene em função dos diferentes sítios estudados;

• Detectar mudanças na estrutura da comunidade do gene catabólico e do gene 16S, por meio da técnica T-RFLP ("DNA *fingerprinting*"), em microcosmos de solos de sítios de Terra Preta de Índio e adjacentes, encubados com hidrocarbonetos aromáticos.

1.4 Materiais e Métodos

1.4.1 Fluxograma metodológico

Em virtude de modificações e otimizações das metodologias propostas, durante a realização do projeto de doutorado, o projeto foi dividido em três estudos, resumidos no fluxograma apresentado na Figura 1.7.



Figura 1.7 - Fluxograma dos estudos realizados no presente trabalho de acordo com as metodologias empregadas

Diversidade

Funcional do

gene catabólico

das comunidades

(16S e gene catabólico)

bacteriana associada à

biodegradação

Os estudos tiveram por objetivo analisar solos de quatro sítios na região da Amazônia central, sendo dois sítios de Terra Preta de Índio (TPI) e dois sítios de solos originais, chamados de adjacentes (ADJ), sendo que ambos os solos (TPI e ADJ) apresentam um sítio sob cobertura de floresta secundária (FS) e outro sítio sob cobertura de prática agrícola (CULT). No primeiro estudo foi utilizada uma abordagem de isolamento e cultivo de bactérias para a posterior utilização destes isolados em bioensaios de biodegradação, seguido de identificação das bactérias potencialmente degradadoras. No segundo estudo foi utilizada uma abordagem molecular (bibliotecas funcionais, pirosequenciamento e qPCR do gene *bph*) para analisar e quantificar a diversidade funcional do gene catabólico, nos diferentes sítios. Por fim, o terceiro estudo visou analisar a mudança na estrutura das comunidades bacterianas (16S rRNA) e do gene catabólico (*bph*) em microcosmos com solos de todos os sítios encubados com hidrocarbonetos aromáticos. Os dados destes estudos visam fornecer informações sobre a medida da participação de bactérias potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos em solos
TPI e ADJ, além de contribuir com o conhecimento da diversidade funcional e quantidade de genes relacionados à degradação de compostos aromáticos.

1.4.2 Áreas de estudo e amostragem

As áreas de coleta de solos para este estudo estão situadas na Estação Experimental do Caldeirão, pertencentes à Embrapa Amazônia Ocidental, localizada no município de Iranduba, Amazonas (03°26′S, 60°23′ W) (Figura 1.8). Quatro sítios foram selecionados, dois com a presença de solo com horizonte A antrópico, conhecido como Terra Preta de Índio, sendo um sítio sob floresta secundária e outro sob cultivo; os outros dois sítios são os solos adjacentes à TPI, sendo do mesmo jeito, um sítio sob floresta secundária e outro sob cultivo. A Terra Preta de Índio foi classificada como Antrossolo hórtico e os solos adjacentes como Argissolo amarelo (Haplic Acrisol) de acordo com a Base de Referência Mundial para Recursos de Solos (FAO, 1998).

Os sítios sob floresta secundária, tanto TPI quanto ADJ, apresentam esta cobertura por um período de aproximadamente 35 anos. Sua vegetação natural é de floresta tropical úmida com precipitação anual de 2530 mm (1971 - 1997) sendo o valor máximo sazonal entre dezembro e maio, e a temperatura média anual é de 25,8 °C (1987 - 1997), com umidade relativa de 85 % (CORREIA; LIEBEREI, 1998). Os sítios de cultivo agrícola estão sob plantio de mandioca e compreendem uma área onde se desenvolve intensa atividade agrícola há pelo menos 30 anos.



Figura 1.8 - Estação Experimental do Caldeirão, Embrapa (03°26´ S, 60°23´ W), município de Iranduba, Amazonas, Brasil

As amostras de solo foram coletadas em pontos demarcados nos sítios de Terra Preta de Índio e seus respectivos solos adjacentes, em tubos PVC, na profundidade de 0 a 10 cm. Os pontos de coleta foram geo-referenciados (ponto central) e foram coletados mais quatro pontos ao redor de cada ponto central (norte, sul, leste e oeste), com distância de 1,5 metros entre cada ponto. Em seguida, foram coletadas 4 repetições de cada ponto, distantes 30 cm do ponto de coleta (Figura 1.9). Os tubos foram encaminhados ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura - USP, Piracicaba-SP), sob refrigeração, e mantidos uma parte em câmara fria (4°C) e outra em ultrafreezer a - 80°C (Tabela 1.1), para posterior análise de parâmetros físico-químicos e extração de ácidos nucleicos totais, respectivamente.



Figura 1.9 - Esquema de coleta de solos

Solos	Cobertura vegetal	Sigla
Terra Preta de Índio	Floresta Secundária	TPI FS
Terra Preta de Índio	Cultivado	TPI CULT
Adjacente	Floresta secundária	ADJ FS
Adjacente	Cultivado	ADJ CULT

Tabela 1.1 - Descrição das amostras de solo

As coletas foram realizadas em janeiro de 2009 e em janeiro de 2011. As amostras coletadas em janeiro de 2009 foram utilizadas nos estudos 1 e 2 e as amostras coletadas em janeiro de 2011 foram utilizadas no estudo 2 e 3.

REFERÊNCIAS

ARNETT, C.M.; PARALES, J.V.; HADDOCK, J.D. Influence of chlorine substituents on rates of oxidation of chlorinated biphenyls by the biphenyl dioxygenase of *Burkholderia* sp. strain LB400. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 66, n. 7, p. 2928–2933, 2000.

ATKINS, P.W.; JONES, L.L. **Princípios de química**: questionando a vida moderna e o meio ambiente. Porto Alegre: Editora Bookman, 2001. 914 p.

BAMFORTH, S.M.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, London, v. 80, n. 7, p. 723-736, 2005.

BEDARD, D.L.; HARBERL, M.L.; MAY, R.J.; BRENNAN, M.J. Evidence for novel mechanisms of polychlorinated biphenyl metabolism in *Alcaligenes eutrophus* H 850. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 53, p. 1103-1112, 1987b.

BENSON, D.A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; WHEELER, D.L. GenBank. **Nucleic Acids Research**, London, v. 33, p. 34-38, 2005.

BOYD, D. R.; SHARMA, N. D.; ALLEN, C. C. R. Aromatic dioxygenases: molecular biocatalysis and applications. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 12, p. 64-573, 2001.

CARREDANO, E.; KARLSSON, A.; KAUPPI, B.; CHOUDHARY, D.; PARALES, R. E.; PARALES, J. V.; LEE, K.; GIBSON, D. T.; EKLUND, H.; RAMASWAMY, S. Substrate binding site of naphthalene 1,2-dioxygenase: functional implications of indole binding. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 296, p. 701–712, 2000.

CERNIGLIA, C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 3, p. 351-368, 1992.

COCHRANE, T.T.; SÁNCHEZ, P.A. Land resources, soils and their management in the Amazon region: a state of knowledge report. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON AMAZONIAN AGRICULTURE AND LAND USE RESEARCH, 1982, Cali, Colombia. **Proceedings...** Cali: CIAT, 1982. p. 137-209. (CIAT Series 03E-3-82).

COLE, J.R.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; CGARRELL, D.M.; BANDELA, A.M.; CARDENAS, E.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The ribosomal database project (RDP-II): introducing *myRDP* space and quality controlled public data. **Nucleic Acids Research**, London, v. 35, p. 169-172, 2007.

CORREIA, F.W.S.; LIEBEREI, R. Agroclimatological information about the experimental Weld of the SHIFT-area, ENV 23, 42, 45, 52. In: SHIFT WORKSHOP, 3., 1998, Manaus. Berlin: BMBF, 1998. p. 389-396.

CURY, J.C. **Diversidade de** *Bacteria* e *Archaea* em solos de mangue e marisma. 2006. 147 f. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

De SANTIS JUNIOR, T.Z.; HUGENHOLTZ, P.; KELLER, K.; BRODIE, E.L.; LARSEN, N.; PICENO, Y.M.; PHAN, R.; ANDERSEN, G.L. NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. **Nucleic Acids Research**. London, v. 34, p.394-399, 2006a.

De SANTIS JUNIOR, T.Z.; HUGENHOLTZ, P.; LARSEN, N.; ROJAS, M.; BRODIE, E.L.; KELLER, K.; HUBER, T.; DALEVI, D.; HU, P.; ANDERSEN, G.L. Greengenes, a chimerachecked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 72, p. 5069–5072, 2006b

ELSHAHED, M.S.; YOUSSEF, N.H.; SPAIN, A.M.; SHEIK, C.; NAJAR, F.Z.; SUKHARNIKOV, L.O.; ROE, B.A.; DAVIS, J.P.; SCHLOSS, P.D.; BAILEY, V.L.; KRUMHOLZ, L.R. Novelty, uniqueness patterns of rare members of the soil biosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 74, p. 5422–5428, 2008.

FALESI, I.C. O estado atual dos conhecimentos sobre os solos da Amazônia Brasileira (Parte I) Zoneamento Agrícola da Amazônia. **Boletim Técnico IPEAN**, Belém, v. 54, p. 17-67, 1972.

FAO. World Reference Base for Soil Resources. Roma, 1998. 88 p. (World Soil Resources Report, 84).

FERREIRA, L.C. Aspectos bioquímicos e moleculares de bactérias isoladas de Terra **Preta Antropogênica (TPA) na região da Amazônia Brasileira.** 2007. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

FIGUEIREDO, L.H.M. **Investigação das contribuições orgânicas antrópicas e naturais em sedimentos costeiros utilizando-se hidrocarbonetos marcadores.** 1999. 149 p. Tese (Doutorado) – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

FRIES, M.R.; ZHOU, J.; CHEE-SANFORD, J.; TIEDJE, J.M. Isolation, characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 60, n. 8, p. 2802-2810, 1994.

GLASER, B. Prehistorically modified soils of central Amazonia: a model for sustainable agriculture in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, London, v. 362, p. 187–196, 2007.

GLASER, B.; HAUMAIER, L.; GUGGENBERGER, G.; ZECH, W. The "Terra Preta" phenomenon: a model for sustainable agriculture in the humic tropics. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 88, p. 37-41, 2001.

HABE, H.; OMORI, T; Genetics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism in Diverse Aerobic Bacteria. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. Tokyo, v. 67, p. 225-243, 2003.

HANDELSMAN, J.; SMALLA, K. Conversations with the silent majority. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 6, p. 271-273, 2003.

HARWOOD, C.S.; GIBSON, J. Sheeding light on anaerobic benzene ring degradation: a process unique to prokaryotes. **Journal of Bacteriology**, Washington, D.C., v. 179, p. 101-109, 1997.

IWAI, S.; CHAI, B.; SUL, W.J.; COLE, J.R.; HASHSHAM, S.A.; TIEDJE, J.M. Genetargeted-metagenomics reveals extensive diversity of aromatic dioxygenase genes in the environment. **The ISME Journal**, London, v. 4, p. 279-285, 2010.

JANSSEN, P.H. Identifying the dominant soil bacterial tax in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 72, p. 1719–1728, 2006.

JESUS, E.C. Bacterial diversity in soils from different land use systems of the western Brazilian Amazon. 2008. 155 p. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

KERN, D.C.; KÄMPF, N. O efeito de antigos assentamentos indígenas na formação de solos com terra preta arqueológica na Região de Oriximiná-PA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 13, p. 219-225, 1989.

KERN, D.C.; COSTA, M.L. Os solos antrópicos. In: LISBOA, P.L.B. (Org.). Caxiuanã. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1997. p. 105-119.

KERN, D.C.; D'AQUINO, G.; RODRIGUES, T.E.; FRAZÃO, F.J.L.; SOMBROEK, W.; NEVES, E.G. Distribution of Amazonian Dark Earths. In: LEHMAM, J.; KERN, D.C.; GLASER, B.; WOODS, W.I. (Ed.). Amazonian Dark Earths: Origin, properties & management. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 1-45.

KERN, D.C.; KAMPF, N.; WOODS, W.I.; DENEVAN, W.M.; COSTA, M.L.; FRAZAO, F.J.L. Evolução do conhecimento em Terra Preta de Índio. In: TEIXEIRA, W.G.; KERN, D.C.; MADARI, B.E.; LIMA, H.N.; WOODS, W. (Ed.). As Terras Pretas de Índio da Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009. p. 285-296.

KIM, J.S.; CROWLEY, D.E. Microbial diversity in natural asphalts of the Rancho La Brea Tar Pits. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 73, n. 14, p. 4579-4591, 2007.

KUMAMARU, T.; SUENAGA, H.; MITSUOKA, M.; WATANABE, T.; FURUKAWA, K. Enhanced degradation of polychlorinated biphenyls by directed evolution of biphenyl dioxygenase. **Nature Biotechnology**, New York, v. 16, n. 7, p. 663-666, 1998.

LIMA, A.B. Influência da cobertura vegetal nas comunidades de bactérias em Terra **Preta de Índio na Amazônia Central brasileira.** 2012. 116 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

LIMA, H.N.; SCHAEFER, C.E.R.; MELLO, J.W.V.; GILKES, R.J.; KER, J.C. Pedogenesis and pre-colombian land use of "Terra Preta Anthrosols" ("Indian black earth") of Western Amazonia. **Geoderma**, Amsterdam, v. 110, p. 1–17, 2002.

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

LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R. Microbial degradation of hydrcarbons in the environment. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 54, n. 3, p. 305-315, 1990.

LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GERMAN, L.; MCCANN, J.; MARTINS, G.C.; MOREIRA, A. Soil fertility and production potential. In: LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GLASER, B.; WOODS, W. (Ed.). Amazonian Dark Earths: origin, properties, management. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 105-124.

MA, Y.; WANG, L.; SHAO, Z. Pseudomonas, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 455-465, 2006.

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

McCANN, J.M.; WOODS, W.I.; MEYER, D.W. Organic matter and anthrosols in Amazonia: interpreting the Amerindian legacy. In: REES, R.M.; BALL, B.C.; CAMPBELL, C.D.; WATSON, C.A. (Ed.). Sustainable management of soil organic matter. Wallingford, UK: CAB International, 2001. p. 180-189.

OSBORN, A.M.; MOORE, E.R.B.; TIMMIS, K.N. An evaluation on terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 2, p. 39-50, 2000.

PARAMESWARAN, P.; JALILI, R.; TAO, R.; SHOKRALLA, S.; GHARIZADEH, B.; RONAGHI, M.; FIRE, A.Z. A pyrosequencing-tailored nucleotide barcode design unveils opportunities for large-scale sample multiplexing. **Nucleic Acids Research**, London, v. 35, e.130, 2007.

RODRIGUES, T.E. Solos da Amazônia. In: ALVAREZ, V.H.; FONTES, L.E.F.; FONTES, F.M.P. (Ed.). O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado. Viçosa: SBCS, 1996.

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

RONAGHI, M.; KARAMOHAMED, S.; PETTERSSON, B.; UHLEN, M.; NYREN, P. Realtime DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 242, p. 84–89, 1996.

RONAGHI, M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. Genome Research, Cold Spring Harbor, v. 11, p. 3-11, 2001.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D. Molecular microbial ecology: a minireview. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, p. 135-147, 1997.

SENTCHILO, V.S.; PEREBITUK, A.N.; ZEHNDER, A.J.; VAN DER MEER, J.R. Molecular diversity of plasmids bearing genes that encode toluene and xylene metabolism in *Pseudomonas* strains isolated from different contaminated sites in Belarus. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 66, n. 7, p. 2842-52, 2001.

SCHIPPER, L.A.; DEGENS, B.P.; SPARLING, G.P.; DUNCAN, L.C. Changes in microbial heterotrophic diversity along five plant successional sequences. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 2093-2103, 2001.

SMETS, B.F.; RITTMANN, B.E.; STAHL, D.A. The specific growth rate of Pseudomonas putida PAW1 influences the conjugal transfer rate of the TOL plasmid. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 59, n. 10, p. 3430-3437, 1993.

SILVA, M.G.G. **Diversidade funcional em solos de Terra Preta de Índio da Amazônia e carvão pirogênico**. 2011. 187 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

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

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

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

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing SONS, a tool for operational taxonomic unit-based comparisons of microbial community memberships and structures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 72, p. 6773-6779, 2006b.

SCHLOSS, P.D.; LARGETE, B.R.; HANDELSMAN, J. Integration of Microbial Ecology and Statistics: a Test to Compare Gene Libraries. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, p. 5485-5492, 2004.

SOMBROEK, W.G.; RUIVO, M.L.; FEARNSIDE, P.M.; GLASER, B.; LEHMANN, J. Amazonian Dark Earths as carbon stores and sinks. In: LEHMAM, J.; KERN, D.C.; GLASER, B.; WOODS, W.I. (Ed.). Amazonian Dark Earths: origin, properties & management. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 125-139.

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

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

TØRSVIK, V.; ØVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 5, p. 240-245, 2002.

VAN ELSAS, J.D.; TREVORS, J.T. **Modern soil microbiology**. New York: Marcel Dekker, 1997. 683 p.

VOGEL, T.M.; SIMONET, P.; JANSSON, J.K.; HIRSCH, P.R.; TIEDJE, J.M.; VAN ELSAS, J.D.; BAILEY, M.J.; NALIN, R.; PHILIPPOT, L. TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 7, p. 252, 2009.

WACKETT, L.P. Evolution of enzymes for the metabolism of new chemical inputs into the environment. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, p. 41259-41262, 2004.

WHITMAN, W.B.; COLEMAN, D.C.; WIEBE, W.J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 95, p. 6578-6583, 1998.

WILSON, M.S.; BAKERMANS, C.; MADSEN, E.L. *In situ*, Real-Time Catabolic Gene Expression: extraction and characterization of naphthalene dioxygenase mRNA Transcripts from Groundwater. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 65, p. 80-87, 1999.

WOODS, W.I.; MCCANN, J.M. The anthropogenic origin and persistence of Amazonian dark earths. In: **The Yearbook of the Conference of Latin American Geographers**, Austin. University of Texas, 1999. p.7-14.

2 Isolamento e caracterização genética de bactérias potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos em solos de Terra Preta de Índio e seus adjacentes

RESUMO

A diversidade e atividade microbiana em ecossistemas como o solo são de fundamental importância para a manutenção de suas condições físicas, químicas e biológicas. Isso se dá principalmente pelo fato dos microrganismos exercerem diferentes papéis na interação com diferentes fatores bióticos e abióticos do sistema. Alguns pontos da atividade microbiana a serem destacados são ciclagem de nutrientes (decomposição de matéria orgânica, solubilização de fosfato, metanogênese, metanotrofia, fixação biológica de nitrogênio, desnitrificação), inibição de patógenos (produção de biocompostos, produção de enzimas, competição por nichos e nutrientes) e biodegradação (mineralização de resíduos agrícolas e industriais). O objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar geneticamente bactérias potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos em solos de dois sítios de Terra Preta de Índio (TPI) e seus sítios adjacentes (ADJ). Para isto, utilizou-se uma combinação de métodos dependentes de cultivo, como o isolamento de bactérias e seu uso em bioensaios de degradação, juntamente com técnicas moleculares aplicadas à classificação taxonômica destes isolados, por meio da detecção e sequenciamento do gene que codifica para a subunidade 16S do RNA ribosomal (rRNA). Foram obtidos 188 isolados potencialmente degradadores de hidrocarbonetos aromáticos, de acordo com o biensaio de degradação com o corante DCPIP. Gêneros bacterianos como Pseudomonas e Burkolderia, os quais são comumente encontrados em amostras de solos, além de serem referências como degradadores de hidrocarbonetos, foram encontrados em todos os quatro solos analisados. Alguns gêneros foram exclusivos de cada sítio, o que mostra uma diferença na comunidade bacteriana de acordo com o tipo de solo (TPI e ADJ) e suas coberturas vegetais (floresta secundária e cultivo agrícola). Neste contexto, amostras de solo dos sítios de TPI apresentaram maior quantidade e diversidade de isolados potencialmente degradadores, quando comparado às amostras de solo dos sítios ADJ. Isto demonstra o potencial das bactérias dos solos de TPI para processos de importância biotecnológica. As características singulares destes solos podem favorecer o desenvolvimento de novas vias metabólicas para ações de biorremediação e biodegradação de ambientes impactados.

Palavras-chave: Bacteria. Bioensaios. Hidrocarbonetos. Biodegradação.

ABSTRACT

Microbial diversity and activity in ecosystems such as soils are extremely important for the maintenance of their physical, chemical and biological properties. This occurs mainly by the different roles played by the soil microbiota during their interactions with biotic and abiotic factors of the system. Microbes are able to influence in a variety of ecosystem processes and services such as nutrient cycling (decomposition of organic matter, phosphate solubilization, methanogenesis, methanotrophy, biological nitrogen fixation, denitrification), inhibition of pathogens (biocompost production, enzyme production, nutrient and niche competition) and biodegradation (processing organic and inorganic input released by agricultural and industrial activities). The aim of this study was to isolate and genetically characterize potentially hydrocarbon degrading bacteria in soils from two sites of Anthropogenic Dark Earths (ADE) and its adjacent sites (ADJ). In this study it was used a combination of culture-dependent methods such as bacterial isolation and their use in bioassays of degradation, and molecular techniques applied to taxonomical affiliation of the obtained isolates, by the detection and sequencing of the gene 16S rRNA. It was obtained a total of 188 potentially hydrocarbons degrading isolates, according to the DCPIP degradation bioassay. Bacterial genera such as Pseudomonas and Burkholderia, which are commonly found in soil samples, as well as described as hydrocarbons degrading bacteria, were found in all four sites. Some other bacterial genera were unique to each site, which shows a difference in the bacterial communities according to soil type (ADE and ADJ) and its use (secondary forest and agricultural cultivation). In this context, ADE soils showed a higher amount and diversity of potentially degrading isolates, when compared to ADJ sites. This highlights for the potential of bacteria in ADE soils possibly extending to their application in biotechnological processes. The quite unique nature of these soils may favor the development of new metabolic pathways from microorganisms capable of competitive bioremediation and biodegradation actions of impacted environments.

Keywords: Bacteria. Bioassays. Hydrocarbons. Biodegradation.

2.1 Introdução

Os hidrocarbonetos aromáticos (HAs) não são degradados pela maioria dos microrganismos presentes no solo, em virtude da sua complexidade de estrutura química, além da baixa solubilidade em água (BAMFORTH; SINGLETON, 2005). Porém, alguns microrganismos podem apresentar alta eficácia na degradação de hidrocarbonetos e atualmente, estudos listam 79 gêneros de bactérias capazes de utilizar hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia, assim como 103 diferentes espécies fúngicas, capazes de degradar hidrocarbonetos (HEAD et al., 2006). Grande parte do nosso conhecimento sobre a diversidade intra-espécie de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos é baseada em apenas os mais alguns gêneros, geralmente abundantes. tais como Pseudomonas (BHATTACHARYA et al., 2003), Burkholderia (GORIS et al., 2004), Acinetobacter (WHYTE et al., 1997), Sphingomonas (LEYS et al., 2004), Mycobacterium (LEYS et al., 2005) e Rhodococcus (IRVINE et al., 2000).

O primeiro isolamento de bactérias com potencial de degradação de hidrocarbonetos foi realizado há cerca de um século, e até recentemente, pouco tem sido explorado sobre o cultivo e caracterização fisiológica destes organismos, os quais podem apresentar um amplo potencial de degradação de hidrocarbonetos policíclicos ou monocíclicos (NAIR et al., 2008). Para a seleção dos microrganismos com comprovada capacidade de degradação destes compostos, faz-se necessário fornecer condições adequadas de disponibilidade de água, nutrientes inorgânicos, pH e temperatura. Os microrganismos degradadores utilizam vias bioquímicas complexas para transformar os HAs em intermediários comuns do seu catabolismo e, a partir daí, em fonte de carbono e energia para o seu crescimento (BAMFORTH; SINGLETON, 2005).

A variabilidade química apresentada pelos hidrocarbonetos demanda uma elevada diversidade metabólica dos microrganismos presentes neste sistema. Assim sendo, a versatilidade metabólica e adaptabilidade genética, são parâmetros fundamentais para a dinâmica destas comunidades no ambiente as quais constituem uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e possivelmente para a contribuição do desenvolvimento sustentável.

Os microrganismos também são importantes por participarem dos ciclos biogeoquímicos, dos quais muitos aspectos ainda são pouco conhecidos. As atividades da microbiota do solo são essenciais para a ciclagem da matéria orgânica, para a redução do enxofre, para a nitrificação e fixação biológica do N₂, entre outros processos que podem contribuir para a alteração da disponibilidade de nutrientes e elementos tóxicos no solo. Nesse sentido, novos isolados bacterianos e novas vias metabólicas microbianas são constantemente descritas, e contribuem para um melhor entendimento da dinâmica dos ciclos do C, N, Fe, Mn e As (NEUBAUER et al., 2002; OREMLAND; STOLZ, 2003).

Analisando a importância dos microrganismos potencialmente degradadores de hidrocarbonetos e também aqueles envolvidos na ciclagem de nutrientes como o carbono, este estudo teve como objetivo isolar e caracterizar taxonômicamente isolados bacterianos potencialmente degradadores de hidrocarbonetos em solos de Terra Preta de Índio da Amazônia, e seus solos adjacentes, ambos sob diferentes coberturas da terra (Floresta secundária e agricultura). Foi utilizada uma combinação de métodos dependentes de cultivo, como o isolamento tradicional, juntamente com técnicas moleculares aplicadas na classificação taxonômica das bactérias isoladas do ambiente (i.e. sequenciamento e análise de sequências 16S rRNA). O potencial de degradação de hidrocarbonetos foi inicialmente verificado através de bioensaio com o descolorante DCPIP, o qual revela, através da mudança de sua coloração, reações de óxido-redução. Estes dados podem gerar informações sobre a medida da participação destes microrganismos na manutenção solos de TPI, também sobre a diversidade de bactérias potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos nestes solos, além de suprir algumas informações sobre a estabilidade da matéria orgânica e sua influência na conservação das características físicas e químicas favoráveis à agricultura sustentável na região amazônica.

2.2 Objetivos

Isolar e identificar bactérias de solos de sítios de Terra Preta de Índio e seus adjacentes, a fim de verificar o potencial de degradação de hidrocarbonetos aromáticos por estes microrganismos, através da análise de suas atividades enzimáticas por meio da realização de bioensaios.

2.3 Materiais e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, CENA/USP, Piracicaba-SP.

2.3.1 Áreas de estudo

A descrição detalhada das áreas de estudo e amostragem estão disponíveis na seção 1.4 Materiais e Métodos, subseção 1.4.2 Áreas de estudo e amostragem (página 35, capítulo 1). Brevemente, a área de estudo está localizada na Embrapa Amazônia Ocidental (Estação Experimental do Caldeirão, Iranduba, AM). Para acessar bactérias potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos em sítios de TPI e seus respectivos sítios ADJ foi selecionado um sítio sob floresta secundária (FS) e outro sob plantio de mandioca (CULT) para cada sítio (TPI e ADJ). A coleta para este estudo foi realizada em janeiro de 2009.

2.3.2 Caracterização do solo

As amostras de solo coletadas em janeiro de 2009 foram analisadas pelo laboratório de análises de solo e planta (LASP), localizado na EMBRAPA Amazônia Ocidental, sob responsabilidade do Dr. Wenceslau Teixeira, em março de 2009. Foram realizadas análises em triplicatas para cada amostra de solo (a coleta foi realizada com geo-referenciamento, foram escolhidas três amostras para cada ponto, sendo os pontos, norte, sul, leste, oeste e central, para cada sítio). As amostras foram analisadas em relação ao pH (pH em água, relação 1:2,5), teores de P, Na, K, Fe, Zn, Mn, Cu (solução dupla de ácido sulfúrico a 0,025 M e ácido clorídrico a 0,05 M, Extrator Mehlich-1), tores de Ca e Mg (extrator KCl 1 mol.L⁻¹), H+Al (extrator de cálcio 0,5 mol.L⁻¹, pH 7,0), Soma de Bases Trocáveis (SB), matéria orgânica (M.O.), carbono orgânico do solo (C) (método Walkely-Black), índice de saturação por bases (V), índice de saturação por alumínio (m), capacidade de troca de cátions efetiva (t) e capacidade de troca de cátions a pH 7,0 (T).

2.3.3 Isolamento de microrganismos

Para isolamento de microrganismos foram feitas diluições seriadas das amostras de solo de todos os sítios (TPI FS, TPI CULT, ADJ FS e ADJ CULT), em solução salina (de 10^{-1} a 10^{-6}). Parte do isolamento foi realizada em meio seletivo para crescimento de espécies pertencentes aos gêneros *Burkholderia e Pseudomonas* (meio PCAT; Tabela 2.1), citadas na literatura como bactérias com potencial de degradação (SENTCHILO et al., 2001; SMETS et al., 1993; MA; SHAO, 2006) e a outra parte foi realizada em meio não seletivo (meio comercial Caso-agar, *Casein-peptone Soymeal-peptone Agar*, DifcoTM; Tabela 2.2) a fim de obter outros filotipos que também possam ter potencial de biodegradação. Após o crescimento de colônias, as mesmas foram repicadas em meio Caso-agar, através de estria cruzada, a fim de obter a purificação das mesmas (Figura 2.1).

Componentes	g.L ⁻¹
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,2
Ácido azelaico	2,0
Triptamina	0,2
Dihidrogenofosfato de potássico	4,0
Hidrogenofosfato de dipotássio	4,0
Extrato de levedura	0,02
Ágar	15,0

Tabela 2.1 - Composição do meio PCAT

Tabela 2.2 - Composição do meio Casein-peptone Soymeal-peptone Agar, Difco™

Componentes	g.L ⁻¹
Peptona de caseína	15,0
Peptona de soja	5,0
Cloreto de sódio	5,0
Ágar	15,0



Figura 2.1 - Isolamento de bactérias e purificação de colônias

2.3.4 Extração de DNA genômico total dos isolados

O DNA genômico total bacteriano dos isolados obtidos em ambos isolamentos (meio PCAT e meio Caso) foi extraído segundo metodologia descrita por Stirling et al. (2003), e a quantidade e qualidade de DNA de cada amostra foi verificada em eletroforese em gel de agarose a 1,0 %. A pureza do DNA foi verificada após coloração com brometo de etídio (0,5 μ g.mL⁻¹ gel), e como padrão de peso molecular foi utilizado o *Low Mass Ladder*TM (Invitrogen Life Technologies). Finalmente foi feita a diluição do material para uma concentração final de 50 ng. μ L⁻¹, que foi utilizada posteriormente nas reações de PCR.

2.3.5 Teste de biodegradação utilizando o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP)

O bioensaio de biodegradação teve como principal objetivo selecionar bactérias potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos. Os hidrocarbonetos aromáticos utilizados nos testes foram: naftaleno, fenatreno e bifenil. Os testes foram realizados a partir da técnica baseada no indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) (HANSON et al., 1993, modificada) para os microrganismos isolados. O princípio deste teste se apoia no fato de que durante a oxidação microbiana dos hidrocarbonetos, elétrons são transferidos até aceptores como oxigênio, nitrato e sulfato. Ao incorporar um aceptor de

elétron como o DCPIP ao meio de cultura, é possível verificar a capacidade dos microrganismomicrorganismos em utilizar hidrocarbonetos como substrato pela observação da mudança de cor do DCPIP de azul (oxidado) para incolor (reduzido). Desta forma, esperase selecionar microrganismomicrorganismos que possuam no genoma os genes catabólicos responsáveis por processos de biodegradação.

Os microrganismos isolados utilizados no teste foram inicialmente incubados em tubos de 15 mL contendo meio de cultura mínimo Bushnell-Haas (Difco[™]) (Tabela 2.3), a 30 °C por 24 horas. Após o crescimento, os microrganismos foram padronizados à turvação do tubo nº. 3 de acordo com a fórmula nefelométrica de Mc Farland (LENNETTE et al., 1985). Também foram utilizados isolados de culturas, que segundo a literatura, são de microrganismomicrorganismos padrões de biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos, adquiridos do germoplasma alemão DSMZ (German Resource Centre for Biological Material, disponível em http://www.dsmz.de/index.htm) (Tabela 2.4) a fim de testar a eficiência do teste. O experimento foi realizado em placas de acrílico (Tipo ELISA) com 96 poços, e possuiu um controle positivo (meio mínimo, glicose e suspensão de microrganismos), um controle negativo (meio mínimo e suspensão de microrganismos) e os bioensaios com os isolados (meio mínimo, suspensão de microrganismos e hidrocarbonetos). Nos bioensaios, 20µL da solução padronizada de cada inóculo foram adicionados a 170 ou 174 μ L de meio de cultura mínimo BH, 6 μ L de DCPIP (2,6 diclorofenol-indofenol a 0,2 %, diluído em água) e 4µL de bifenil (2,5 %, diluído em acetona) ou 4µL fenantreno (2,5 %, diluído em acetona) ou 2µL de naftaleno (5 %, diluído em acetona) (Figura 2.2). As placas foram incubadas com agitação, a 30 °C e a leitura positiva foi registrada pela descoloração do DCPIP após 24 horas.

Componentes	g.L ⁻¹
Sulfato de magnésio	0,2
Cloreto de cálcio	0,02
Fosfato monopotássico	1,0
Fosfato de amônia	1,0
Nitrato de postássio	1,0
Cloreto férrico	0,05

Tabela 2.3 - Composição do meio mínino BH - Bushnell-Haas (DifcoTM)

DSMZ nº	Microrganismos	Metabolismo de hidrocarbonetos
DSM 6506	Pseudomonas fluorescens	Utiliza naftaleno (fonte de carbono)
DSM 291	Pseudomonas putida	Degrada compostos aromáticos
DSM 8369	Pseudomonas fluorescens	Utiliza fenol e naftaleno (fonte de carbono)
DSM 6899	Pseudomonas putida	Utiliza tolueno (fonte de carbono)

Tabela 2.4 - Microrganismos padrões de biodegradação (DSM)





Figura 2.2 - Esquema representativo do bieonsaio de biodegradação de hidrocarbonetos com DCPIP

2.3.6 Análise dos dados obtidos pelo bioensaio com DCPIP

Através dos bioensaios de DCPIP foi possível analisar o potencial de biodegradação das bactérias isoladas dos quatro sítios analisados. Essa avaliação foi feita visualmente após 24 horas de incubação da cultura, com os hidrocarbonetos selecionados (naftaleno, fenantreno e bifenil). Ao incorporar um aceptor de elétron como o DCPIP ao

meio de cultura, é possível averiguar a capacidade dos microrganismos em utilizar hidrocarbonetos como substrato através da mudança de cor do DCPIP de azul (oxidado) para incolor (reduzido). Os isolados com potencial de biodegradação realizaram a oxidação dos hidrocarbonetos a partir da transferência de elétrons até aceptores como oxigênio, nitrato e sulfato. Desta forma, foram selecionados os microrganismos que demonstraram a capacidade de biodegradar pelo menos um dos três hidrocarbonetos testados. Para a avaliação dos resultados obtidos foi calculada a quantidade de microrganismos potencialmente degradadores, assim como a verificação de quais hidrocarbonetos cada isolado foi capaz de degradar.

2.3.7 Amplificação por PCR do gene 16S rRNA dos isolados positivos no bioensaio

Para a classificação dos isolados que se mostraram positivos na degradação de pelo menos um dos hidrocarbonetos testados, foi realizada a amplicação com *primers* específicos fD1 e rD1 (Tabela 2.5.), que amplificam em torno de 1500 pares de bases do gene 16S rRNA de bactérias, segundo Weisburg et al. (1991). As reações de PCR foram realizadas contendo dNTPs (0,2 mM de cada base); tampão 10X (1X); MgCl₂ (1,5 mM); Taq DNA polimerase (1,5 U); os *primers* (5 pmol.reação⁻¹); DNA (40 ng.reação⁻¹), e água ultra pura estéril (Milli-Q) para volume final de 25 µL. O programa de amplificação consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos, seguido de um ciclo de extensão final de 72 °C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1 %, com padrão de peso molecular *100 pb DNA Mass Ladder*TM (Invitrogen Life Technologies).

Primer	(5'-3')	Referência
fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	WEISBURG et al. (1991)
rD1	AAGGAGGTGATCCAGCC	

Tabela 2.5 - Primers utilizados para detecção e sequenciamento do gene 16S rRNA.

2.3.8 Purificação dos produtos de PCR

Os fragmentos amplificados foram submetidos à purificação com isopropanol e etanol, para precipitação de impurezas, ressupendidos em água ultra-pura (Milli-Q) e quantificados em gel de agarose a 1,0 % utilizando o marcador de peso molecular *Low Mass Ladder*TM (Invitrogen Life Technologies) para verificação do rendimento da purificação.

2.3.9 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Para o sequenciamento, 1 µL do produto purificado (aproximadamente 20 ng) foi utilizado na reação de amplificação com o *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (GE Healthcare) conforme instruções do fabricante, e o *primer* utilizado para amplificação parcial do gene-alvo foi o fD1. As reações de sequenciamento foram feitas nas seguintes condições: 30 ciclos com desnaturação a 95 °C por 20 segundos, anelamento do primer a 55 °C por 15 segundos, seguidos de uma extensão final a 60 °C por 1 minuto.

Após as reações de sequenciamento, as amostras foram purificadas adicionando-se $2 \mu L$ de uma solução de acetato de sódio a 1,5 M, EDTA a 0,25 M e, após homogeneização, adicionou-se 60 μL de etanol 100 %. As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 45 minutos em temperatura ambiente, e o sobrenadante foi descartado por inversão da placa. Adicionou-se 150 μ l de etanol a 70 % e a mistura foi homogeneizada e centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e os precipitados foram colocados no concentrador de DNA por 10 min para evaporação completa do etanol remanescente. Em seguida, os produtos foram eluídos em 10 μ L de formamida e sequenciados em sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

2.3.10 Processamento de dados e identificação filogenética dos isolados

A análise das sequências foi feita com base nos eletroferogramas gerados pelo *software* Sequencing Analysis 3.0. As sequências nucleotídicas obtidas tiveram seus cromatogramas analisados pelo *software* RDP (<u>http://rdp.cme.msu.edu/</u>) que realizou a triagem por qualidade e por meio da remoção das bases com baixa qualidade. O nível de exigência mínimo foi de 400 bases com qualidade acima de 20 (um erro a cada 100 bases lidas). Em seguida, as sequências foram comparadas com aquelas disponibilizadas no banco de dados *GenBank* do (NCBI), utilizando-se o programa *Nucleotide Blast* (BlastN) (ALTSCHUL et al., 1990), para identificação do isolados bacterianos.

2.4 Resutados e discussões

2.4.1 Coleta e caracterização dos solos

As amostras de solo foram coletadas nos quatro sítios analisados no presente trabalho, na profundidade de 0-10 cm, uma vez que nesta profundidade ocorre a maioria das reações bacterianas dependentes de oxigênio, como a biossíntese e biodegradação de moléculas. Todos os sítios estão situados na região de Manaus, na Amazônia Central. Cada solo (TPI e ADJ) apresenta distintos sistemas de uso da terra, caracterizados principalmente por agricultura (cultivo de mandioca) e floresta secundária. Após a coleta, as amostras foram enviadas ao Laboratório de análises de solo e planta (LASP), localizado na EMBRAPA Amazônia Ocidental, para a análise química do solo (Tabela 2.6). Com estes dados foi realizada uma Análise de Componetes Principais (PCA), a fim de verificar relações entre os solos de acordo com seus atributos químicos (Figura 2.3).

Tabela 2.6 - Caracterização química das amostras de solo dos sítios de TPI a ADJ

Amostra	pН	С	М.О,	Р	K	Na	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	t	Т	V	m	Fe	Zn	Mn	Cu
TPIFSC	4,45	39,80	68,46	175	87	6	10,41	1,43	0,19	8,34	12,9	13,28	23,42	51,61	0,96	24	10,06	102,94	1,37
TPIFSPN	5,13	31,74	54,59	135	73	3	9,72	1,34	0,03	7,85	11,26	11,29	19,11	58,91	0,27	26	15,98	98,78	1,57
TPIFSS	5,57	38,96	67,02	143	59	4	11,33	1,50	0,00	7,56	13,00	13,00	20,56	63,24	0,00	27	14,77	123,00	1,51
TPIFSL	5,51	36,35	55,33	143	70	3	6,1	1,44	0,00	6,20	7,63	7,63	13,83	55,15	0,00	22	16,85	75,41	1,11
TPIFSO	5,03	34,07	58,61	101	61	4	8,55	0,98	0,09	8,30	9,70	9,79	18,00	53,90	0,92	34	10,03	105,93	1,09
TPICULTC	5,41	28,23	48,55	243	42	5	7,85	1,57	0,04	8,75	9,55	9,59	18,29	52,20	0,42	25	19,74	70,72	1,67
TPICULTN	5,32	27,53	47,35	148	25	3	7,52	1,33	0,04	8,27	8,93	8,97	17,19	51,92	0,45	24	14,58	53,1	1,18
TPICULTS	5,42	25,48	43,82	227	35	9	7,77	1,16	0,03	8,46	9,06	9,09	17,52	51,70	0,33	35	20,52	44,08	2,31
TPICULTL	5,24	34,35	49,09	144	48	3	10,3	1,42	0,03	6,91	11,66	11,69	18,58	62,78	0,26	26	14,26	53,71	1,11
TPICULTO	5,74	25,48	43,82	231	32	3	8,24	2,00	0,00	6,85	10,33	10,33	17,18	60,15	0,00	25	18,97	52,75	1,70
ADJFSC	3,53	35,87	41,70	9	35	4	0,64	0,25	2,27	12,26	1,00	3,27	13,26	7,52	69,48	307	0,70	3,77	0,08
ADJFSN	3,71	31,86	44,80	7	44	5	0,69	0,29	2,06	13,07	1,14	3,20	14,21	8,03	64,37	334	0,70	6,93	0,04
ADJFSS	3,71	34,41	49,19	9	42	6	0,84	0,51	2,02	13,58	1,55	4,57	16,13	5,82	44,18	271	1,32	6,95	0,07
ADJFSL	3,48	25,14	43,24	10	30	6	0,15	0,13	2,11	10,97	0,38	2,49	11,36	3,37	84,64	286	0,36	2,46	0,11
ADJFSO	3,52	30,99	36,10	5	25	5	0,41	0,14	1,97	9,27	0,66	2,63	9,93	6,66	74,85	341	0,65	2,73	0,09
ADJCULTC	4,47	16,16	27,79	4	21	2	0,73	0,51	1,77	6,55	0,30	2,07	7,85	6,58	77,15	217	0,38	1,74	0,09
ADJCULTN	3,75	16,06	27,62	3	25	1	0,03	0,06	1,70	7,03	0,16	1,86	7,19	2,20	91,48	198	0,32	1,25	0,08
ADJCULTS	3,56	17,58	30,23	7	32	2	0,09	0,08	1,93	7,74	0,26	2,19	8,00	3,26	88,11	216	0,90	1,89	0,02
ADJCULTL	3,74	19,51	33,56	8	34	2	0,37	0,15	1,53	8,23	0,64	2,17	8,87	7,23	70,47	227	0,54	2,37	0,10
ADJCULTO	3,91	18,91	32,53	4	36	2	0,44	0,30	1,43	8,27	0,87	2,3	9,13	9,49	62,27	228	0,77	2,31	0,09

A Análise de Componentes Principais (PCA) realizada com os dados químicos do solo revelou agrupamentos distintos para os quatro sítios estudados, onde se observa que de maneira geral, o primeiro eixo da análise explica quase toda a variação dos dados (94,7 %), e que as amostras se separaram de acordo o tipo de solo (Terra Preta x Adjacente), onde todas as amostras de solo de Terra Preta se agruparam no lado direito do plote, e todas as amostras de solo Adjacente se agruparam no lado esquerdo. Os dois sítios adjacentes ficaram próximos entre si, mostrando que não houve influência da cobertura vegetal nos elementos químicos do solo. Já os sítios de Terra Preta ficaram separados entre si, evidenciando uma influência da cobertura vegetal nos elementos químicos do solo.

A análise de PCA tornou bastante evidente que as amostras dos sítios ADJ se mostraram mais correlacionadas com os teores de Alumínio Trocável e acidez potencial (Al e H+Al), enquanto que as de TPI se mostraram mais correlacionadas com os outros elementos avaliados.

Entre os sítios de TPI, o sítio de Floresta secundária apresentou maiores teores de matéria orgânica (MO) e potássio (K) do que o sítio com cultivo agrícola. Como esperado, os sítios de TPI apresentaram maiores valores de pH, evidenciando sua característica de que os solos TPI são menos ácidos do que seus solos ADJ.

As amostras de solo de sítios de TPI apresentaram valores maiores de cálcio (Ca), CTC, soma de bases (SB), e fósforo (P) quando comparadas com as amostras dos sítios ADJ. Elevados valores de P em solos TPI podem estar associados à presença de ossos, além de atividades de queima da vegetação, comuns entre as populações que ocuparam estes sítios arqueológicos. Existe uma relação direta entre os teores de P total e a CTC potencial nas camadas superiores de solos de TPI, podendo ser explicada por uma redução na adsorção de P, causada pela formação de complexos com a matéria orgânica. Este fenômeno ocorre em menor intensidade nas camadas mais profundas, onde os teores de matéria orgânica são menores (FALCÃO et al., 2009).

Os valores elevados da CTC não acontecem somente em função do alto teor de material orgânico presente, mas também devido a uma maior densidade de cargas por unidade de carbono (LIANG et al., 2006). Esta propriedade do carbono orgânico é específica para solos como TPI, com alto conteúdo de carvão pirogênico, que possui a propriedade de reter mais nutrientes, por apresentar maior superfície específica que o carvão resultante da queima da

madeira em temperaturas mais elevadas, e por possuir maior densidade de carga negativa por unidade de área superficial (GLASER et al., 2001; LIANG et al., 2006; CUNHA et al., 2009). Adicionalmente, outras variáveis como a soma de bases (SB) e a saturação por bases (V), apresentam valores mais altos em solo TPI quando comparados com os solos ADJ.

As amostras dos sítios ADJ se mostraram mais correlacionados e com maiores teores de Al e H+Al. Estes dados são relevantes no contexto da Amazônia brasileira, onde cerca de 80 % dos solos de terra firme (Latossolos e Argissolos) são caracterizados por apresentar baixa concentração de bases trocáveis, minerais de argila de baixa atividade, como a caulinita, e óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio, além de baixa disponibilidade de fósforo, elevada acidez e, consequentemente, maior concentração de Al trocável e, em certos casos, manganês, ambos tóxicos para a maioria das plantas (SANCHEZ et al., 1983). Ainda assim, o fator mais importante na nutrição da flora e fauna no sistema do solo parece estar relacionado com a concentração de nutrientes, altamente favorecida em solos TPI, cujo fluxo está intimamente relacionado com a assimilação por plantas e os processos de mineralização microbiana.



Figura 2.3 - Análise de Componentes Principais baseada nos elementos químicos dos solos

2.4.2 Isolamento dos microrganismos do solo

Foram isolados microrganismos dos quatro sítios estudados, em meio seletivo para crescimento de microrganismos pertencentes aos gêneros *Burkholderia* e *Pseudomonas* (meio PCAT) e a outra parte foi realizada em meio não seletivo (meio comercial Caso-agar, *Casein-peptone Soymeal-peptone Agar*, Difco[™]) a fim de obter outros filotipos que também possam ter potencial de biodegradação. As placas com colônias isoladas em ambos os meios, foram separadas para retirada das colônias com auxílio de alça de platina; estas colônias foram transferidas para novas placas, onde foram espalhadas por esgotamento na superfície do meio sólido, para verificação de possíveis contaminações e purificação das colônias (Figura 2.4).



Figura 2.4 - Culturas purificadas em meio sólido

Foi obtido um total de 283 isolados para todos os sítios (Tabela 2.7). As culturas obtidas foram crescidas em meio líquido para produção de bancos de germoplasma, armazenando-as com glicerol a 50 % em ultrafreezer a -80°C. Todos os isolados foram utilizados nos bioensaios de biodegradação. Aqueles que apresentaram potencial de degradação de pelo menos um, dos três hidrocarbonetos testados, foram considerados positivos e posteriormente sequenciados.

Sítio	Meio PCAT	Meio Caso	Total isolados
TPI FS	8	64	72
TPI CULT	3	59	62
ADJ FS	7	73	80
ADJ CULT	8	61	69
Total isolados	26	257	283

Tabela 2.7 - Quantidade de isolados obtidos em cada um dos quatro diferentes sítios analisados

2.4.3 Extração de DNA genômico total dos isolados

O DNA dos isolados positivos nos bioensaios foi extraído com sucesso após crescimento das culturas em meio liquído, apresentando ótima qualidade e elevada quantidade, cujas concentrações para cada amostra variaram em torno de 60 a 100 ng. μ L⁻¹ (Figura 2.5).



Figura 2.5 - Gel resultante da extração do DNA genômico de alguns isolados. Padrão de peso molecular: *Low Mass Ladder*TM (Invitrogen Life Technologies)

2.4.4 Teste de biodegradação utilizando o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP)

O bioensaio de biodegradação teve como principal objetivo selecionar bactérias potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos e foi realizado utilizando os 283 isolados selecionados previamente, além de quatro estirpes padrão de biodegradação da DSMZ (já citadas anteriormente). Os bioensaios testaram os isolados quanto ao potencial de biodegradação dos hidrocarbonetos naftaleno, fenantreno e bifenil.

O DCPIP é um receptor de elétrons em reações químicas e possibilita a verificação do potencial degradativo de forma visual, sendo que a coloração azul inicial no teste tende a ficar transparente quando há biodegradação.

Primeiramente, o bioensaio com DCPIP foi realizado somente com as estirpes padrões, e com os hidrocarbonetos naftaleno e fenantreno e foi feito em maior escala, utilizando Erlenmeyers. A partir da análise visual dos testes (Figura 2.6) foi possível verificar que todas as estirpes padrões apresentaram biodegradação de naftaleno e fenantreno.



Figura 2.6 - Bioensaio com DCPIP para verificar potencial de degradação de naftaleno e fenantreno por microrganismos padrão DSM (A. tempo = 0 horas e B. tempo = 24 horas – DSMZ 6506; C. tempo = 0 horas e D. tempo = 24 horas – DSM 291; E. tempo = 0 horas e F. tempo = 48 horas – DSM 6899; G. tempo = 0 horas e H. tempo = 48 horas – DSM 8369). Sendo: CN – controle Negativo, N – naftaleno, F – fenantreno, CP – controle positivo

Após o teste inicial com as estirpes padrões, foram realizados testes em placas de ELISA (de acordo com o procedimento detalhado na seção 2.3 Materiais e métodos, subseção 2.3.5 Teste de biodegradação utilizando o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) deste capítulo, pág. 52) para todos os isolados selecionados.

O resultado dos bioensaios tem como base a análise visual dos testes. Após 24 horas é possível perceber se houve a degradação do hidrocarboneto pela descoloração do corante DCPIP.

A partir desta análise visual (Figuras 2.7, 2.8, 2.9, 2.20, 2.11 e 2.12), foi possível verificar que os isolados com potencial de degradação para naftaleno foram: 25 isolados de TPI FS; 15 isolados de TPI CULT; 16 isolados de ADJ FS e 15 isolados de ADJ CULT; para fenantreno: 22 isolados de TPI FS; 16 isolados de TPI CULT; 16 isolados de

ADJ FS e 11 isolados de ADJ CULT; e para bifenil: 27 isolados de TPI CAP; 15 isolados de TPI CULT; 16 isolados de ADJ CAP e 14 isolados de ADJ CULT (Tabela 2.8). É importante destacar que estes valores levam em consideração somente isolados taxonomicamente diferentes entre si.



Figura 2.7 - Bioensaio de biodegradação. Tempo = 0 horas



Figura 2.8 - Bioensaio de biodegradação com isolados bacterianos crescido em meio de cultivo PCAT, obtidos a partir de amostras do solo do sítio: (a) TPI FS; (b) TPI CULT; (c) ADJ FS; d (ADJ CULT). Tempo = 24horas



Figura 2.9 - Bioensaio de biodegradação com isolados bacterianos crescidos em meio de cultivo Caso, obtidos a partir de amostras do solo do sítio TPI FS. Tempo = 24horas



Figura 2.10 - Bioensaio de biodegradação com isolados bacterianos crescidos em meio de cultivo Caso, obtidos a partir de amostras do solo do sítio TPI CULT. Tempo = 24horas



Figura 2.11 - Bioensaio de biodegradação com isolados bacterianos crescidos em meio de cultivo Caso, obtidos a partir de amostras do solo do sítio ADJ FS. Tempo = 24horas



Figura 2.12 - Bioensaio de biodegradação com isolados bacterianos crescidos em meio de cultivo Caso, obtidos a partir de amostras do solo do sítio ADJ CULT. Tempo = 24horas

Sítio	Total	Isolados	Grupos	Degradação	Degradação	Degradação
	Isolados	Positivos*	únicos **	Nafetaleno	Fenantreno	Bifenil
TPI FS	72	67	28	25	22	27
TPI CULT	62	59	16	15	16	15
ADJ FS	80	35	18	16	16	16
ADJ CULT	69	27	18	15	11	14

Tabela 2.8 - Quantidade de isolados positivos obtidos em cada um dos quatro diferentes sítios analisados

* Isolados Positivos são aqueles que mostraram potencial de biodegradação de pelo menos um dos três hidrocarbonetos testados, e que tiveram posteriormente seu gene 16S rRNA sequenciado, a fim de se obter sua identificação e realizar estudos filogenéticos.

** A partir dos alinhamentos das sequencias de 16S rRNA dos isolados, comparadas ao banco de dados do NCBI pela ferramenta blastn, foram encontradas sequencias identificadas pelo mesmo filotipo para mais de um isolado. No estudo dos dados de biodegradação, foi selecionado apenas um representante de cada filotipo, chamado na tabela, de grupos únicos, a fim de analisar a porcentagem de degradação de isolados de cada sítio, em relação a cada composto.

Rosenberg e Gutnick (1981) concluíram que bactérias capazes de degradar hidrocarbonetos estão localizadas potencialmente em todas as áreas naturais, embora apresentem grandes variações em suas concentrações celulares.

De acordo com os resultados, pode-se afirmar que em geral os sítios de Terra Preta apresentaram maior quantidade de isolados potencialmente degradadores. O fato de esses solos antropizados apresentarem maior quantidade de matéria orgânica pode criar um habitat favorável ao crescimento de bactérias que participem do ciclo de carbono, e degradação de compostos químicos constituídos por carbono, assim como os hidrocarbonetos.

Neste contexto, é possível sugerir que os gêneros bacterianos isolados neste ensaio a partir dos solos de TPI possuem grande potencial biotecnológico na geração de produtos e processo de interesse para ações de biorremediação e bioprospecção, tanto de moléculas quanto de genes relacionados às vias metabólicas de biodegradação. Os dados gerados a partir deste estudo também fornecem informações sobre o papel funcional desses microrganismos na ciclagem de nutrientes, cujos processos influenciam diretamente a resiliência da fertilidade associada aos solos de TPI. A presença de gêneros bacterianos com potencial para atividades funcionais também deve estar associada à maior quantidade de carvão pirogênico nestes solos, uma vez que o carvão possui grande capacidade de adsorção de moléculas e constitui um

micro-habitat estável para a sobrevivência de microrganismos, por ser recalcitrante e ter uma estrutura porosa.

No teste de seleção de microrganismos com potencial de degradação, foram testadas 283 isolados, dentre as quais 188 mostraram-se positivos para pelo menos um hidrocarboneto, sendo que 78 destes isolados são filotipos únicos. Quando o naftaleno foi utilizado como fonte de carbono, 89 % dos isolados de TPI FS, 94% dos isolados de TPI CULT, 89 % dos isolados de ADJ FS e 83 % dos isolados de ADJ CULT se mostraram potencialmente degradadores deste hidrocarboneto. Quando o fenantreno foi utilizado como fonte de carbono, 79 % dos isolados de TPI FS, 100 % dos isolados de TPI CULT, 89 % dos isolados de ADJ FS e 61 % dos isolados de ADJ CULT se mostraram potencialmente degradadores. Quando o bifenil foi utilizado como fonte de carbono, 96 % dos isolados de TPI FS, 94 % dos isolados de TPI CULT, 89 % dos isolados de ADJ CULT se mostraram potencialmente degradadores deste hidrocarboneto. Quando o bifenil foi utilizado como fonte de carbono, 96 % dos isolados de ADJ CULT se mostraram potencialmente degradadores deste hidrocarboneto. Quando o bifenil foi utilizado como fonte de carbono, 96 % dos isolados de ADJ CULT se mostraram potencialmente degradadores deste hidrocarboneto. Quando o bifenil foi utilizado como fonte de carbono, 96 % dos isolados de ADJ CULT se mostraram potencialmente degradadores deste ADJ CULT se mostraram potencialmente degradadores deste ADJ CULT se mostraram potencialmente degradadores deste hidrocarboneto. Quando o bifenil foi utilizado como fonte de carbono, 96 % dos isolados de ADJ CULT se mostraram potencialmente degradadores deste hidrocarboneto, como pode ser visualizado na Figura 2.13.



Figura 2.13 - Porcentagem de isolados de solos de sítios de TPI e ADJ, potencialmente degradadores dos hidrocarbonetos aromáticos naftaleno, fenantreno e bifenil, de acordo com o bioensaio de biodegradação que utiliza o indicador redox DCPIP
2.4.5 Amplificação por PCR do gene 16S rRNA dos isolados positivos no bioensaio

A partir do DNA extraído de cada um dos isolados bacterianos que apresentaram resultado positivo no bioensaio de biodegradação, foi amplificado por técnica de PCR as sequências do gene que codifica para a subunidade 16S do RNA ribossomal, utilizando-se os primers fD1 e rD1 (WEISBURG et al., 1991) . Para a maioria dos isolados, os produtos amplificados geraram um fragmento de DNA de aproximadamente 1500 pb (Figura 2.14), em quantidade suficiente para a realização das reações de sequenciamento do gene 16S rRNA.



Figura 2.14 - Gel resultante da amplificação do gene 16S rRNA de alguns isolados obtidos no ensaio de enriquecimento, controle negativo e padrão de peso molecular *100pb DNA Mass Ladder*TM (Invitrogen Life Technologies)

Em todas as reações foram incluídos controles negativos sem DNA. Os amplicons foram purificados em coluna de matriz de fibra de vidro GFX[™] PCR-DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), ressupendidos em água ultra-pura (Milli-Q) e quantificados em gel de agarose a 1,0 % utilizando o marcador de peso molecular 1kb *DNA Mass Ladder*[™] (Invitrogen Life Technologies), para verificação do rendimento da purificação.

2.4.6 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e análise das sequências

Todos os isolados que se mostraram positivos no bioensaio de degradação, tiveram o gene 16S rRNA amplificados. Após a amplificação do gene 16S o sequenciamento foi realizado como descrito anteriormente (Seção 2.3 Materiais e métodos, subseção 2.3.9 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, página 53), resultando em sequências de aproximadamente 400 pb. O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA tem sido extensivamente utilizado como ferramenta molecular para identificação de gêneros bacterianos, além de ser utilizado para análises de diversidade, quando o objetivo não é realizar um estudo evolutivo detalhado (CANNAVAN, 2007). A sequência parcial do gene geralmente apresenta variabilidade suficiente para identificação inicial de isolados bacterianos.

Nesse contexto, foram identificados 67 isolados a partir do sítio de TPI FS, 59 para o sítio TPI CULT, além de 35 isolados do sítio ADJ FS e 27 do sítio ADJ CULT, que apresentaram boa qualidade e comprimento suficiente da sequência parcial do gene ribossomal 16S rRNA (em torno de 400 pb). Este tamanho de fragmento é necessário para permitir uma boa identificação do gênero bacteriano correspondente a sequência submetida à comparação no banco de dados do *GenBank* (NCBI, <u>www.ncbi.nlm.nih.gov</u>), principalmente em termos de similaridade (identidade) e probabilidade de alinhamentos ao acaso (*E value*).

A partir da análise das sequências, foram definidos os filotipos (NUBEL et al., 1999; STACH et al., 2003) dos gêneros bacterianos presentes em cada sítio de TPI e ADJ analisado, todos com similaridade acima de 97 % em relação ao banco de dados do NCBI, usando a ferramenta BlastN. Os números de acesso, juntamente com a identidade em relação ao banco de dados e a referência de cada sequência dos isolados positivos crescidos em ambos os meios (PCAT e Caso), de cada sítio avaliado, estão apresentados nas Tabelas de 2.9 a 2.16.

Tabela 2.9 - Classificação taxonômica das bactérias positivas no bioensaio de degradação. Os isolados foram crescidos em meio de cultivo PCAT e obtidos a partir de amostras de solo do sítio Terra Preta de Índio sob Floresta Secundária

Amostra	<u>GenBank</u>	Descrição	E value	M iden.	Fonte Isolamento (Ref.)
TPI FS 16	<u>FJ445745.1</u>	Burkholderia cepacia strain KCTC 11096BP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99%	isolated gibberellin producing bacterium/Joo,G.J. et al (2009)
TPI FS 18	<u>EU723241.1</u>	Burkholderia tropica strain TAt-0750 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99%	"tomato rhizosphere"/Wong- Villarreal,A. and Caballero- Mellado,J. (2009)
TPI FS 19	DQ986324.1	Burkholderia sp. SJ98 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99%	dioxygenase involved in p- nitrophenol degradation in soil / Paul,D. et al (2008)
TPI FS 21	<u>FJ478405.1</u>	Burkholderia sp. TAt-045 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	98%	"tomato rhizosphere"/Wong- Villarreal,A. and Caballero- Mellado,J. (2009)
TPI FS 26	FJ975123.1	Pseudomonas sp. JDC-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99%	geographical regions of China/Liang,R. et al (2009)
TPI FS 27	<u>GQ169784.1</u>	Burkholderia pyrrocinia strain JK-SH007 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99%	"stem"/ Ren,J.H. et al (2011)
TPI FS 32	FJ194000.1	Uncultured Burkholderia sp. clone GI7-1-G23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	97%	environmental_sample/ LaDuc,M. et al (unpublished)
TPI FS 34	EU628999.1	Uncultured Burkholderia sp. clone YYLS316 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	98%	"soil"/ Lin,Y.T. et al (2010)

Tabela 2.10 - Classificação taxonômica das bactérias positivas no bioensaio de degradação. Os isolados foram crescidos em meio de cultivo Caso e obtidos a partir de amostras de solo do sítio Terra Preta de Índio sob Floresta Secundária

		sino rena reta de maio soc r	E	M	uu iu
Amostra	GenBank	Descrição	E value	iden.	Fonte Isolamento (Ref.)
TPI FS 01	<u>GU354317.1</u>	Pseudomonas putida strain L1-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	rhizosphere / Wang, J.F. et al (2009)
TPI FS 02	JF303034.1	Staphylococcus FSrae strain cT201 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	6E-112	100%	"olive mill waste composting pile"/ Federici,E. (Unpublished)
TPI FS 03	JF303034.1	Staphylococcus FSrae strain cT201 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	6E-112	100%	"olive mill waste composting pile"/ Federici,E. (Unpublished)
TPI FS 04	<u>GU354317.1</u>	Pseudomonas putida strain L1-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	rhizosphere / Wang,J.F. et al (2009)
TPI FS 05	<u>GU354317.1</u>	Pseudomonas putida strain L1-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	rhizosphere / Wang,J.F. et al (2009)
TPI FS 06	<u>HQ015745.1</u>	Aeromonas sp. B2RO26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	3E-179	100%	"tibia bone sample buried in soil and exhumed"/Salvador,J.M. et al (2010)
TPI FS 07	<u>GU354317.1</u>	Pseudomonas putida strain L1-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	rhizosphere / Wang,J.F. et al (2009)
TPI FS 08	<u>HQ015745.1</u>	Aeromonas sp. B2RO26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	3E-179	100%	"tibia bone sample buried in soil and exhumed"/Salvador,J.M. et al (2010)
TPI FS 09	FR877564.1	Pseudomonas putida partial 16S rRNA gene, isolate BBN2	2E-107	99%	"peptroleum derivatives contaminated soil"/ Mathe,I. et al (Unpublished)
TPI FS 10	JF496552.1	Aeromonas caviae strain JXZ-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1E-129	99%	Aeromonas caviae (Aeromonas punctata) / Zhou,G. et al (2011)
TPI FS 11	CP002727.1	Pseudomonas fulva 12-X, complete genome	0	98%	Rice paddy/ Lucas, S. et al (2011)
TPI FS 12	<u>GU354317.1</u>	Pseudomonas putida strain L1-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	rhizosphere / Wang, J.F. et al (2009)
TPI FS 13	CP002727.1	Pseudomonas fulva 12-X, complete genome	0	98%	Rice paddy/ Lucas, S. et al (2011)
TPI FS 14	AM934696.1	Pseudomonas sp. WB3.2-34 partial 16S rRNA gene, strain WB3.2-34	1E-138	99%	"hardwater creek"/ Cousin,S. et al (2008)
TPI FS 15	<u>GU354317.1</u>	Pseudomonas putida strain L1-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	rhizosphere / Wang,J.F. et al (2009)
TPI FS 16	<u>GU354317.1</u>	Pseudomonas putida strain L1-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	rhizosphere / Wang,J.F. et al (2009)

TPI FS 17	<u>FJ037483.1</u>	Uncultured Pseudomonas sp. clone U000130432 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1E-148	100%	Amazon agricultural soil/ da C Jesus,E. et al (2009)
TPI FS 18	<u>FJ037483.1</u>	Uncultured Pseudomonas sp. clone U000130432 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1E-148	100%	Amazon agricultural soil/ da C Jesus,E. et al (2009)
TPI FS 19	<u>GU969239.1</u>	Pseudomonas panipatensis strain Ybs-T1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	3E-125	98%	"soil from oil contaminated site"/ Bacosa,H.P. and Inoue,C. (Unpublished)
TPI FS 20	DQ813324.1	Pseudomonas sp. IBUN C25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	cultivated soil with sugarcane crop/ Revelo Romo,D.M. (2007)
TPI FS 21	<u>HM352418.1</u>	Sphingomonas sp. SeLB7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	3E-169	97%	"gut of larvae" / Yang,H. et al (2010)
TPI FS 22	<u>HM352418.1</u>	Sphingomonas sp. SeLB7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	3E-169	97%	"gut of larvae" / Yang,H. et al (2010)
TPI FS 23	<u>GU969239.1</u>	Pseudomonas panipatensis strain Ybs-T1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	3E-125	98%	"soil from oil contaminated site"/ Bacosa,H.P. and Inoue,C. (Unpublished)
TPI FS 24	<u>AM184269.1</u>	Pseudomonas sp. WAB1930 partial 16S rRNA gene, strain WAB1930	0	99%	river water/ Abraham,W.R. et al (2006)
TPI FS 25	<u>HM352418.1</u>	Sphingomonas sp. SeLB7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	3E-169	97%	"gut of larvae" / Yang,H. et al (2010)
TPI FS 26	<u>GU354317.1</u>	Pseudomonas putida strain L1-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	rhizosphere / Wang, J.F. et al (2009)
TPI FS 27	<u>AM184269.1</u>	Pseudomonas sp. WAB1930 partial 16S rRNA gene, strain WAB1930	0	97%	river water/ Abraham,W.R. et al (2006)
TPI FS 28	<u>AM184269.1</u>	Pseudomonas sp. WAB1930 partial 16S rRNA gene, strain WAB1930	0	97%	river water/ Abraham,W.R. et al (2006)
TPI FS 29	<u>AM184269.1</u>	Pseudomonas sp. WAB1930 partial 16S rRNA gene, strain WAB1930	0	97%	river water/ Abraham,W.R. et al (2006)
TPI FS 31	<u>HQ650543.1</u>	Uncultured bacterium clone A3-23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	environmental samples /Huang,W. et al (2010)
TPI FS 32	<u>HQ015745.1</u>	Aeromonas sp. B2RO26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1E-178	100%	"tibia bone sample buried in soil and exhumed"/Salvador,J.M. et al (2010)
TPI FS 33	<u>AM184269.1</u>	Pseudomonas sp. WAB1930 partial 16S rRNA gene, strain WAB1930	0	97%	river water/ Abraham,W.R. et al (2006)
TPI FS 35	<u>FJ581445.1</u>	Bacillus circulans strain Q11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	Isolation an O-dihydroxybenzene- degrading bacterium / Hang,B. and Li,S. (2008)
TPI FS 37	DQ813324.1	Pseudomonas sp. IBUN C25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	cultivated soil with sugarcane crop/ Revelo Romo, D.M. (2007)
TPI FS 38	<u>GU354317.1</u>	Pseudomonas putida strain L1-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	rhizosphere / Wang, J.F. et al (2009)
TPI FS 39	<u>FJ529916.1</u>	Pseudomonas plecoglossicida strain PNP-F5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	spider population resistance to fenpropethrin / Indiragandhi,P. and Kim,GH. (2009)
TPI FS 40	AM184269.1	Pseudomonas sp. WAB1930 partial 16S rRNA gene, strain WAB1930	0	99%	river water/ Abraham, W.R. et al (2006)
TPI FS 51	DQ813324.1	Pseudomonas sp. IBUN C25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	cultivated soil with sugarcane crop/ Revelo Romo,D.M. (2007)
TPI FS 52	<u>AM184269.1</u>	Pseudomonas sp. WAB1930 partial 16S rRNA gene, strain WAB1930	0	99%	river water/ Abraham,W.R. et al (2006)
TPI FS 53	<u>HM352418.1</u>	Sphingomonas sp. SeLB7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	3E-169	97%	"gut of larvae" / Yang,H. et al (2010)
TPI FS 55	DQ813324.1	Pseudomonas sp. IBUN C25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	cultivated soil with sugarcane crop/ Revelo Romo, D.M. (2007)
TPI FS 56	<u>GU354317.1</u>	Pseudomonas putida strain L1-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	rhizosphere / Wang, J.F. et al (2009)
TPI FS 58	<u>HM352418.1</u>	Sphingomonas sp. SeLB7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	3E-169	97%	"gut of larvae" / Yang,H. et al (2010)
TPI FS 59	JF303034.1	Staphylococcus FSrae strain cT201 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	6E-112	100%	"olive mill waste composting pile"/ Federici,E. (Unpublished)
TPI FS 63	FJ652623.1	Pseudomonas sp. CMR5c 16S ribosomal RNA (rrsA) gene, partial sequence	0	99%	phenazine biosynthesis pathway / Mavrodi,D.V. et al (2010)
TPI FS 65	<u>GU354317.1</u>	Pseudomonas putida strain L1-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	rhizosphere / Wang, J.F. et al (2009)
TPI FS 67	GU354317 1	Pseudomonas putida strain L1-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	rhizosphere / Wang, J.F. et al (2009)
TPI FS 69	HQ650543.1	Uncultured bacterium clone A3-23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	environmental samples /Huang,W. et al (2010)

TPI FS 71	<u>HQ015745.1</u>	Aeromonas sp. B2RO26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	3E-140	99%	"tibia bone sample buried in soil and exhumed"/Salvador,J.M. et al (2010)
TPI FS 72	GU294300.1	Pseudomonas sp. TV5PF1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	"soil" / Girija,D., et al (unpublished)
TPI FS 73	<u>GU354317.1</u>	Pseudomonas putida strain L1-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	rhizosphere / Wang,J.F. et al (2009)
TPI FS 76	JN035302.1	Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens strain DH1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1E-163	100%	"root" / Li,HB. (Unpublished)
TPI FS 78	JN035302.1	Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens strain DH1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1E-163	100%	"root" / Li,HB. (Unpublished)
TPI FS 79	JF701675.1	Pseudomonas putida strain AS30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	98%	Sandeep,A.R. and Jisha,M.S. (Unpublished)
TPI FS 80	<u>AF521652.1</u>	Pseudomonas sp. 9-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	"Dong Anh, Hanoi, Viet Nam in 2001"/ Nguyen,T.T.N. et al (2002)
TPI FS 84	JF215382.1	Uncultured bacterium clone ncd2496h05c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	Bacteria; environmental samples / Kong,H.H. et al (2010)
TPI FS 85	<u>AF521652.1</u>	Pseudomonas sp. 9-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	"Dong Anh, Hanoi, Viet Nam in 2001"/ Nguyen,T.T.N. et al (2002)
TPI FS 98	AM934696.1	Pseudomonas sp. WB3.2-34 partial 16S rRNA gene, strain WB3.2-34	1E-138	99%	"hardwater creek"/ Cousin,S. et al (2008)
TPI FS 100	<u>GU354317.1</u>	Pseudomonas putida strain L1-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	rhizosphere / Wang,J.F. et al (2009)

Tabela 2.11 - Classificação taxonômica das bactérias positivas no bioensaio de degradação. Os isolados foram crescidos em meio de cultivo PCAT e obtidos a partir de amostras de solo do sítio Terra Preta de Índio sob Cultivo Agrícola

Amostra	GenBank	Descrição	E value	M iden.	Fonte Isolamento (Ref.)
TPI CULT 1	<u>FJ445745.1</u>	Burkholderia cepacia strain KCTC 11096BP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99%	isolated gibberellin producing bacterium/Joo,G.J. et al (2009)
TPI CULT 4	EU312976.1	Pseudomonas sp. SCT-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99%	"soil from an oil field"/ Lu,P., Hong,Q. and Li,S. (2007)
TPI CULT 9	<u>NR_025097.1</u>	Burkholderia sacchari strain IPT10 16S ribosomal RNA, partial sequence	0.0	99%	soil of sugar-cane plantation in Brazil/Bramer,C.O. et al (2001)

Tabela 2.12 - Classificação taxonômica das bactérias positivas no bioensaio de degradação. Os isolados foram crescidos em meio de cultivo Caso e obtidos a partir de amostras de solo do sítio Terra Preta de Índio sob Floresta Secundária

~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~						
Amostra	GenBank	Descrição	E value	M iden.	Fonte Isolamento (Ref.)	
TPI CULT 02	EU734612.1	Serratia sp. VC-YC6643 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	"vermicompost" / Yasir,M. ET AL (2008)	
TPI CULT 03	EU734612.1	Serratia sp. VC-YC6643 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	"vermicompost" / Yasir,M. ET AL (2008)	
TPI CULT 04	EU734612.1	Serratia sp. VC-YC6643 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	"vermicompost" / Yasir,M. ET AL (2008)	
TPI CULT 05	<u>JF513138.1</u>	Pseudomonas fluorescens strain S181R 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	6E-115	100%	"salt-affected soil" / Alagawadi,A.R. et al (Unpublished)	
TPI CULT 06	<u>FJ853424.1</u>	Serratia marcescens strain MH6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"brazilian soil"/ Bach,E. et al (2011)	
TPI CULT 09	JF303034.1	Staphylococcus caprae strain cT201 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	6E-112	100%	"olive mill waste composting pile"/ Federici,E. (Unpublished)	

TPI CULT 11	EF658686.1	Uncultured Staphylococcus sp. clone YHSS12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	environmental_sample / Graham,R.I. et al (2007)
TPI CULT 12	<u>EF658686.1</u>	Uncultured Staphylococcus sp. clone YHSS12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	environmental_sample / Graham,R.I. et al (2007)
TPI CULT 14	<u>FJ853424.1</u>	Serratia marcescens strain MH6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"brazilian soil"/ Bach,E. et al (2011)
TPI CULT 15	FJ462701.1	Serratia marcescens strain AKL1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"brazilian soil"/ Bach, E. et al (2011)
TPI CULT 17	EF658686.1	Uncultured Staphylococcus sp. clone YHSS12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	environmental_sample / Graham,R.I. et al (2007)
TPI CULT 18	<u>FJ853424.1</u>	Serratia marcescens strain MH6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"brazilian soil"/ Bach,E. et al (2011)
TPI CULT 19	EF658686.1	Uncultured Staphylococcus sp. clone YHSS12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	environmental_sample / Graham,R.I. et al (2007)
TPI CULT 25	FJ462701.1	Serratia marcescens strain AKL1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"brazilian soil"/ Bach,E. et al (2011)
TPI CULT 26	<u>HQ841047.1</u>	Staphylococcus sp. CUL-LABLG2X2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"midgut" / Chavshin,A.R. et al (2010)
TPI CULT 27	<u>FJ462701.1</u>	Serratia marcescens strain AKL1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"brazilian soil"/ Bach,E. et al (2011)
TPI CULT 28	<u>HQ841047.1</u>	Staphylococcus sp. CUL-LABLG2X2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"midgut" / Chavshin,A.R. et al (2010)
TPI CULT 31	FJ462701.1	Serratia marcescens strain AKL1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"brazilian soil"/ Bach,E. et al (2011)
TPI CULT 32	HQ917058.1	Serratia sp. NB2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"nitrobenzene-contaminated soil" / Jin,D. et al (2011)
TPI CULT 33	<u>HQ917058.1</u>	Serratia sp. NB2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"nitrobenzene-contaminated soil" / Jin,D. et al (2011)
TPI CULT 37	<u>FJ462701.1</u>	Serratia marcescens strain AKL1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"brazilian soil"/ Bach,E. et al (2011)
TPI CULT 38	<u>EF658686.1</u>	Uncultured Staphylococcus sp. clone YHSS12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	environmental_sample / Graham,R.I. et al (2007)
TPI CULT 43	<u>HQ841047.1</u>	Staphylococcus sp. CUL-LABLG2X2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"midgut" / Chavshin,A.R. et al (2010)
TPI CULT 49	<u>HQ841047.1</u>	Staphylococcus sp. CUL-LABLG2X2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"midgut" / Chavshin,A.R. et al (2010)
TPI CULT 50	<u>JF513138.1</u>	Pseudomonas fluorescens strain S181R 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"salt-affected soil" / Alagawadi,A.R. et al (Unpublished)
TPI CULT 51	<u>HQ917058.1</u>	Serratia sp. NB2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"nitrobenzene-contaminated soil" / Jin,D. et al (2011)
TPI CULT 52	<u>EF658686.1</u>	Uncultured Staphylococcus sp. clone YHSS12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	environmental_sample / Graham,R.I. et al (2007)
TPI CULT 53	<u>EU734612.1</u>	Serratia sp. VC-YC6643 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	"vermicompost" / Yasir,M. ET AL (2008)
TPI CULT 54	<u>EU734612.1</u>	Serratia sp. VC-YC6643 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	"vermicompost" / Yasir,M. ET AL (2008)
TPI CULT 58	EU734612.1	Serratia sp. VC-YC6643 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	"vermicompost" / Yasir,M. ET AL (2008)
TPI CULT 59	EU734612.1	Serratia sp. VC-YC6643 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	"vermicompost" / Yasir,M. ET AL (2008)
TPI CULT 60	<u>NR_024997.1</u>	Sphingomonas aquatilis strain JSS-7 16S ribosomal RNA, partial sequence	0	99%	natural mineral water / Lee, J.S. et al (2001)
TPI CULT 62	<u>JF513138.1</u>	Pseudomonas fluorescens strain S181R 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	"salt-affected soil" / Alagawadi,A.R. et al (Unpublished)
TPI CULT 63	<u>FJ853424.1</u>	Serratia marcescens strain MH6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"brazilian soil"/ Bach,E. et al (2011)
TPI CULT 65	<u>FJ462701.1</u>	Serratia marcescens strain AKL1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"brazilian soil"/ Bach,E. et al (2011)

TPI CULT 66	<u>FJ853424.1</u>	Serratia marcescens strain MH6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"brazilian soil"/ Bach, E. et al (2011)
TPI CULT 67	FJ853424.1	Serratia marcescens strain MH6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"brazilian soil"/ Bach, E. et al (2011)
TPI CULT 68	GU826156.1	Serratia marcescens strain H14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	"brazilian soil"/ Bach, E. et al (2011)
TPI CULT 69	<u>HQ917058.1</u>	Serratia sp. NB2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"nitrobenzene-contaminated soil" / Jin,D. et al (2011)
TPI CULT 71	<u>NR_024997.1</u>	Sphingomonas aquatilis strain JSS-7 16S ribosomal RNA, partial sequence	0	99%	natural mineral water / Lee,J.S. et al (2001)
TPI CULT 72	FJ462701.1	Serratia marcescens strain AKL1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"brazilian soil"/ Bach,E. et al (2011)
TPI CULT 73	<u>HQ841047.1</u>	Staphylococcus sp. CUL-LABLG2X2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"midgut" / Chavshin,A.R. et al (2010)
TPI CULT 74	<u>EF658686.1</u>	Uncultured Staphylococcus sp. clone YHSS12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Staphylococcus sp. CLL LABLG2X2	0	100%	environmental_sample / Graham,R.I. et al (2007)
TPI CULT 75	<u>HQ841047.1</u>	16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"midgut" / Chavshin,A.R. et al (2010)
TPI CULT 76	EU420931.1	Enterobacter sp. SA-A5-114 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	environmental_sample/Wang,C. and Dang,H. (2008)
TPI CULT 77	<u>HQ841047.1</u>	Staphylococcus sp. CUL-LABLG2X2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"midgut" / Chavshin,A.R. et al (2010)
TPI CULT 79	<u>HQ242729.1</u>	Raoultella ornithinolytica isolate PSB16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	"phosphate rich soil from Dianchi watershed field" / Yang,P.X. (unpublished)
TPI CULT 80	<u>HQ841047.1</u>	Staphylococcus sp. CUL-LABLG2X2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"midgut" / Chavshin,A.R. et al (2010)
TPI CULT 84	<u>HQ841047.1</u>	Staphylococcus sp. CUL-LABLG2X2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"midgut" / Chavshin,A.R. et al (2010)
TPI CULT 85	<u>HQ841047.1</u>	Staphylococcus sp. CUL-LABLG2X2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"midgut" / Chavshin,A.R. et al (2010)
TPI CULT 86	<u>FJ607349.1</u>	Stenotrophomonas sp. SeaH-As3S 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	"arsenic-contaminated Sagok-ri Au- Ag mine and tailing" / Chang,JS. et al (2009)
TPI CULT 87	EF658686.1	Uncultured Staphylococcus sp. clone YHSS12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	environmental_sample / Graham,R.I. et al (2007)
TPI CULT 88	<u>JF513138.1</u>	Pseudomonas fluorescens strain S181R 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	"salt-affected soil" / Alagawadi,A.R. et al (Unpublished)
TPI CULT 89	EF658686.1	Uncultured Staphylococcus sp. clone YHSS12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	environmental_sample / Graham,R.I. et al (2007)
TPI CULT 90	EF658686.1	Uncultured Staphylococcus sp. clone YHSS12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	environmental_sample / Graham,R.I. et al (2007)
TPI CULT 92	EF658686.1	Uncultured Staphylococcus sp. clone YHSS12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	environmental_sample / Graham,R.I. et al (2007)

do sitio rajacente sob i foreta Secundaria							
Amostra	Accessio	Descrição	E value	M iden.	Fonte Isolamento (Ref.)		
ADJ FS 61	<u>EU723241.1</u>	Burkholderia tropica strain TAt-0750 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99%	"tomato rhizosphere"/Wong- Villarreal,A. and Caballero-Mellado,J. (2009)		
ADJ FS 63	<u>AY391283.1</u>	Burkholderia unamae isolate TR3.4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	98%	Sugarcane associated Burkholderia isolates/Omarjee,J.H. and Balandreau,J. (unpublished)		
ADJ FS 65	<u>AB488694.1</u>	Burkholderia sp. OX-01 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, clone: pCR2.1::OX-01_rDNA#5	0.0	99%	"soil"/ Otsuka,Y. et al (2011)		
ADJ FS 66	<u>GQ169784.1</u>	Burkholderia pyrrocinia strain JK-SH007 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	100%	"stem"/ Ren,J.H. et al (2011)		
ADJ FS 74	AF364860.1	Burkholderia sp. AB120 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99%	"pineapple stem"/Cruz,L.M. et al (unpublished)		
ADJ FS 75	<u>CP001504.1</u>	Burkholderia glumae BGR1 chromosome 2, complete sequence	0.0	98%	Lim,J. et al (2009)		
ADJ FS 78	EU629007.1	Uncultured Burkholderia sp. clone YYLS334 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	98%	"soil"/ Lin,Y.T. et al (2010)		

Tabela 2.13 - Classificação taxonômica das bactérias positivas no bioensaio de degradação. Os isolados foram crescidos em meio de cultivo PCAT e obtidos a partir de amostras de solo do sítio Adjacente sob Floreta Secundária

Tabela 2.14 - Classificação taxonômica das bactérias positivas no bioensaio de degradação. Os isolados foram crescidos em meio de cultivo Caso e obtidos a partir de amostras de solo do sítio Adjacente sob Floreta Secundária

Amostra	Accession	Description	E value	M iden.	Fonte Isolamento (Ref.)
ADJ FS 11	<u>HM352415.1</u>	Staphylococcus sp. SeLB4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	"gut of larvae" / Yang,H. et al (2010)
ADJ FS 14	<u>HM352415.1</u>	Staphylococcus sp. SeLB4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	"gut of larvae" / Yang,H. et al (2010)
ADJ FS 19	<u>HM076695.1</u>	Uncultured Staphylococcus sp. clone VA16_27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	environmental_sample / Frank,D.N. et al (2010)
AD FS 20	JF899874.1	Staphylococcus sp. F1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	"Wenshan Lake" / Fu,L. et al (2011)
ADJ FS 21	JN036434.1	Bacillus sp. enrichment culture clone M2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	environmental_sample / Yang,F.S. et al (unplublished)
ADJ FS 23	JN052160.1	Staphylococcus sp. SRM1B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2E-150	99%	"chlorpyrifos contaminated soil" / Ramya,M. et al (unpublished)
ADJ FS 24	<u>HM352415.1</u>	Staphylococcus sp. SeLB4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	"gut of larvae" / Yang,H. et al (2010)
ADJ FS 28	JF899874.1	Staphylococcus sp. F1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	"Wenshan Lake" / Fu,L. et al (2011)
ADJ FS 35	JN036434.1	Bacillus sp. enrichment culture clone M2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	environmental_sample / Yang,F.S. et al (unplublished)
ADJ FS 36	JN052160.1	Staphylococcus sp. SRM1B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2E-150	99%	"chlorpyrifos contaminated soil" / Ramya,M. et al (unpublished)
ADJ FS 38	JN128245.1	Staphylococcus haemolyticus strain HNS011 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2E-155	100%	"marine sponge" / Su,P. et al (unpublished)
ADJ FS 40	JN128245.1	Staphylococcus haemolyticus strain HNS011 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2E-155	100%	"marine sponge" / Su,P. et al (unpublished)
ADJ FS 45	JN128245.1	Staphylococcus haemolyticus strain HNS011 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2E-155	100%	"marine sponge" / Su,P. et al (unpublished)
ADJ FS 46	<u>HQ238891.1</u>	Bacillus cereus strain Z2B-73 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1E-149	99%	"mud of the walls of pits where grain is fermented to liquor"/Unpublished
ADJ FS 47	<u>HM352415.1</u>	Staphylococcus sp. SeLB4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	"gut of larvae" / Yang,H. et al (2010)

ADJ FS 49	EU420931.1	Enterobacter sp. SA-A5-114 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	environmental_sample/Wang,C. and Dang,H. (2008)
ADJ FS 50	<u>HM352415.1</u>	Staphylococcus sp. SeLB4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	"gut of larvae" / Yang,H. et al (2010)
ADJ FS 51	EU420931.1	Enterobacter sp. SA-A5-114 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	environmental_sample/Wang,C. and Dang,H. (2008)
ADJ FS 52	JF900963.1	Bacterium LimA-1-J-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	3E-134	100%	"lake water" / Lima- Bittencourt,C.I. (2011)
ADJ FS 54	JF900963.1	Bacterium LimA-1-J-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	3E-134	100%	"lake water" / Lima- Bittencourt,C.I. (2011)
ADJ FS 55	<u>HQ650543.1</u>	Uncultured bacterium clone A3-23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	Bacteria; environmental samples / Huang,W. et al (2010)
ADJ FS 56	HQ650543.1	Uncultured bacterium clone A3-23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	Bacteria; environmental samples / Huang,W. et al (2010)
ADJ FS 58	HQ650543.1	Uncultured bacterium clone A3-23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	Bacteria; environmental samples / Huang,W. et al (2010)
ADJ FS 75	JN128245.1	Staphylococcus haemolyticus strain HNS011 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2E-155	100%	"marine sponge" / Su,P. et al (unpublished)
ADJ FS 77	JN128245.1	Staphylococcus haemolyticus strain HNS011 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2E-155	100%	"marine sponge" / Su,P. et al (unpublished)
ADJ FS 84	<u>JF899874.1</u>	Staphylococcus sp. F1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	"Wenshan Lake" / Fu,L. et al (2011)
ADJ FS 88	JF899874.1	Staphylococcus sp. F1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	"Wenshan Lake" / Fu,L. et al (2011)
ADJ FS 89	<u>HM771104.1</u>	Enterobacter sp. INBio3713E 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	bacteria associated with the guts of beetle larvae / Unpublished

Tabela 2.15 - Classificação taxonômica das bactérias positivas no bioensaio de degradação. Os isolados foram crescidos em meio de cultivo PCAT e obtidos a partir de amostras de solo do sítio Adjacente sob Cultivo Agrícola

	do shio najacente soo cultivo ngileota						
_	Amostra	Accesso	Descrição	E value	M iden.	Fonte Isolamento (Ref.)	
	ADJ CULT 36	<u>GQ169784.1</u>	Burkholderia pyrrocinia strain JK-SH007 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99%	"stem"/ Ren, J.H. et al (2011)	
	ADJ CULT 39	<u>FJ194000.1</u>	Uncultured Burkholderia sp. clone GI7-1- G23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	98%	"tomato rhizosphere"/Wong- Villarreal,A. and Caballero- Mellado,J. (2009)	
	ADJ CULT 40	<u>EU723241.1</u>	Burkholderia tropica strain TAt-0750 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99%	"tomato rhizosphere"/Wong- Villarreal,A. and Caballero- Mellado,J. (2009)	
	ADJ CULT 42	<u>AB488694.1</u>	Burkholderia sp. OX-01 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, clone: pCR2.1::OX-01_rDNA#5	0.0	98%	"soil"/ Otsuka,Y. et al (2011)	
	ADJ CULT 45	<u>AY391283.1</u>	Burkholderia unamae isolate TR3.4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	98%	Sugarcane associated Burkholderia isolates/Omarjee,J.H. and Balandreau,J. (unpublished)	
	ADJ CULT 46	AF364860.1	Burkholderia sp. AB120 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	98%	"pineapple stem"/Cruz,L.M. et al (unpublished)	
	ADJ CULT 48	<u>AM284971.1</u>	Burkholderia nodosa 16S rRNA gene, type strain Br3437T	0.0	98%	"root nodule"/Chen,W.M. et al (2007)	
	ADJ CULT 50	<u>AY128104.1</u>	Burkholderia tropica strain MTo-672 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	98%	"isolated from maize stem tissue"/Reis,V.M. et al (2004)	

Amostra	Accesso	Descrição	E value	M iden	Fonte Isolamento (Ref.)
ADJ CULT 1	JN035302.1	Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens strain DH1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1E-163	100%	"root" / Li,HB. (Unpublished)
ADJ CULT 6	JN035302.1	Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens strain DH1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1E-163	100%	"root" / Li,HB. (Unpublished)
ADJ CULT 8	EU420931.1	Enterobacter sp. SA-A5-114 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	environmental_sample/Wa ng,C. and Dang,H. (2008)
ADJ CULT 24	<u>M352390.1</u>	Staphylococcus sp. PrNA7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"gut of larvae"/ Yang,H. et al (2010)
ADJ CULT 45	JF756177.1	Staphylococcus haemolyticus strain MFPB11A17- 05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"modified-atmosphere packaged beef Carpaccio" / Unpublished
ADJ CULT 52	<u>HM352415.1</u>	Staphylococcus sp. SeLB4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"gut of larvae" / Yang,H. eu al (2010)
ADJ CULT 54	EU420931.1	Enterobacter sp. SA-A5-114 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	environmental_sample/Wa ng,C. and Dang,H. (2008)
ADJ CULT 55	JF900963.1	Bacterium LimA-1-J-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	3E-134	100%	"lake water" / Lima- Bittencourt,C.I. (2011)
ADJ CULT 56	JF799895.1	Staphylococcus sp. CIFRI P-TSB-53 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"marine water" / Behera,B.K. et al (2011)
ADJ CULT 60	<u>HM771104.1</u>	Enterobacter sp. INBio3713E 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	bacteria associated with the guts of beetle larvae / Unpublished
ADJ CULT 62	JF938998.1	Enterobacter sp. SA-A5-114 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	environmental_sample/Wa ng,C. and Dang,H. (2008)
ADJ CULT 65	JF799895.1	Staphylococcus sp. CIFRI P-TSB-53 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"marine water" / Behera,B.K. et al (2011)
ADJ CULT 67	JF233205.1	Uncultured bacterium clone ncd2687g02c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	97%	Bacteria; environmental samples / Kong,H.H. et al (2010)
ADJ CULT 77	<u>HM771104.1</u>	Enterobacter sp. INBio3713E 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	99%	bacteria associated with the guts of beetle larvae / Unpublished
ADJ CULT 83	<u>JF799895.1</u>	Staphylococcus sp. CIFRI P-TSB-53 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"marine water" / Behera,B.K. et al (2011)
ADJ CULT 84	<u>JF799895.1</u>	Staphylococcus sp. CIFRI P-TSB-53 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"marine water" / Behera,B.K. et al (2011)
ADJ CULT 86	<u>HQ650543.1</u>	Uncultured bacterium clone A3-23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	Bacteria; environmental samples / Huang,W. et al (2010)
ADJ CULT 88	<u>JF799895.1</u>	Staphylococcus sp. CIFRI P-TSB-53 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	"marine water" / Behera,B.K. et al (2011)
ADJ CULT 89	<u>HQ650543.1</u>	Uncultured bacterium clone A3-23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	100%	Bacteria; environmental samples / Huang,W. et al (2010)

Tabela 2.16 - Classificação taxonômica das bactérias positivas no bioensaio de degradação. Os isolados foram crescidos em meio de cultivo Caso e obtidos a partir de amostras de solo do sítio Adjacente sob Cultivo Agrícola

Desta forma, a distribuição dos gêneros bacterianos encontrados em cada sítio analisado foi bastante heterogênea; entretanto, alguns gêneros foram comuns para mais de um sítio e houve ocorrência de gêneros bacterianos específicos para cada um dos solos TPI e ADJ analisados. Alguns isolados foram altamente similares a bactérias derivadas de clones ambientais depositadas no banco de dados do NCBI. Estes dados podem ser vistos nas Figuras 2.15, 2.16, 2.17 e 2.18.



Figura 2.15 - Distribuição dos gêneros bacterianos positivos no ensaio de biodegradação. Estes isolados foram obtidos por meio de amostras de solo do sítio TPI FS



Figura 2.16 - Distribuição dos gêneros bacterianos positivos no ensaio de biodegradação. Estes isolados foram obtidos por meio de amostras de solo do sítio TPI CULT



Figura 2.17 - Distribuição dos gêneros bacterianos positivos no ensaio de biodegradação. Estes isolados foram obtidos por meio de amostras de solo do sítio ADJ FS



Figura 2.18 - Distribuição dos gêneros bacterianos positivos no ensaio de biodegradação. Estes isolados foram obtidos por meio de amostras de solo do sítio ADJ CULT

No sítio TPI FS foram encontrados 4 isolados similares a clones ambientais não cultivados, sendo que 2 deles apresentaram como referência um trabalho de biblioteca de clones de um sítio agrícola da Amazônia, realizado por Jesus et al. (2009). Outros dois isolados similares a clones não cultivados correspondem ao gênero *Burkholderia* e têm como referências clones de amostras ambientais de solo. Ainda analisando os isolados deste sítio, foi evidenciado que o filo mais abundante entre os isolados foi Proteobacteria, principalmente os pertencentes à Classe Gammaproteobactérias e gênero *Pseudomonas*. Os filotipos exclusivos deste sítio são representados por isolados pertencentes aos gêneros *Aeromonas, Pseudomonas, Burkholderia, Sphingomonas* e *Bacillus*. Todos esses gêneros exclusivos deste sítio de TPI já foram citados na literatura como degradadores de hidrocarbonetos (KADRI et al.; 1986; SORKHOH et al., 1990; AL-HADHRAMI et al., 1995; CERNIGLIA, 1992; CRAPEZ et al., 2002; JACQUES et al., 2007; MANDRI; LIN, 2007; SEO et al., 2009; CLEMENTE et al., 2001), o que infere confiabilidade no bioensaio realizado, além de mostrar o potencial de isolados degradadores neste sítio.

Ao analisar o consórcio bacteriano positivo no bioensaio de degradação do sítio TPI CULT, notou-se que o filo mais abundante foi Firmicutes, pertencentes ao gênero

Staphylococcus (22 isolados), sendo a maioria deles com referência de isolamento a partir de amostras ambientais. Bactérias pertencentes ao gênero Staphylococcus também já foram citadas na literatura como potencial degradadoras de hidrocarbonetos (MARIANO et al., 2007). Neste sítio também foram encontrado isolados similares a clones não cultivados do gênero Staphylococcus. Os filotipos exclusivos deste sítio se mostraram nos gêneros Serratia, Raoultella, Pseudomonas, Staphylococcus, Sphingomonas, Burkholderia e Stenotrophomonas que também já foram citados na literatura como degradadadores de hidrocarbonetos aromáticos. Gêneros bacterianos como Pseudomonas, que são microrganismos altamente adaptados e amplamente distribuídos na maioria dos ambientes (MA et al., 2006), foram encontrados nos dois solos de TPI analisados e em grande quantidade no solo TPI FS; algumas espécies foram isoladas somente em no sítio TPI FS, como por exemplo: Pseudomonas Pseudomonas Pseudomonas Pseudomonas chlororaphis, fulva, panipatensis e plecoglossicida.

Considerando os dois sítios de TPI, foi observado que apenas dois filotipos bacterianos (Figura 2.19.) foram compartilhados entre os dois sítios, podendo indicar que o uso do solo para cada sítio de TPI pode ter influenciado na comunidade bacteriana analisada.



Figura 2.19 - Diagrama de Venn para os filotipos comuns e únicos para os sítios TPI FS e TPI CULT

Na análise dos filotipos referentes ao isolados do sítio ADJ FS notou-se que o filo mais abundante foi Firmicutes, pertencente à Família Staphylococcaceae, principalmente o gênero *Staphylococcus*. Foram observados quatro isolados similares a clones não cultivados, e todos apresentaram como referências clones de amostras ambientais. Os filotipos exclusivos deste sítio se mostraram em gêneros como *Bacillus, Staphylococcus*, e *Burkholderia*, todos também descritos como bactérias com potencial de degradação.

Analisando os filotipos referentes ao isolados do sítio ADJ FS notou-se que o filo mais abundante foi Proteobacteria, pertencentes às Classes Alpha isolados) (8) e Gammaproteobacteria (8 isolados). Foram observados quatro isolados similares à clones não cultivados, sendo que três apresentaram como referências clones de amostras ambientais em geral e um apresentou como referência clones de uma biblioteca de rizosfera de tomate. Os filotipos exclusivos deste sítio se mostraram em gêneros como Staphylococcus e Burkholderia, também descritos como bactérias com potencial de degradação.

Considerando os dois sítios ADJ, foi observado que 10 filotipos bacterianos (Figura 2.20.) foram compartilhados, possivelmente indicando uma menor influencia do uso da terra na diversidade destes grupos analisados, quando comparadas com solos de TPI.



Figura 2.20 - Diagrama de Venn para os filotipos comuns e únicos para os sítios ADJ FS e ADJ CULT

Adicionalmente, realizou-se uma análise levando-se em conta a cobertura de cada sítio de TPI e seus solos adjacentes. Observou-se que para os sítios sob FS 5 filotipos mostraramse compartilhados (Figura 2.21). Entretanto, ao se analisar os sítios sob CULT, somente 1 filotipo mostrou-se compartilhado (Figura 2.22).



Figura 2.21 - Diagrama de Venn para os filotipos comuns e únicos para os sítios TPI FS e ADJ FS



Figura 2.22 - Diagrama de Venn para os filotipos comuns e únicos para os sítios TPI CULT e ADJ CULT

A partir da identificação dos isolados obtidos para os sítios de TPI e ADJ analisados, foi possível classificar todos os grupos filogenéticos em dois filos distintos, sendo, Firmicutes (34 % dos isolados) e Proteobacteria (66 % dos isolados) (Tabela 2.17).

Filo	Classe	Ordem	Familia	Espécie	TPI FS	TPI CULT	ADJ FS	ADJ CULT
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus circulans strain Q11	1			
				Bacillus cereus strain Z2B-73			1	
				Bacillus sp. enrichment culture clone M2			2	
			Staphylococcaceae	Staphylococcus caprae strain cT201	3	1		
				Uncultured bacterium clone A3-23	2		3	2
				Staphylococcus sp. CUL-LABLG2X2		10		
				Uncultured Staphylococcus sp. clone YHSS12		11		
				Bacterium LimA-1-J-5			2	1
				Staphylococcus haemolyticus strain HNS011			5	
				Staphylococcus sp. F1			4	
				Staphylococcus sp. SeLB4			5	1
				Staphylococcus sp. SRM1B			2	
				Uncultured Staphylococcus sp. clone VA16_27			1	
				Staphylococcus haemolyticus MFPB11A17-05				1
				Staphylococcus sp. CIFRI P-TSB-53				5
				Staphylococcus sp. PrNA7				1
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas sp. SeLB7	5			
				Sphingomonas aquatilis strain JSS-7		2		
	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia cepacia strain KCTC 11096BP	1	1		
				Burkholderia pyrrocinia strain JK-SH007	1		1	1
				Burkholderia sp. SJ98	1			
				Burkholderia sp. TAt-045	1			
				Burkholderia tropica strain TAt-0750	1		1	1
				Uncultured Burkholderia sp. clone GI7-1-G23	1			1
				Uncultured Burkholderia sp. clone YYLS316	1		1	
				Burkholderia sacchari strain IPT10		1		
				Burkholderia glumae BGR1			1	
				Burkholderia sp. AB120			1	1
				Burkholderia sp. OX-01			1	1
				Burkholderia unamae isolate TR3.4			1	1
				Burkholderia nodosa , type strain Br3437T				1
				Burkholderia tropica strain MTo-672				1

# Tabela 2.17 - Afiliação taxonômica dos isolados bacterianos e distribuição entre os sítios analisados

Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	Aeromonas caviae strain JXZ-3	1			
			Aeromonas sp. B2RO26	4			
	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas chlor. subsp. aureofaciens DH1	2			
			Pseudomonas fulva 12-X	2			
			Pseudomonas panipatensis strain Ybs-T1	2			
			Pseudomonas plecoglossicida strain PNP-F5	1			
			Pseudomonas putida, isolate BBN2	1			
			Pseudomonas putida strain AS30	1			
			Pseudomonas putida strain L1-5	14			
			Pseudomonas sp. 9-1	2			
			Pseudomonas sp. CMR5c	1			
			Pseudomonas sp. IBUN C25	4			
			Pseudomonas sp. JDC-7	1			
			Pseudomonas sp. TV5PF1	1			
			Pseudomonas sp. WAB1930, strain WAB1930	9			
			Uncultured bacterium clone ncd2496h05c1	1			
			Uncultured Pseudomonas sp. U000130432	2			
			Pseudomonas fluorescens strain S181R		4		
			Pseudomonas sp. SCT-1		1		
			Uncultured bacterium clone ncd2687g02c1				
	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Raoultella ornithinolytica isolate PSB16		1		
			Serratia marcescens strain AKL1		7		
			Serratia marcescens strain H14		1		
			Serratia marcescens strain MH6		6		
			Serratia sp. NB2		4		
			Serratia sp. VC-YC6643		7		
			Enterobacter sp. INBio3713E			1	
			Enterobacter sp. SA-A5-114		1	2	
	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas sp. SeaH-As3S		1		

Estes filos incluem milhares de representantes e correspondem de 90 a 95 % de todas as espécies bacterianas conhecidas atualmente (NUNES, 2006). Em estudos recentes realizados com o objetivo de estimar a diversidade bacteriana em solos de TPI por meio de técnicas moleculares independentes de cultivo, Cannavan (2007) reportou que o filo Firmicutes foi o mais dominantes em sítios de TPI da Amazônia Central, representando aproximadamente 38 % do total de sequências analisadas. De modo distinto, este estudo revelou a dominância de espécies do filo Proteobacteria isoladas a partir dos quatro sítios estudados. Este filo inclui espécies do gênero Pseudomonas, extensamente descrita como dominante entre os gêneros bacterianos envolvidos em processos funcionais de mineralização de hidrocarbonetos no solo (MA et al., 2006), com vários isolados identificados nos sítios analisados neste estudo. O filo Proteobacteria constitui o maior e mais diverso grupo de bactérias cultivadas, apresentando grande diversidade de morfologia e metabolismo, com cinco grandes subdivisões: Alfaproteobacteria, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria e Gamaproteobacteria. Neste estudo, as subdivisões Alfa, Beta e Gamaproteobacteria foram encontradas nos isolados dos sítios de TPI e ADJ, sendo que a subdivisão Alfaproteobacteria foi somente identificada nos solos de TPI.

Paralelamente, o gênero Firmicutes, com representantes gram-positivos aeróbicos e anaeróbicos, é constituído por organismos que apresentam metabolismo caracterizado por homo e heterofermentação e respiração. São bactérias com baixa porcentagem de G+C o seu DNA e com vários representantes formadores de esporos, estratégia utilizada para sobrevivência em condições de limitação de água e nutrientes. Pode constituir o filo dominante em ambientes com baixa competição, mas também pode ser encontrado em ambientes instáveis, que estejam passando por grandes transições (ATLAS; BARTHA, 1997).

O domínio *Bacteria* compreende atualmente 84 filos e filos candidatos, com base na sequência do gene ribossomal 16S rRNA, de acordo com a taxonomia de Hugenholtz disponível no banco de dados do *Greengenes*, 2012 (<u>http://greengenes.lbl.gov</u>). Segundo Lewinsohn e Prado (2002), estima-se que no Brasil exista um número entre 300 a 450 de espécies de bactérias descritas e conhecidas, enquanto que, mundialmente, o número de bactérias descritas seja em torno de 5000 espécies. Estes números, relativamente pequenos em relação à quantidade imensurável de espécies estimadas no solo, representam apenas uma pequena fração da diversidade bacteriana, principalmente nos solos tropicais da Amazônia (SILVA, 2011). Os solos de TPI apresentaram maior diversificação de filotipos do que os solos

adjacentes, o que pode demonstrar o imenso potencial das bactérias destes solos para processos de importância biotecnológica. A natureza bastante singular destes solos pode favorecer o desenvolvimento de novas vias metabólicas. Além disso, a vasta diversidade genética dos microrganismos presentes nestes solos antrópicos pode fornecer dados para futuros estudos visando a bioprospecção de genes a partir de DNA total do solo.

## 2.5 Conclusões

O teste com o 2,6-diclorofenol-indofenol utilizado com os isolados de solo mostrou ser um método rápido, de fácil metodologia e eficiente para determinar o potencial de degradação dos hidrocarbonetos naftaleno, fenantreno e bifenil, por bactérias, em um prazo de 24 horas. A metodologia pode ser empregada em testes rápidos para triagem de bactérias com potencial de degradação de hidrocarbonetos. O isolamento de bactérias do solo permitiu a formação de um banco de germoplasma de microrganismos que pode ser aproveitado em análises envolvendo triagens de bactérias com grande diversidade metabólica, além de testes envolvendo outros subprodutos bacterianos, como a produção de antibióticos e outras enzimas.

A partir dos resultados do sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S rRNA dos isolados positivos no bioensaio de degradação foi possível observar a predominância de gêneros bacterianos estreitamente relacionados a processos de biodegradação, como por exemplo, *Pseudomonas, Burkholderia, Sphingomonas* além de representantes dos gêneros *Bacillus, Staphylococcus, Enterobacter, Serratia,* entre outros, anteriormente discutidos. Com esses resultados também foi possível observar diferenças na comunidade bacteriana quando comparados os diferentes sítios analisados. Alguns gêneros foram exclusivos de cada sítio, o que mostra uma diferença na comunidade bacteriana de acordo com o tipo de solo (TPI e ADJ) e seu uso (FS e CULT), sendo que os solos de TPI apresentaram maior quantidade e número de filotipos potencialmente degradadores do que os sítios ADJ o que demonstra o imenso potencial das bactérias dos solos de TPI para processos de importância biotecnológica.

Apesar de os solos de TPI estudados não possuírem hidrocarbonetos aromáticos em nível de contaminação, como ambientes impactados com petróleo e seus derivados, a floresta amazônica comporta uma enorme variabilidade na composição da sua cobertura vegetal, abrigando inúmeras espécies de árvores e plantas de menor porte, com grande diversidade de

produtos do metabolismo secundário, que envolve exsudatos vegetais aromáticos de todas as classes, como derivados benzênicos com grande variação na composição de sua estrutura. Além disso, as áreas agricultáveis de TPI também possuem grande variabilidade de cobertura do solo, e essa diversidade, tanto na composição vegetal como nas propriedades químicas destes solos, deve estar diretamente relacionada à extensa diversidade biológica da microbiota presente em TPI.

A natureza bastante singular destes solos pode favorecer o desenvolvimento de novas vias metabólicas a partir dos microrganismos, com capacidade competitiva em ações de biorremediação e biodegradação de ambientes impactados e os resultados demonstram o extenso potencial metabólico dos solos TPI, visto que pouco se sabe até o presente sobre a possibilidade de aplicação de microrganismos de solos de formação antropogênica em processos de biodegradação.

#### Referências

AL-HADHRAMI, M.N.; LAPPIN-SCOTT, H.M.; FISHER, P.J. Bacterial survival and n- lkane degradation within Omani crude oil and a mousse. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 30, n. 6, p. 403-408, 1995.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.L. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403-410, 1990.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. Microbial evolution and biodiversity: the origins of life. In: ATLAS, R.M.; BARTHA, R. (Ed.). **Microbial ecology**: fundaments and applications. 4. ed. Menlo Park: Book News, 1997. p. 37-39.

BAMFORTH, S.M.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, Oxford, v. 80, n. 7, p. 723-736, 2005.

BHATTACHARYA, D.; SARMA, P.M.; KRISHNAN, S.; MISHRA, S., LAL, B. Evaluation of genetic diversity among Pseudomonas citronellolis strains isolated from oily sludge contaminated sites. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 1435–1441, 2003.

CANNAVAN, F.S. **Diversidade das comunidades bacterianas em solos de Terra Preta Antropogênica da Amazônia Central e Oriental**. 2007. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007. CERNIGLIA, C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 3, p. 351-368, 1992.

CLEMENTE, A.R.; ANAZAWA, T.A.; DURRANT, L.R. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil fungi. **Brazilian Journal of Microbioloy**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 4, p. 255-261, 2001.

CRAPEZ, M.A.C.; BORGES, A.L.N.; BISPO, M.G.S.; PEREIRA, D.C. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 179, p. 32-37, 2002.

CUNHA, T.J.F.; NOVOTNY, E.H.; MADARI, B.E.; BENITES, V.M.; MARTIN-NETO, L.; SANTOS, G.A. O carbono pirogênico. In: TEIXEIRA, W.G.; KERN, D.C.; MADARI, B.E.; LIMA, H.N.; WOODS, W. (Ed.). As Terras Pretas de Índio da Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009. p. 264-285.

FALCÃO, N.; MOREIRA, A.; COMENFORD, N.B. A fertilidade dos solos de Terra Preta de Índio da Amazônia Central. In: TEIXEIRA, W.G.; KERN, D.C.; MADARI, B.E.; LIMA, H.N.; WOODS, W. (Ed.). As Terras Pretas de Índio da Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009. p. 189-200.

GLASER, B.; HAUMAIER, L.; GUGGENBERGER, G.; ZECH, W. The 'Terra Preta' phenomenon: a model for sustainable agriculture in the humid tropics. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 88, p. 37-41, 2001.

GORIS, J.; DE VOS, P.; CABALLERO-MELLADO, J.; PARK, J.H.; FALSEN, E.; QUENSEN III, J.F.; TIEDJE, J.M.; VANDAMME, P. Classification of the PCB and biphenyl-degrading strain LB400 and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. **International Journal of Systematic an Evolutionary Microbiology,** Washington, DC, v. 54, p. 1677-1681, 2004.

HANSON, K.G.; DESAI, J.D.; DESAI, A.J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, Weinheim, v. 7, p. 745-748, 1993.

HEAD, I.M.; JONES, D.M.; ROLING, W.F. Marine microorganisms make a meal of oil. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, p. 173–182, 2006.

IRVINE, V.A.; KULAKOV, L.A.; LARKIN, M.J. The diversity of extradiol dioxygenase (edo) genes in cresol degrading rhodococci from a creosote-contaminated site that express a wide range of degradative abilities. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 78, p. 341–352, 2000.

JACQUES, R.J.S.; BENTO, F.M.; ANTONIOLLI, Z.I.; CAMARGO, F.A.O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, p. 1192-1201, 2007.

KADRI, M.H.; SALEM, A.A.; SALMA, M. Oil degrading bacteria in Kuwait Bay. Journal of Marine Science, Oxford, v. 15, p. 50-51, 1986.

LENNETTE, E.H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W.J.; SHADOMY, H.J. Manual of clinical microbiology. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1985.

LEYS, N.M.; RYNGAERT, A.; BASTIAENS, L.; WATTIAU, P.; TOP, E.M.; VERSTRAETE, W.; SPRINGAEL, D. Occurrence and community composition of fast growing Mycobacterium in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 51, p. 375-388, 2005.

LIANG, B.; LEHMANN, J.; SOLOMON, D.; KINYANGI, J.; GROSSMAN, J.; O'NEILL, B.; SKJEMSTAD, J.O.; THIES, J.; LUIZÃO, F.J.; PETERSEN, J.; NEVES, E.G. Black carbon increases cation exchange capacity in soils. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 70, p. 1719–1730, 2006.

MANDRI, T.; LIN, J. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microrganisms in Kwazulu- Natal, South Africa. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi v. 6, p. 23-27, 2007.

MARIANO, A.P.; KATAOKA, A.P.A.G.; ANGELIS, D.F.; BONOTTO, D.M. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 38, p. 346-353, 2007.

MA, Y.; WANG, L.; SHAO, Z. Pseudomonas, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 455-465, 2006.

NAIR, D.; FERNANDEZ-ACERO, F.J.; GARCIA-LUQUE, E.; RIBA, I.; DEL VALLS, T.A. Isolation and characterization of naphthalene-degrading bacteria from sediments of Cadiz area (SW Spain). **Environmental Toxicology**, New York, v. 23, p. 576–582, 2008.

NEUBAUER, S.C.; EMERSON, D.; MEGONIGAL, J.P. Life at the energetic edge: kinetics of circumneutral iron oxidation by lithotrophic iron-oxidizing bacteria isolated from the wetland-plant rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, p. 3988-3995, 2002.

NUBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; KUHL, M.; MUYZER, G. Quantifying microbial diversity: morphotypes, 16S rRNA genes and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 422-443, 1999.

NUNES, G.L. **Diversidade e estrutura de comunidades de Bacteria e Archaea em solo de mangue contaminado com hidrocarbonetos de petróleo**. 2006. 84 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

OREMLAND, R.S.; STOLZ, J.F. The ecology of arsenic. **Science**, Washington, DC, v. 300, p. 939-944, 2003.

ROSENBERG, M.; GUTNICK, D.L. The hydrocarbon-oxidizing bacteria. In: STARR, M.P.; STOLP, H.; TRUPER, G.H.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H.G. **The prokaryotes**. New York: Springer-Verlag, 1981.

SANCHEZ, P.A.; VILLACHICA, J.H.; BANDY, D.E. Soil fertility dynamics after clearing tropical rainforest in Peru. Soil Science Society of America Journal, Madison, v. 47, p. 1171-1178, 1983.

SENTCHILO, V.S.; PEREBITUK, A.N.; ZEHNDER, A.J.; VAN DER MEER, J.R. Molecular diversity of plasmids bearing genes that encode toluene and xylene metabolism in *Pseudomonas* strains isolated from different contaminated sites in Belarus. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 2842-2852, 2001.

SEO, J.; KEYN, Y.; LI, Q.X. Bacterial degradation of aromatic compounds. **International** Journal of Environmental Research and Public Health, Basel, v. 6, p. 278-309, 2009.

SILVA, M.G.G. **Diversidade funcional em solos de Terra Preta de Índio da Amazônia e carvão pirogênico**. 2011. 187 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

SMETS, B.F.; RITTMANN, B.E.; STAHL, D.A. The specific growth rate of *Pseudomonas putida* PAW1 influences the conjugal transfer rate of the TOL plasmid. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 59, p. 3430-3037, 1993.

SORKHOH, N.A.; GHANNOUMA, M.A.; IBRAHIMA, A.S.; STRETTONB, R.J.; RADWAN, S.S. Crude oil and hydrocarbon-degrading strains of *Rhodococcus rhodochous* isolated from soil and marine environment in Kuwait. **Environmental Pollution**, Essex, v. 65, p. 1-17, 1990.

STACH, J.E.M.; MALDONADO, L.A.; MASSON, D.G.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M.; BULL, A.T. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 6189-6200, 2003.

STIRLING, D. DNA extraction from fungi, yeast and bacteria. In: BARTLETT, J.M.S.; STIRLING, D. **Methods in molecular biology**: PCR Protocols. 2. ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2003. cap. 13, p. 53-54.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WHYTE, L.G.; BOURBONNIERE, L.; GREER, C.W. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic Pseudomonas strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 3719–3723, 1997.

## 3 Diversidade de genes catabólicos em solos de Terra Preta de Índio e seus adjacentes

## **RESUMO**

Genes catabólicos desenvolvem um papel importante na degradação de compostos aromáticos, participando também da ciclagem da matéria orgânica no solo e, assim, na dinâmica do ciclo biogeoquímico do carbono. Estudos buscando acessar a diversidade funcional microbiana em amostras ambientais têm demonstrado que somente uma fração dos genes presentes no ambiente é detectada. Sendo assim, algumas estratégias vêm sendo utilizadas a fim de analisar as relações entre o funcionamento dos ecossistemas e sua comunidade microbiana. O objetivo deste estudo foi estimar e analisar a diversidade do gene catabólico (bph) em comunidades bacterianas presentes nos solos TPI e ADJ, além de estimar o número de cópias deste gene nos solos estudados. A metodologia foi baseada na construção de bibliotecas de clones e pirosequenciamento das amostras para o gene bph e também na realização de PCR quantitativa. Os valores dos índices de heterogeneidade de Shannon e Simpson revelaram maior diversidade tanto para as bibliotecas, como para o pirosequenciamento, para os solos de TPI. O mesmo aconteceu com os índices de riqueza Chao 1, ACE e Jackknife, os quais foram maiores para os solos de TPI em ambas as metodologias. As relações filogenéticas entre as sequências encontradas neste estudo, e as do banco de dados (NCBI) usadas como referências, revelaram a formação de grupos bastante heterogêneos, com vários clusters, incluindo dioxigenases unicamente encontradas nos solos de TPI. Apesar dos diferentes sistemas de uso da terra, foi possível observar que a diversidade nos solos de TPI é fortemente influenciada pelo manejo histórico destes solos, e que suas características podem contribuir para a construção de uma estrutura estável para a sobrevivência de comunidades bacterianas envolvidas em processos específicos no solo. O número de cópias do gene bph foi maior nos solos de TPI quando comparados com seus solos ADJ. As abordagens baseadas em genes específicos, como realizado neste estudo, podem prover uma melhor compreensão da biologia envolvida na diversidade de ambientes tropicais altamente antropizados como as Terras Pretas de Índio da Amazônia.

Palavras-chave: Bacteria. Genes catabólicos. Bibliotecas de clones. Pirosequenciamento. qPCR.

## ABSTRACT

Catabolic genes develop an important role in the degradation of aromatic compounds, also participating in the cycling of soil organic matter, and thus the dynamics of the carbon biogeochemical cycle. Studies seeking to access the functional microbial diversity in environmental samples have shown that only a fraction of genes in the environment is detectable. Therefore, some strategies have been used to examine the relationships between the functioning of ecosystems and their microbial community. The aims of this study were to estimate and analyze the diversity of the catabolic gene (bph) in bacterial communities present in TPI and ADJ soil samples, and estimate the number of copies of this gene in these soils. The methodology was based on the functional construction of libraries and pyrosequencing, both for the bph gene and also in carrying out quantitative PCR. The Shannon and Simpson heterogeneity index values revealed greater diversity, for clone libraries and pyrosequencing, in TPI soils. The same pattern was observed for Chao 1, ACE and Jackknife species richness index values, which were higher for TPI soils in both approaches. Phylogenetic relationships among the sequences observed in this study and the database (NCBI) sequences used as references revealed the formation of a heterogeneous group, with several clusters, including specifics dioxygenases from TPI soils. Despite the different systems of land use, prevalent in the sites analyzed, we observed that the diversity in TPI soils is strongly influenced by their historical management, and that their characteristics can contribute to building a stable structure for the survival of bacterial communities involved in specific processes in the soil. The number of *bph* gene copies was higher in TPI than in ADJ soils. Deep-sequencing based approaches for specific genes, as performed in this study, may provide a better understanding of the biology involved in highly diverse tropical environments anthropized as TPI soils from Brazilian Amazon soils.

Keywords: Bacteria. Catabolic Genes. Clones Libraries. Pyrosequencing. qPCR

## 3.1 Introdução

A busca pela biodiversidade e bioprospecção de novos microrganismos tornou-se uns dos principais focos da era biotecnológica, onde a utilização destes organismos na busca de soluções em várias áreas do conhecimento vem crescendo, não apenas pela extraordinária capacidade em produzir uma grande variedade de metabólitos, mas também pela sua adaptabilidade genética.

Diversos grupos bacterianos são capazes de degradar hidrocarbonetos por expressarem genes catabólicos de dioxigenases e outras enzimas envolvidas nos processos de biodegradação. A caracterização de análogos distintos destes grupos pode permitir respostas às questões referentes à significância ecológica, distribuição relativa e transmissão de diferentes oxigenases intra e interespécies ou mesmo entre grupos distintos, como resultado de uma possível resposta adaptativa aos diferentes ambientes e à especificidade a certas classes de substratos (BALDWIN et al., 2003).

Proteobactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia* são comumente encontradas no solo e têm sido descritas como capazes de expressar genes catabólicos envolvidos na biodegradação de compostos altamente poluentes, como os hidrocarbonetos aromáticos. Estes organismos executam reações enzimáticas que são incomuns em outros grupos filogenéticos, e adquiriram enorme vantagem adaptativa pela capacidade de utilizar estes substratos. Grupos semelhantes de bactérias foram recentemente encontrados em amostras de Terra Preta de Índio (TPI) na Amazônia Central, com a detecção de genes catabólicos, em um estudo sobre diversidade funcional em solos de TPI (SILVA, 2011).

Genes catabólicos desenvolvem um importante papel na degradação de compostos aromáticos, participando ativamente da ciclagem da matéria orgânica do solo e, portanto, na dinâmica do ciclo biogeoquímico do carbono (BECHER et al., 2000; KASUGA et al., 2001; IIDA et al., 2006).

As dioxigenases aromáticas, presentes em genes catabólicos consistem de uma cadeia de transporte de elétrons e uma oxigenase terminal com duas subunidades (KIM et al., 2006). A subunidade maior ou alfa da oxigenase terminal é o componente enzimático responsável pelo reconhecimento do substrato, além de ser muito utilizada para estudos de diversidade funcional por refletir afiliação filogenética, uma vez que é relativamente mais conservada que

os outros componentes da enzima (KAUPPI et al., 1998; NAM et al., 2001). Estas enzimas estão envolvidas na etapa de oxidação inicial de hidrocarbonetos aromáticos, considerada crucial nos processos de biodegradação.

Estudos envolvendo dioxigenases aromáticas presentes em ambientes impactados e pristinos podem favorecer a compreensão das relações funcionais e evolutivas entre estes genes bacterianos, e o conhecimento da extensão da atividade enzimática pode ser utilizado na aplicação destas enzimas em processos específicos, como bioconversão e biorremediação.

É possível encontrar na literatura trabalhos que utilizam *primers* capazes de detectar genes de dioxigenases aromáticas no ambiente (WILSON et al., 1999; BALDWIN et al., 2003; SEI et al., 2004; IWAI et al., 2005; 2008; 2010). Em um estudo envolvendo a diversidade funcional de genes de dioxigenases no ambiente, Iwai et al. (2010), utilizou regiões altamente conservadas das sequências de aminoácidos de genes das famílias de dioxigenases de tolueno e bifenil, para desenhar *primers* degenerados, chamados de BPHD. Estes *primers* amplificam uma fração de aproximadamente 500 pb da subunidade maior de dioxigenases aromáticas, cuja variabilidade é suficiente para estimar a diversidade genética destes genes a partir de amostras ambientais.

Nesse contexto, a compreensão da diversidade funcional associada com a degradação da matéria orgânica, não somente em solos de Terra Preta, mas nos solos em geral, pode constituir um grande desafio para o entendimento de processos biológicos, como uma tentativa de descrever a diversidade funcional desses ambientes (TSAI et al., 2009).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi analisar e estimar a diversidade de genes de dioxigenases aromáticas em comunidades bacterianas presentes em solos de TPI e seus solos adjacentes (ADJ), baseado em técnicas moleculares. Com a finalidade de produzir dados com níveis de informação e confiabilidade elevados, este estudo analisou a diversidade de genes de dioxigenases por meio de construções de bibliotecas de genes e pirosequenciamento do gene *bph*. Para tal, foram utilizados os *primers* degenerados BPHD desenvolvidos por Iwai et al. (2010). De forma a complementar as informações sobre a diversidade de genes funcionais, também foi utilizada a técnica de PCR quantitativa em tempo real aplicada ao gene *bph*.

A caracterização de genes envolvidos na síntese de enzimas degradadoras de poluentes e xenobióticos poderá disponibilizar informações importantes sobre o comportamento de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, bem como prover informação sobre a síntese de genes envolvidos em vias degradadoras para estudos de bioprospecção gênica, visando a busca por novas atividades catalíticas para fins químicos e biotecnológicos, refletindo o ilimitado poder da bioquímica microbiana em solos tropicais, como o solo de Terra Preta de Índio da Amazônia.

## **3.2 Objetivos**

Estudo da diversidade funcional do gene que codifica para a enzima bifenil dioxigenase (*bph*) em solos de sítios de Terra Preta de Índio e adjacentes por meio da construção de bibliotecas funcionais e pirosequenciamento;

Quantificação do gene *bph* e 16S rRNA, por meio da técnica de PCR quantitativa, com a finalidade de estabelecer relações entre o número de cópias do gene e sua diversidade, em função dos diferentes tipos de solo (Terra Preta de Índio e Adjacente).

## 3.3 Materiais e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, CENA/USP, Piracicaba-SP.

# 3.3.1 Áreas de estudo

A descrição detalhada das áreas de estudo e amostragem estão disponíveis na seção 1.4 Materiais e Métodos, subseção 1.4.2 Áreas de estudo e amostragem (página 35, capítulo 1). Brevemente, a área de estudo está localizada na Embrapa Amazônia Ocidental (Estação Experimental do Caldeirão, Iranduba, AM). Para acessar bactérias potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos em sítios de TPI e seus respectivos sítios ADJ foi selecionado um sítio sob floresta secundária (FS) e outro sob plantio de mandioca (CULT) para cada sítio (TPI e ADJ). A coleta para este estudo foi realizada em janeiro de 2009 e janeiro de 2011.

## 3.3.2 Extração do DNA total da comunidade microbiana do solo

O DNA total presente nas amostras dos solos foi extraído em triplicata utilizandose o Kit *Power Soil DNA extraction* (MoBio, Carlsbad, CA). Em microtubo contendo micro esferas de vidro foram adicionados 0,25 g de amostras de solo e agitados gentilmente para homogeneização das amostras. O DNA total do solo foi extraído de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

Para a quantificação do material extraído, alíquotas de 5  $\mu$ l foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1 % (p.v⁻¹) e coradas com brometo de etídio (0,5  $\mu$ g.mL⁻¹ de gel). Como padrão molecular foram utilizados 2  $\mu$ l de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Life Technologies). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 minutos e posteriormente registrado em foto-documentador sob luz UV.

O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro, adotando-se a relação 1,0 densidade ótica a 260 nm (OD 260) como sendo igual a 50 ng de DNA. $\mu$ l⁻¹ (SAMBROOK et al., 1989). O DNA extraído foi armazenado à -20 °C.

## 3.3.3 Amplificação por PCR do gene bph e purificação dos amplicons

O DNA total da microbiota dos solos foi submetido à amplificação com *primers* degenerados BPHD F0 e BPHD R1 (Tabela 3.1), que amplificam um produto de 940 pb. Soluções "mix" foram preparadas para as reações de amplificação com os reagentes dNTPs (0,2 mM.base⁻¹); tampão 10X (Tris-base a 200 mM, pH 8,4; KCl a 500 mM) (1X); MgCl₂ (1,5 mM); *Taq* DNA polimerase (1U); *primers* (25 pmol.reação⁻¹); DNA (40 ng.reação⁻¹), e água ultra pura estéril (Milli-Q) para volume final de 25 μL. Os ciclos utilizados foram: um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45

segundos; anelamento dos *primers* a 60 °C por 45 segundos, e extensão a 72 °C por 40 segundos; um ciclo de extensão final a 72 °C por 5 minutos e manutenção a 4 °C. Os resultados das amplificações foram verificados pela visualização dos fragmentos em gel de agarose de 1,0 % e o padrão de peso molecular utilizado foi o *Low Mass Ladder*[™] (Invitrogen Life Technologies).

Primer	(5'-3')
BPHD-F0	TAYATGGGBGARGAYCCIGT
BPHD-R1	ACCCAGTTYTCICCRTCGTC

Tabela 3.1 Primers utilizados para detecção e sequenciamento do gene bph

Os fragmentos amplificados foram purificados em coluna de matriz de fibra de vidro *GFXTM PCR-DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), ressupendidos em água ultra pura (Milli-Q) e quantificados em gel de agarose a 1 %, para verificação do rendimento da purificação.

## 3.3.4 Construção de bibliotecas funcionais

#### 3.3.4.1 Clonagem dos fragmentos amplificados

Depois do processo de purificação, 3  $\mu$ L dos amplicons obtidos para cada solo TPI e ADJ foram quantificados em gel de agarose a 1 % com o *marcador Low Mass DNA Ladder*TM (Invitrogen Life Technologies), para determinação da quantidade de inserto a ser utilizada na ligação com o vetor. A clonagem dos fragmentos foi feita utilizando-se células de *E. coli* quimio-competentes e o kit de clonagem *pGEM-T Easy Vector System* (Promega), conforme as instruções do fabricante.

A reação de ligação inserto-vetor foi feita a 4°C, por 12 horas, e posteriormente armazenada a -20°C.

Três microlitros da ligação (aproximadamente 10 ng do inserto) foram utilizados para transformar 50  $\mu$ L de células quimio-competentes da linhagem de *E. coli* DH5 $\alpha$ . A quimio-transformação foi realizada adicionando-se os tubos contendo as células competentes, juntamente com os produtos da ligação em banho de gelo por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram transferidos para banho-maria a 42 °C por 50 segundos e retornados ao banho de gelo por mais 2 minutos. Após a transformação, as células foram recuperadas em 450  $\mu$ L de meio Luria Bertani-LB líquido (Triptona 10 g.L⁻¹, extrato de levedura 5 g.L⁻¹ e NaCl 5 g.L⁻¹) e incubadas sob agitação a 37 °C por duas horas.

Em seguida, o volume total das células transformadas foi inoculado por espalhamento em placas de ágar Luria Bertani-LB (Triptona 10 g.L⁻¹, extrato de levedura 5 g.L⁻¹ e NaCl 5 g.L⁻¹), contendo ampicilina, IPTG e X-Gal (estoques a 100 mg.mL⁻¹), e incubadas a 37 °C por 16 horas.

O vetor utilizado possui o sistema de expressão gênica induzido pelo IPTG e sinalizado pelo indicador X-Gal (beta galactosidase); assim, os clones que recebem o inserto ligado ao vetor transformado apresentam coloração branca e os demais, sem o fragmento apresentam coloração azul (indicando a expressão do gene lacZ). Desta forma, as colônias brancas, correspondentes aos possíveis clones positivos, foram transferidas individualmente para placas de 96 poços contendo 50 µL de tampão TE 1X, com o auxílio de palitos de madeira autoclavados. Estas placas foram então submetidas à temperatura de 95 °C por 10 minutos em termociclador, para promover a lise celular, e armazenadas a -20 °C, para futuras aplicações. Foram selecionadas 100 colônias de cada sítio de totalizando 400 clones, para posterior sequenciamento dos mesmos.

## 3.3.4.2 Detecção do inserto nos clones e preparo das sequências para sequenciamento

Após a clonagem e seleção das colônias brancas, a confirmação da presença do inserto foi realizada através da amplificação direta a partir do inserto diluído em TE 1X com os *primers* do vetor (promotores SP6 e T7), sem a necessidade de extração do DNA plasmidial.

O "mix" de PCR foi preparado contendo: tampão 1X (20 mM Tris/HCI, pH 8,4; 50 mM KC1), 1,5 mM de MgC1₂, 0,1 mM de dNTPs, 5 pmol.reação⁻¹ de cada *primer* (SP6 e T7) e 1,5 U de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen Life Technologies), além de água

ultra-pura para volume final de 50 µL. O programa de amplificação consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, 30 ciclos de 94° C por 1 minuto, 50 °C por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos, além de um ciclo de extensão final de 72 °C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1 %, com padrão de peso molecular *Low DNA Mass Ladder*TM (Invitrogen Life Technologies).

Em seguida, os amplicons foram submetidos à purificação em placas de 96 poços, onde foram adicionados 135  $\mu$ L (3 volumes) de isopropanol 100 % e 45  $\mu$ L (1 volume) de água ultra-pura (Milli-Q), e a mistura foi homogeneizada e incubada a -20 °C por 12 horas.

Após incubação, as placas foram centrifugadas a 4000 rpm por 90 minutos a temperatura ambiente, e o sobrenadante foi totalmente descartado por inversão da placa. Adicionou-se 150  $\mu$ L de etanol 70 % e as placas foram novamente homogeneizadas e centrifugadas a 4000 rpm por 90 minutos à temperatura ambiente; o sobrenadante foi novamente descartado.

Finalmente, as amostras foram colocadas no concentrador de DNA por 10 minutos, e seguiu-se a eluição em 15  $\mu$ L de água ultra-pura (Milli-Q). A pureza do material foi novamente verificada em gel de agarose a 1 %.

Para o sequenciamento, 5  $\mu$ L do produto purificado (aproximadamente 20 ng) foi utilizado na reação de amplificação com o *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (GE Healthcare) conforme instruções do fabricante, e utilizou-se os *primers* BPHD F1 para amplificação da sequência-alvo.

As reações de sequenciamento foram purificadas adicionando-se 2  $\mu$ L de uma solução de acetato de sódio a 1,5 M, EDTA a 0,25 M e, após homogeneização, adicionou-se 60  $\mu$ L de etanol a 100 %. As amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 45 minutos em temperatura ambiente, e o sobrenadante foi descartado por inversão da placa. Adicionou-se 150  $\mu$ L de etanol a 70 %, a mistura foi homogeneizada e centrifugada a 4.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e os precipitados foram colocados no concentrador de DNA por 10 min. Em seguida, os produtos foram eluídos em 10  $\mu$ L de formamida e sequenciados em sequenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

## 3.3.4.3 Análise das sequências e medidas de diversidade

A análise das sequências foi feita com base nos eletroferogramas gerados pelo *software* Sequencing Analysis 3.0. As sequências nucleotídicas obtidas tiveram seus cromatogramas analisados pelo *script* Lucy presente no *pipeline* do RDP, o qual realizou a edição e remoção do *primer*, a fim de estabelecer as sequências e remover as bases com baixa qualidade. O nível de exigência mínimo foi de 400 bases com qualidade acima de 20 (um erro a cada 100 bases lidas).

Em seguida, as sequências foram comparadas com aquelas disponibilizadas no banco de dados *GenBank* do Centro de Informação Biotecnológica (NCBI, USA), utilizando-se a ferramenta tblastx (ALTSCHUL et al., 1990).

A ferramenta tblastx, disponível no NCBI (<u>www.ncbi.nlm.nih.gov</u>), compara sequências nucleotídicas obtidas por sequenciamento com o banco de proteínas traduzidas disponível no *GenBank*. Para tal, as sequências de nucleotídeos são traduzidas *in silico* pelo *software* conforme as sequências de códons que codificam os aminoácidos correspondentes, e então compara uma a uma com aquelas já depositadas.

Para a análise das medidas de diversidade das bibliotecas do gene *bph* de bacteria obtidas para os diferentes sítios de TPI estudados e os respectivos solos adjacentes, utilizou-se o programa MOTHUR (SCHLOSS et al., 2009). A plataforma MOTHUR constitui um *software* abrangente, que permite aos usuários utilizar um único programa para analisar os dados de sequências de comunidades. Este pacote baseia-se em ferramentas anteriores (DOTUR, SONS, TreeClimber, LIBSHUFF, J-Libshuff e UniFrac) para fornecer um *software* flexível e robusto para análise de dados de sequenciamento.

O número de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) foi determinado considerando-se uma distância evolutiva (*cut-off*) de 0,06. A riqueza de UTOs foi estimada mediante o cálculo de curvas de rarefação e dos estimadores ACE, Chao1 e *Jackknife*, e a heterogeneidade das comunidades de *bph* foi verificada com os índices de *Shannon* e *Simpson*. Comparações assimétricas pareadas entre diferentes bibliotecas também foram realizadas para determinar a significância das diferenças entre elas, por meio do software  $\int$ -Libshuff (SCHLOSS et al., 2004), integrado na plataforma MOTHUR.

Métodos paramétricos e não paramétricos têm sido utilizados para estimar a riqueza de espécies (filotipos) em comunidades microbianas de amostras ambientais (BOHANNAN; HUGHES, 2003; SHEN et al., 2003; CHAO et al., 2006). Estimativas do aumento de filotipos em função do número de sequências de um determinado nível filogenético podem ser analisadas pelo método da rarefação, que reflete o esforço amostral da análise de um experimento. Outros métodos são utilizados para estimar a riqueza de filotipos de uma determinada comunidade, assim como o estimador de riqueza *Jackknife*, que se baseia na frequência de espécies raras observadas na amostra. Também pode se utilizar métodos não-paramétricos, como o estimador Chao1, capaz de produzir estimativas que também variam com o número de sequências. Também foi determinado neste estudo o estimador de riqueza ACE, baseado no conceito de cobertura de amostra.

Em 1949, Simpson propôs a primeira medida não-paramétrica para analisar a diversidade, a qual considerava que a diversidade é inversamente reportada pela probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso pertencerem à mesma espécie. Entretanto, a medida mais utilizada para estimar a diversidade de espécies é o índice de *Shannon* (H') (SHANNON; WEANER, 1949), que se baseia na teoria da informação, e é considerada uma medida da incerteza de que duas sequências pertençam ao mesmo filotipo ou espécie (KREBS, 1998).

Para verificar UTOs únicas para cada solo, e aquelas que se encontravam em mais de um solo, foram construídos Diagramas de Venn (FAUTH et al., 1996).

Por fim a partir do agrupamento das sequências dos clones baseado na similaridade de 94 % entre as sequências do mesmo grupo (*cut-off* 0,06), foram escolhidas uma representante de cada UTO para as construções filogenéticas. O alinhamento foi realizado no programa ClustalW (LARKIN et al., 2007) e os agrupamentos filogenéticos foram construídos no programa MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2007), pelo método de *Maximum-likelihood* com valor de *bootstrap* (reamostragem) de 500 repetições.

# 3.3.5 Pirosequenciamento de genes funcionais em solos TPI e ADJ

# 3.3.5.1 Amplificação do gene bph nas amostras dos sítios TPI e ADJ

Após a quantificação, o DNA genômico extraído dos solos de TPI e ADJ, foi concentrado em Concentrador 5301 (Eppendorf) a 45°C por aproximadamente 10 minutos. Em seguida as amostras foram enviadas à Michigan State University (MSU), Center for Microbial Ecology, aos cuidados do Dr. James M. Tiedje, para realização do pirosequenciamento.

A amplificação inicial das amostras por técnica de PCR foi realizada pelo Dr. John Quensen (Center for Microbial Ecology, MSU), utilizando-se os *primers* descritos por Iwai et al. (2010), os quais amplificam uma fração de aproximadamente 500 pb da subunidade alfa de dioxigenases aromáticas (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Primers utilizados para o pirosequenciamento do gene bph de amostras d	e TPI e
ADJ	

Primer	(5'-3')
BPHD-F3	ACTGGAARTTYGCIGCVGA
BPHD-R1	ACCCAGTTYTCICCRTCGTC

Para o desenho dos *primers*, os autores selecionaram sequências a partir do banco de dados do FunGene (Funcional gene pipeline & repository, disponível em <u>http://fungene.cme.msu.edu/</u>), de genes de dioxigenases da família/grupo do tolueno/bifenil (*bph*), tanto nucleotídicas quanto das proteínas, utilizando valores de score maiores que 900 e tamanho de sequências superiores a 400 pb.

As análises foram realizadas em sequenciador Genome Sequencer FLX System (454 sequencing-by-synthesis technology, Roche), com a plataforma GS FLX Titanium, na qual o comprimento esperado das sequências geradas (reads) fica em torno de 400 pb.
Os "mix" para as reações de pirosequenciamento foram preparados para um volume total de 20 µL, contendo 1X *FastStart High Fidelity Reaction Buffer* (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), 1,25 µM de cada *primer*, 150 ng.µL⁻¹ de BSA (*bovine serum albumin*, New England BioLabs, Ipswich, MA, USA), 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µL (2,5 U) de *FastStart High Fidelity PCR System Enzyme Blend* (Roche Diagnostics) e 40 ng de DNA molde. As condições de PCR foram otimizadas utilizando-se o DNA genômico da estirpe LB400 de *Burkholderia xenovorans* (GORIS et al., 2004), que possui um dos genes de dioxigenases amplificados pelos *primers* BPHD, para degradação de bifenil (*bph*).

As amplificações foram realizadas em triplicata como segue: 3 minutos a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 45 segundos a 95 °C, 45 segundos a 60 °C e 40 segundos a 72 °C, além de extensão final de 4 minutos a 72 °C. Os amplicons com 542 pb foram purificados utilizando-se o QIAquick *Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden, Germany), seguido de QIAquick *PCR Purification Kit* (Qiagen). As concentrações do material amplificado foram determinadas em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Os produtos purificados foram então reamplificados com *primers* contendo *barcodes*, e após purificação foram submetidos ao pirosequenciamento em sequenciador Genome Sequencer FLX System (454 Life Sciences, Branford, CT, USA).

### 3.3.5.2 Determinação das sequências válidas

Os processos de filtragem e obtenção das sequências válidas geradas a partir do pirosequenciamento foram realizados pela Dra. Qiong Wang (Center for Microbial Ecology, Michigan State University, MSU), utilizando programas de bioinformática e as ferramentas disponíveis no FunGene Pipeline Repository (http://fungene.cme.msu.edu/FunGenePipeline/).

Inicialmente, as sequências geradas foram analisadas para remoção dos *primers* e das sequencias com baixa qualidade. Para eliminação de possíveis erros na fase de leitura das sequências (*frameshift*), todas as sequências foram comparadas com dioxigenases depositadas no NCBI por meio das ferramentas tblastx (ALTSCHUL et al., 1990), utilizando-se *E-value* menores que 10⁻³ para determinar as maiores similaridades, considerando-se somente os dez primeiros resultados para todas as sequências. Somente sequências que passaram por esta

filtragem inicial foram utilizadas nas análises para determinação dos índices de riqueza e diversidade dos sítios analisados neste estudo.

### 3.3.5.3 Análises das sequências, parâmetros ecológicos e medidas de diversidade

Inicialmente, os dados de pirosequenciamento do gene *bph* de bacteria foram analisados separando-se as sequências obtidas para cada sítio. A matriz de dissimilaridade para as sequências de cada sítio foi calculada a partir do alinhamento par-a-par (*pairwise*) entre as sequências de nucleotídeos, utilizando-se o *software* MEGA 5.0. A partir destas matrizes foi possível calcular o número de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs), considerando-se uma distância evolutiva (*cut-off*) de 0,06. A riqueza de UTOs foi estimada mediante o cálculo de curvas de rarefação e dos estimadores Chao1, *Jackknife*, ACE e a heterogeneidade das comunidades do gene *bph* foi verificada com os índices de *Shannon* e *Simpson*. O número de UTOs, as curvas de rarefação e os índices de diversidade e riqueza foram obtidos através do programa MOTHUR (SCHLOSS et al., 2009).

Posteriormente, todos os dados (i.e. sequências geradas pelo pirosequenciamento de todos os sítios) foram alinhados conjuntamente e agrupados em UTOs. Uma sequência representativa de cada UTO foi selecionada e submetida à afiliação por meio da ferramenta de comparação de sequências tblastx (GenBank) utilizando-se o programa Blast2Go. Conjuntamente à obtenção das sequências representativas para cada UTO, gerou-se uma tabela contendo a abundância e o sítio de origem de cada sequencia dentro de cada UTO. Estas informações foram utilizadas para construção do alinhamento das sequências representativas de cada UTO, reconstrução filogenética destas sequências, e também para a obtenção da análise de componentes principais entre os sítios analisados. Estas análises foram realizadas por meio do programa QIIME (CAPORASO et al., 2010).

### 3.3.6 PCR quantitativa em tempo real

As análises de PCR em tempo real foram realizadas para quantificação do número de cópias de genes de dioxigenases aromáticas em solos TPI e ADJ para os quatro sítios analisados neste estudo. Como padrão para comparações, foi utilizado o gene ribossomal 16S

rRNA. As reações foram realizadas no equipamento StepOnePlus® (Applied Biosytems), utilizando o sistema SYBR Green.

### 3.3.6.1 Amplificação de genes de dioxigenases aromáticas

A reação de amplificação para genes funcionais foi realizada com os *primers* BPHD-F3 e BPHD-R1 (IWAI et al., 2010), usando-se os valores de Cts (*cycle threshold*) como normalizadores para determinar a quantidade de DNA passível de amplificação em cada uma das amostras. Os Cts são definidos como o número de ciclos requeridos para que o sinal fuorescente exceda o nível de ruído (*background*), e é inversamente proporcional a quantidade de DNA-alvo presente na amostra.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em volume de 10  $\mu$ L contendo 5  $\mu$ L do *Kit Syber Green Rox qPCR* (Fermentas, Brasil), 2,5  $\mu$ M de cada *primer* e 10 ng de DNA. A amplificação do DNA foi realizada com um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificação de 95 °C por 20 segundos, 60 °C por 50 segundos e 72 °C por 50 segundos e ao final da reação foi incluída uma curva de desnaturação (*melting*) nas seguintes condições: 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e a temperatura foi aumentada até 95 °C por 15 segundos, com leitura de dados a cada 0,7 °C. Para amplificação e obtenção de curva padrão, foi utilizado um clone obtido a partir de uma biblioteca contendo o gene funcional *bph* (bifenil dioxigenase), onde os plasmídeos foram quantificados em espectrofotômetro de espectro completo (190 a 840 nm - NanoDrop® ND-1000) e diluídos para construir uma curva padrão de 10² até 10⁶ genes. $\mu$ L⁻¹.

### 3.3.6.2 Amplificação do gene ribossomal 16S RNA

A reação de amplificação para o gene 16S rRNA foi realizada com os *primers* universais para o domínio Bacteria U968F (5'-AAC GCG AAG AAC CTT AC-3') e R1387 (5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3') (HEUER et al., 1997), que amplificam um fragmento de aproximadamente 400 pb, e os valores de Cts (*cycle threshold*) foram utilizados como normalizadores para determinar a quantidade de DNA passível de amplificação em cada uma das amostras. As reações de PCR em tempo real foram realizadas

em volume de 10 µL contendo 5µL do *Kit Syber Green Rox qPCR* (Fermentas, Brasil), 2,5 µM de cada primer e 10 ng de DNA. A amplificação do DNA foi realizada com um ciclo de desnaturação inicial a 94 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificação de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos e 72 °C por 40 segundos e ao final da reação foi incluída uma curva de *melting* nas seguintes condições: 95 °C por 15 segundos, 56 °C por 1 minuto e a temperatura foi aumentada até 95 °C por 15 seg, com leitura de dados a cada 0,7 °C. Diluições de um clone obtido a partir de uma biblioteca contendo o gene 16S rRNA foram utilizadas para amplificação e obtenção de curva padrão. Os plasmídeos foram quantificados em um espectrofotômetro de espectro completo (190 a 840 nm - NanoDrop® ND-1000) e diluídos para construir uma curva padrão de 10³ até 10⁷ genes.µL⁻¹.

### 3.4 Resultados e discussão

### 3.4.1 Extração do DNA genômico total da comunidade microbiana a partir dos solos TPI e ADJ

O DNA total das comunidades microbianas dos solos TPI e ADJ foi extraído por meio do kit *Power Soil DNA extraction* (MoBio, Carlsbad, CA), utilizando-se três repetições para cada sítio analisado, e a verificação da qualidade do material extraído foi feita em gel de agarose a 1 % (Figura 3.1). O padrão de peso molecular (PM) utilizado foi o *Low Mass DNA Ladder*TM (Invitrogen Life Technologies).



Figura 3.1- Gel de agarose do DNA total dos solos TPI e ADJ. PM: padrão de peso molecular *Low* Mass DNA Ladder™ (Invitrogen Life Technologies)

A pureza e o rendimento das extrações foram satisfatórios para todos os sítios TPI e ADJ. O material extraído foi suficiente para as amplificações por técnica de PCR e posterior construção das bibliotecas para o gene funcional *bph* de *Bacteria*.

## **3.4.2** Amplificação do gene *bph* a partir de solos TPI e ADJ e construção das bibliotecas funcionais

Após a verificação da qualidade do material extraído, foi realizada a amplificação por técnica de PCR das três repetições de cada solo, utilizando os *primers* BPHD-F0 e BPHD-R1, e o resultado das amplificações foi verificado em gel de agarose a 1 %. Como controles positivos, foram utilizadas as estirpes padrões do Banco de Culturas da Alemanha (DSMZ, *German Resource Centre for Biological Material* (disponível em <u>http://www.dsmz.de/index.htm</u>), como descritos na Tabela 3.3, nas mesmas condições aplicadas ao DNA dos solos. Todas as amostras produziram amplificação positiva para o gene *bph* de *Bacteria*, com um fragmento de aproximadamente 940 pb (Figura 3.2 e 3.3).

Tabela 3.3 - Microrganismos padrões de biodegradação (DSM)

DSMZ nº	Microrganismos	Metabolismo de hidrocarbonetos			
DSM 6506	Pseudomonas fluorescens	Utiliza naftaleno (fonte de carbono)			
DSM 291	Pseudomonas putida	Degrada compostos aromáticos			
DSM 8369	Pseudomonas fluorescens	Utiliza fenol e naftaleno (fonte de carbono)			
DSM 6899	Pseudomonas putida	Utiliza tolueno (fonte de carbono)			



Figura 3.2 - Gel de agarose da amplificação por PCR do gene *bph* de *Bacteria* dos solos TPI e ADJ; LM: padrão de peso molecular *Low DNA Mass Ladder*™(Invitrogen Life Technologies)



Figura 3.3 - Gel de agarose da amplificação por PCR do gene *bph* de *Bacteria* das estirpes de microrganismos padrões de biodegradação (DSM); LM: padrão de peso molecular *Low DNA Mass Ladder*TM(Invitrogen Life Technologies)

**3.4.3** Análises das sequências, parâmetros ecológicos e medidas de diversidade, e construções filogenéticas a partir de bibliotecas funcionais para o gene *bph* para os solos TPI e ADJ

A análise inicial das sequências dos clones foi realizada pelo *pipeline* disponível no RDP. Foram selecionadas aquelas sequências cuja qualidade foi satisfatória para as análises de diversidade e as construções filogenéticas. O nível de exigência mínimo foi de qualidade de bases acima de 20 (o que representa 1 erro a cada 100 bases lidas). As sequências dos

clones foram comparadas com o banco de dados do *GenBank* utilizando-se a ferramenta tblastx, para confirmar as possíveis funções dos fragmentos sequenciados, considerando-se *E-value* menores que 10⁻³ para classificação das prováveis proteínas. Todos os clones produziram alinhamentos significativos com sequências da subunidade alfa de dioxigenases aromáticas depositadas no *GenBank*, a maioria associada a genes de *Bacteria* dos gêneros *Pseudomonas, Rhodococcus, Mycobacterium, Sphingomonas, Terrabacter, Solibacter*, além de muitas relacionadas a clones ambientais não cultivados. A Figura 3.4 mostra diferenças de diversidade entre as bibliotecas de TPI e ADJ para os sítios analisados.

Nos solos dos sítios de TPI é possível observar uma maior variedade de gêneros bacterianos nas bibliotecas para os dois sistemas de uso da terra, sugerindo que as comunidades bacterianas são heterogêneas e capazes de responder de forma distinta às características de ambientes que podem sustentar a sobrevivência de microrganismos únicos.



Figura 3.4 - Gráfico de classificação dos clones das bibliotecas do gene *bph* a partir dos sítios de TPI e ADJ. A classificação foi realizada utilizando-se a ferramenta tblastx do GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

A fim de confirmar estes resultados, utilizou-se o software MOTHUR para agrupar as bibliotecas do gene *bph* baseado na distância evolutiva entre as sequências, para isso foi considerado um valor mínimo de similaridade no agrupamento de 94 % (*cut-off* = 0,06). A partir destas análises, foram identificados 18 UTOs distintas para a biblioteca do sítio TPI FS e 15 para a biblioteca do sítio TPI CULT, além de 14 UTOs para a biblioteca do sítio ADJ FS e 11 para o sítio ADJ CULT.

Com o interesse de melhor compreender as relações entre as populações bacterianas degradadoras de compostos aromáticos presentes nos solos TPI e ADJ, todas as bibliotecas foram analisadas em função da sua heterogeneidade. A Tabela 3.4 apresenta as medidas de diversidade calculadas para as bibliotecas do gene *bph* de Bacteria analisadas neste estudo, dadas em função dos estimadores de riqueza de espécies e dos índices de diversidade.

Tabela 3.4 – Dados das bibliotecas do gene *bph* obtidas para cada sítio TPI e ADJ analisado neste estudo, incluindo as medidas de riqueza e índices de diversidade

Sítios	Nº de sequências	UTOs*	Riqueza			Diversidade	
			Chao1*	ACE*	Jackknife*	Shannon (H')*	Simpson*
TPI FS	50	18	25,00	26,50	26,00	2,69	0,06
TPI CULT	44	15	24,33	24,65	23,82	2,57	0,07
ADJ FS	42	14	16,50	19,12	19,00	2,35	0,10
ADJ CULT	51	11	11,00	11,38	17,24	2,23	0,13

*Valor de cut-off = 0,06

A estimativa do valor máximo de UTOs em um nível filogenético pode ser feita utilizando-se métodos estatísticos capazes de extrapolar a relação de UTOs em função do número de sequências a partir da curva de rarefação ou de métodos não paramétricos. Neste estudo a riqueza de filotipos foi verificada por meio do método de rarefação ao nível de 94 % de similaridade (Figura 3.5), pelos métodos não-paramétricos de estimativa Chao1 (CHAO, 1984; 1987) e *Jackknife* e pelo estimador baseado no conceito de cobertura de amostra ACE.

Os resultados obtidos indicaram que o número de sequências do gene *bph* de Bacteria não foi suficiente para amostrar completamente a riqueza de espécies das comunidades microbianas dos solos TPI (FS e CULT), ou seja, não atingiu um esforço amostral satisfatório. Já para as bibliotecas dos sítios ADJ (FS e CULT) é possível notar que a curva tende a um "plateau", ou seja, o esforço amostral já está sendo atingido. As curvas de rarefação também revelaram as diferenças entre as bibliotecas dentro dos sítios do Caldeirão, onde é possível notar uma maior riqueza de UTOs nas bibliotecas dos solos de TPI sob ambos os cultivos (FS e CULT) em comparação com as bibliotecas dos solos ADJ (FS e CULT).

Os valores do índice de heterogeneidade de *Shannon* revelaram maior diversidade nas bibliotecas dos sítios de TPI. Esta diferença pode ser explicada pelo fato de que as amostras de sítios arqueológicos com histórico de alteração das características do solo, podem alterar o padrão de diversidade em relação aos demais sítios analisados (TSAI et al., 2003), onde a maior quantidade de matéria orgânica (característica dos solos antropogênicos de TPI) parece ser o principal elemento responsável pela manutenção da diversidade dos genes *bph* nas comunidades bacterianas. A mesma relação de diversidade de UTOs foi estabelecida entre as bibliotecas de TPI e ADJ com os valores obtidos pelos métodos não-paramétricos Chao1 e *Jackknife*, pelo estimador baseado no conceito de cobertura de amostra ACE, e pelo índice de diversidade de *Simpson*.



Número de clones válidos

Figura 3.5 – Curva de rarefação estimada para genes de dioxigenases aromáticas em solos TPI e ADJ. As UTOs foram agrupadas com base na similaridade das sequências com nível de 94 %

Apesar das similaridades observadas entre os valores de riqueza e diversidade para algumas bibliotecas, a análise realizada com o programa J-Libshuff, incluído no MOTHUR, apontou diferença estatística significativa entre todas as bibliotecas, indicando que as

comunidades de Bacteria degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos são influenciadas diretamente pelos diferentes ambientes (i.e. tipo de solo e uso da terra).

A biblioteca de clones do gene *bph* gerada a partir do sítio TPI sob floresta secundária apresentou os maiores índices de diversidade entre os quatro sítios analisados, sendo que os menores valores foram encontrados na biblioteca do sítio ADJ sob cultivo agrícola. Esses valores mostram que a diversidade e riqueza analisadas foram maiores em solos de TPI, mostrando a diferença da diversidade deste gene catabólico de acordo com o tipo do solo. Os valores também mostram uma maior diversidade e riqueza em solos sob floresta secundária quando comparadas com solo sob cultivo agrícola, o que demonstra que a diversidade deste gene também se alterou em relação ao tipo de uso do solo.

Diagramas de Venn para foram construídos para verificar as intersecções e peculiaridades de cada ambiente, identificando o número de UTOs exclusivas e compartilhadas entre os solos TPI (FS e CULT) e ADJ (FS e CULT) (Figura 3.6).



Figura 3.6 - Diagramas de Venn baseados nas UTOs das bibliotecas do gene *bph* de *Bacteria* (*cutoff* 0,06) para os sítios de TPI e ADJ analisados

Através da análise dos diagramas de Venn, foi possível observar maior quantidade de UTOs únicas nas bibliotecas dos sítios de TPI em comparação com os sítios ADJ para os dois tipos de uso do solo, sendo que ao compararmos o uso do solo, o número de UTOs únicas é maior nos solos sob floresta secundária, tanto para os sítios de TPI e ADJ. O número de UTOs compartilhadas se mostrou menor, quando comparados os tipos de solo (TPI FS x ADF FS = 3 UTOs compartilhadas e TPI CULT x ADJ CULT = 3 UTOs compartilhadas) do que quando

comparado a cobertura vegetal dos solos (TPI FS x TPI CULT = 5 UTOs compartilhadas e ADJ FS x ADJ CULT = 4 UTOs compartilhadas) mostrando que o tipo de solo pode alterar a diversidade funcional de genes catabólicos no solo, porém também foi possível observar maior quantidade de número de UTOs únicas nos solos sob floresta secundária, tanto para os sítios de TPI e ADJ confirmando que a interferência agrícola pode também influenciar na diversidade das comunidades microbianas no solo.

Estes dados sugerem que as características de solos antropogênicos como as TPI, com maior quantidade de matéria orgânica e carvão pirogênico, além do pH mais elevado, podem ser o responsável pela manutenção de comunidades microbianas envolvidas em processos específicos fundamentais para a manutenção da fertilidade do solo, como a ciclagem de nutrientes e matéria orgânica.

O carvão pirogênico que se encontra em maiores quantidades nestes solos de TPI em relação aos seus solos ADJ (CANAVANN, 2012) já foi considerado como micro-habitat para a sobrevivência microbiana, funcionando como uma plataforma de troca de nutrientes para os microrganismos (PIETIKAINEN et al., 2000), além de possuir propriedades biológicas favoráveis à diversidade das comunidades microbianas do solo, uma vez que hidrocarbonetos residuais e outros materiais aderidos à superfície das partículas podem servir diretamente como fonte de carbono e energia (THIES; RILLING, 2009). Considerando que uma característica marcante dos solos de TPI é a elevada concentração de carvão pirogênico, pode residir neste fato uma das explicações para a maior diversidade de genes funcionais nestes solos.

As relações filogenéticas entre as sequências de dioxigenases identificadas neste estudo, e destas com sequências de referências selecionadas (Tabela 3.5), estão mostradas nas Figuras 3.7 a 3.10. As sequências de referências utilizadas foram descritas por Nam et al. (2001) com o objetivo de classificar as sequências de acordo com sua funcionalidade, utilizando um sistema que classificou as enzimas em quatro grupos (I a IV) baseado na homologia das sequências de aminoácidos do componente terminal das oxigenases, região que caracteriza a especificidade ao substrato, além de refletir as relações filogenéticas entre as enzimas.

Sequências de referência	Gene	Cepa	Acesso GenBank	Grupos
carbazol 1,9-dioxigenase	carAa	Pseudomonas sp.	D89064	Ι
ftalato dioxigenase	ophA2	B. cepacia	AF095748	Ι
orto-halobenzoato 1,2-dioxigenase	ohbB	P. aeruginosa	AF121970	II
antralinato dioxigenase	anta	Acinetobacter ADP1	AF071556	II
p-cumato dioxigenase	cmtAb	P. putida	U24215	II
fenantreno dioxigenase	phnAc	Burkholderia sp.	AF061751	III
2-nitrotolueno dioxigenase	ntdAc	Pseudomonas sp.	U49504	III
naftaleno dioxigenase	nahAc	P. putida	NC007926	III
clorobenzeno dioxigenase	tcbAa	Pseudomonas sp.	U15298	IV
dioxina dioxigenase	dxnA1	Sphingomonas sp.	X72850	IV
etilbenzeno dioxigenase	edoA1	P. fluorescens	AF049851	IV
benzeno dioxigenase	bedC1	Arthrobacter sp.	AJ609537	IV
bifenil 2,3-dioxigenase	bphA1	B. xenovorans LB 400	P37333	IV
tolueno dioxigenase	todC1	P. putida F1	Y18245	IV

Tabela 3.5 - Dioxigenases utilizadas como grupo interno nos agrupamentos filogenéticos. Grupos propostos por Nam et al. (2001)



Figura 3.7 - Reconstrução filogenética entre as sequências nucleotídicas das UTOs representativas dos clones do sítio TPI FS e grupo interno (*in silico*) de dioxigenases de referência segundo Nam et al. (2001)



Figura 3.8 - Reconstrução filogenética entre as sequências nucleotídicas das UTOs representativas dos clones do sítio TPI CULT e grupo interno (*in silico*) de dioxigenases de referência segundo Nam et al. (2001)



Figura 3.9 - Reconstrução filogenética entre as sequências nucleotídicas das UTOs representativas dos clones do sítio ADJ FS e grupo interno (*in silico*) de dioxigenases de referência segundo Nam et al. (2001)



Figura 3.10 - Reconstrução filogenética entre as sequências nucleotídicas das UTOs representativas dos clones do sítio ADJ CULT e grupo interno (*in silico*) de dioxigenases de referência segundo Nam et al. (2001)

Os grupos de dioxigenas classificados por Nam et al (2001) foram nomeados de grupos I, II, III e IV. O grupo I consiste de oxigenases "*homo-multimer*" (que possuem dois ou mais componentes idênticos), enquantos os outros grupos incluem oxigenases "*heterodimer*". Isto significa dizer que os componentes das oxigenases incluídas no grupo I, têm a subunidade alfa idêntica, enquanto os componentes das oxigenases dos outros grupos são compostas de subunidades alfa e beta diferentes. As dioxigenases típicas do grupo I são a carbazol e ftalato, já no grupo II são a benzoato e toluato. Para o grupo III, são típicas as

dioxigenases naftaleno e degradadoras de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, e no grupo IV são benzeno, tolueno e bifenil dioxigenases (NAM et al., 2001).

As análises filogenéticas com as sequências de dioxigenases obtidas a partir das bibliotecas de TPI e ADJ apresentaram grupos heterogêneos. As reconstruções filogenéticas indicaram a formação de agrupamentos das UTOs representativas do solo de TPI FS entre si, as quais formaram um agrupamento externo aos grupos propostos por Nam et al. (2001). Já para o solo TFI CULT, notou-se uma maior dispersão entre as sequências das UTOs quando afiliadas às sequências de referência. Um grupo de 5 UTOs representativas de 7 sequências formou um clado próximo ao grupo IV. A UTO TCULT3, representativa de 9 sequências, formou um agrupamento junto às sequências de bifenil e benzeno dioxigenase, também pertencentes ao grupo IV (NAM et al., 2001).

A análise da filogenia para o sítio ADJ FS mostrou um agrupamento das UTOs entre si e também em um clado próximo às sequências do grupo IV, exceto a UTO AFS1, representante de 2 sequências, que se agrupou à sequência de carbazol dioxigenase, pertencente ao grupo I. O mesmo padrão se mostrou para a análise do sítio ADJ CULT onde as UTOs se agruparam entre si e com sequências do grupo IV.

Ainda existem lacunas importantes no conhecimento sobre a estrutura e diversidade de enzimas dioxigenases em amostras ambientais, fato que torna difícil sua classificação dentro de uma abordagem funcional (MARCOS et al., 2009). Além disso, a maior parte dos resultados publicados até o presente momento sobre a diversidade de dioxigenases está relacionada a ambientes cronicamente poluídos, que não é o caso dos solos TPI de modo geral (SILVA, 2011). Talvez em função destes fatos, os grupos de dioxigenase descritos neste estudo não puderam ser completamente relacionados aos grupos enzimáticos descritos previamente por Nam et al. (2001), podendo constituir novas enzimas associadas a ambientes específicos.

A idéia de que solos antropizados como os solos de TPI podem ter populações microbianas distintas não é nova, mas recentemente, estudos têm demonstrado que as características específicas destes solos, como o alto teor de do carvão pirogênico têm uma forte influências sobre os processos físicos (GLASER et al., 2002), químicos (LEHMANN et al., 2003) e biológicos (LIANG et al., 2006; 2010) nestes solos antrópicos. A diversidade bacteriana em solos TPI da Amazônia geralmente se assemelha aos solos de floresta sem perturbação, mas o estudo de Kim et al. (2007) demonstrou uma riqueza maior em solos de TPI do que nos solos de floresta sem perturbação em de 25 %. Os dados gerados no presente

estudo demonstraram que as populações microbianas dos solos TPI são muito diversas e adaptadas à ecologia e características bioquímicas únicas destes solos antrópicos.

# **3.4.4** Análises das sequências, parâmetros ecológicos e medidas de diversidade, e construções filogenéticas a partir dos resultados obtidos por pirosequenciamento para o gene bph para os solos TPI e ADJ

As sequências de genes catabólicos para degradação de hidrocarbonetos aromáticos obtidas os sítios TPI e ADJ foram inicialmente analisadas quanto à qualidade de nucleotídeos pelo *software* do próprio equipamento (*Genome Sequencer FLX System*, 454 Life Sciences), que descartou as leituras de baixa qualidade, além de considerar comprimento mínimo das sequências de 300 pb. As regiões correspondentes aos *primers* BPHD e aos *barcodes* foram também removidas no processo de filtragem inicial. Como controle positivo para as reações de amplificação dos gene catabólicos e de pirosequenciamento, foi utilizada uma comunidade microbiana artificial (*mock community*), que compreende uma amostra de DNA onde se conhece a proporção do gene funcional. Neste caso, foi utilizada uma amostra contendo 10 % de DNA genômico da estirpe *Burkholderia xenovorans* LB400, que contém um dos genes-alvo amplificados pelos *primers* BPHD, para degradação de bifenil (*bph*).

Após filtragem foram obtidas 862 sequências válidas para o solo TPI FS, 751 para o solo TPI CULT, 1919 para o solo ADJ FS e 1158 para o solo ADJ CULT.

As amostras filtradas foram alinhadas no programa MEGA 5.0 e as sequências foram analisadas quanto à sua riqueza e diversidade do gene catabólico, além da formação de UTOs representativas para cada sítio estudado, utilizando-se o software MOTHUR (SCHLOSS et al., 2009), considerando-se um nível de dissimilaridade de 94 % (*cutoff* = 0,06). O método de análise baseado na geração de UTOs permite analisar a frequência de distribuição de sequências de uma ou mais amostras através de uma matriz de distância. Esta estratégia possibilita calcular os índices de riqueza e diversidade de uma comunidade microbiana pela geração de grupos distintos em cada intervalo de *cutoff* da matriz de distância (DUARTE, 2010).

Para cada uma das amostras analisadas neste estudo foram calculados individualmente os índices de riqueza de ACE (CHAO et al., 1993), Chao1 (CHAO, 1984; 1987) e *Jackknife*, além dos índices de diversidade de *Shannon* e *Simpson*, juntamente com análises do esforço amostral, dadas pela curva de rarefação (FAUTH et al., 1996).

Os índices de riqueza e diversidade para as amostras de TPI e ADJ obtidas pelo pirosequenciamento foram calculados a partir de uma matriz de distância entre as sequências (*cutoff* 0,06), e os resultados encontram-se na Tabela 3.6. O número de UTOs encontradas com 94 % de similaridade entre as sequências dos sítios analisados foi maior para os solos de TPI do que para os solos ADJ para ambos os usos da terra.

Os valores dos índices de riqueza de espécies, dadas por Chao1, ACE e *Jackknife* e de heterogeneidade e diversidade de *Shannon* e *Simpson*, revelaram maior riqueza e diversidade nas amostras dos solos de TPI que para os solos ADJ, e para ambos os tipos de solo, notou-se maior número de UTOs para os sítios sob floresta secundária. É possível notar que a maior diferença de valores de riqueza e diversidadade são encontradas em função do tipo de solo analisado, do que em função do uso da terra. Também nota-se, que quando comparados entre si, os solos TPI, e os solos ADJ, em função do uso da terra, as maiores diferenças de diversidade e riqueza são observadas nos sítios ADJ, o que pode sugerir a estabilidade dos sítios de TPI que mesmo sob diferentes coberturas vegetais não tem sua estrutura e comunidade microbiana tão significativamente afetada.

Sítios	Nº de sequências	UTOs*	Riqueza			Diversidade	
			Chao1*	ACE*	Jackknife*	Shannon (H')*	Simpson*
TPI FS	862	180	299	357	328	4,35	0,024
TPI CULT	751	152	263	337	296	4.34	0,024
ADJ FS	1919	136	201	180	179	3,44	0,07
ADJ CULT	1158	99	150	174	174	2,96	0,12

Tabela 3.6 - Dados do pirosequenciamento do gene *bph* obtidas para cada sítio TPI e ADJ analisado neste estudo, incluindo as medidas de riqueza e índices de diversidade

* Valor de cut-off = 0,06

Também foi calculada pelo programa MOTHUR, a estimativa de rarefação de UTOs das amostras de todos os sítios, separadamente. Os dados foram plotados em função do número de sequências analisadas, que resulta em curvas de rarefação que são úteis para indicar se as sequências nucleotídicas analisadas representam a riqueza de espécies de uma comunidade.

As curvas de rarefação para os valores de cutoff = 0,06 demonstraram que o esforço amostral não foi suficiente para cobrir a riqueza de genes de dioxigenases para amostras de TPI. Entretanto, para os sítios ADJ as curvas empregando *cutoff* de 0,06, utilizado para o cálculo da matriz de distância, começaram a apresentar um "plateau" por volta de 1.900 sequências para o sítio ADF FS e por volta de 1.100 sequências para o sítio ADJ CULT. As curvas também demonstraram um agrupamento entre os solos TPI e outra entre os solos ADJ, mostrando claramente a diferença da diversidade do gene *bph* de acordo com o diferente tipo de solo.



Figura 3.11 - Curva de rarefação estimada para genes de dioxigenases aromáticas em solos TPI e ADJ. As UTOs foram agrupadas com base na similaridade das sequências com nível de 94 %

Os resultados obtidos através da comparação das sequências representativas para cada UTO, com as sequências do banco de GenBank através do software Blast2Go, demonstraram uma diferença na estrutura da comunidade de dioxigenases encontradas para cada tipo de solo. As dioxigenases mais abundantes encontradas (i.e. dioxigenases que foram encontradas mais de dez vezes para pelo menos um dos sítios estudados) foram agrupadas em um gráfico (Figura 3.12). É possível notar a predominância da dioxigenase (*Aromatic ring hydroxylating dioxygenases* ARHD) do clone de um organismo não cultivado (*rdh cf33*) nos sítios de TPI, e a predominância da dioxigenase (subunidade alfa) de um clone obtido através de solos da Austrália (*od16*).

De modo geral, estes grupos mistos incluíram sequências de tolueno/bifenil dioxigenases selecionadas do banco de dados, como os genes *bphA1* de *B. xenovorans* LB400 e *bphB, bphC8, bphA1, bphA2, bphA3, bphA4, bphD* de *Rhodococcus rhodochrous*, além de

enzimas para degradação de HPAs, como o naftaleno e o fenantreno, descritas como dioxigenases amplamente distribuídas no ambiente (SMETS et al., 1993; PENG et al., 2008; WANG et al., 2008).



- Uncultured bacterium clone nmr-or05-60 aromatic ring-hydroxylating dioxygenase partial cds
- Uncultured bacterium clone dpc+04_24_12 dioxygenase alpha partial cds
- Streptomyces scabiei complete genome
- Sphingomonas wittichii complete genome
- Rhodococcus rhodochrous bphB, bphC8, bphA1, bphA2, bphA3, bphA4, bphD
- Mycobacterium massiliense go complete genome
- Conexibacter woesei dsm complete genome
- Burkholderia xenovorans lb400 chromosome complete sequence
- Australian soil clone od16 dioxygenase alpha subunit partial cds
- Australian soil clone od11 dioxygenase alpha subunit partial cds

Uncultured organism gene for ring-hydroxylating partial clone: rhd-cf33
Uncultured organism gene for ring-hydroxylating partial clone: rhd-cf28
Uncultured organism gene for ring-hydroxylating partial clone: rhd-cf25
Uncultured organism gene for ring-hydroxylating partial clone: rhd-cf22
Uncultured organism gene for ring-hydroxylating partial clone: rhd-cf21
Uncultured organism gene for ring-hydroxylating partial clone: rhd-cf18
Uncultured bacterium clone spa28 reiske non-heme dioxygenase alpha subunit partial cds
Uncultured bacterium clone spa14 reiske non-heme dioxygenase alpha subunit partial cds
Uncultured bacterium clone spa12 reiske non-heme dioxygenase alpha subunit partial cds
Uncultured bacterium clone ring hydroxylating dioxygenase large subunit partial cds

Uncultured bacterium clone nmr-or07-168 aromatic ring-hydroxylating dioxygenase partial cds

Figura 3.12 – Classificação das UTOs geradas para os sítios TPI e ADJ (valor de *cut-off* de 0,94) obtidas por pirosequenciamento para o gene *bph*. Foram consideradas nesta análise somente UTOs que representam um valor de ocorrência de sequências maior que 10. A classificação foi realizada por tblastx utilizando o banco de dados do GenBank (<u>http://ncbi.nlm.nih.gov/</u>)

A partir das UTOs geradas após alinhamento das sequências de todos os sítios, foi utilizada uma sequência representativa para cada UTO para a reconstrução filogenética dos genes de dioxigenases encontrados nos quatro sítios analisados (Figura 3.13).



Figura 3.13 – Reconstrução filogenética do gene *bph* a partir de OTUs representativas obtidas a um valor de *cut-off* de 0,06. Os valores de abundancia de sequencia dentro de cada OTU estão representados por barras coloridas de acordo com cada sítio analisado

A reconstrução filogenética permite observar a separação de dois grandes grupos, sendo um composto pelas UTOs dos sítios TPI (FS e CULT) através das barras amarelas e verdes e outro composto pelas UTOs dos sítios ADJ (TPI e FS) através das barras azuis e vermelhas. Também é possível notar maior diversidade de dioxigenases para os sítios de TPI, observando o maior número de barras amarelas e verdes, porém com menores valores de

abundância de sequências dentro de cada UTO, o que reflete maior heterogeneidade das sequências. Já para os sítios ADJ (FS e CULT) as barras azuis e vermelhas demonstram menor diversidade, porém maior abundância de sequências dentro de cada UTO. Esses resultados corroboram os resultados já observados na análise dos dados das bibliotecas de clones para o gene *bph* e também para os resultados de pirosequenciamemto analisados pelo MOTHUR, que considerou o alinhamento das sequências de cada sítio separadamente.

Ainda utilizando os dados gerados após alinhamentos das sequências de todos os sítios conjuntamente, também foi possível gerar uma Análise de Componentes Principais (PCA) a fim de observar o agrupamento dos sítios analisados, realizado com as sequências de dioxigenases obtidas pelo pirosequênciamento (Figura 3.14).



Figura 3.14 Análise de componentes principais baseada nas sequências obtidas por pirosequenciamento do gene *bph* para os sítios analisados (método *unweighted* unifrac)

A Análise de Componentes Principais (PCA) realizada com as sequências de dioxigenases obtidas pelo pirosequênciamento revelou agrupamentos distintos para os quatro sítios estudados, onde se observa que de maneira geral, o primeiro eixo da análise explica a variação dos dados em 59,59 %, e que as amostras se separaram de acordo o tipo de solo (TPI x ADJ), onde os sítios de solos de TPI se agruparam no lado esquerdo do plote, e os sítios de solos ADJ se agruparam no lado direito. Apenas 22,63 % explica a variação de dados para o

segundo eixo analisado, que divide os sítios de acordo com sua cobertura vegetal. Mais uma vez é possível observar que o tipo do solo teve maior influência na diversidade dos genes *bph* do que a cobertura vegetal, como já observado neste mesmo trabalho. Também ficou claro, ao analisar o plote, que os sítios de TPI (FS e CULT) se agruparam mais próximos entre si, do que os solos ADJ, demostrando que a cobertura vegetal influenciou menos ainda esse tipo de solo do que os solos ADJ, intensificando a ideia de estabilidade de solos antrópicos com características que favorecem a manutenção da diversidade microbiana e de comunidades funcionais específicas nestes solos, bem como sua resiliência e fertilidade.

### 3.4.5 PCR quantitativa em tempo real

Os dados obtidos a partir da técnica de PCR quantitativa permitiram a comparação entre as comunidades funcionais dos quatro sítios analisados, quanto ao número de cópias de genes de dioxigenases aromáticas, a fim de verificar a presença desta atividade metabólica nos solos TPI, comparando com seus solos ADJ e também fazendo uma comparação com a comunidade microbiana total de cada solo estudado, quantificando o número de cópias do gene 16S.

Na PCR quantitativa para o gene *bph*, utilizado neste estudo como padrão para genes de dioxigenases aromáticas, a temperatura de desnaturação (*melting*) média foi de 88 °C, e a eficiência de amplificação foi de 99,9 % com um valor de R²>0,99 (Figuras 3.15 e 3.16).



3.15 - Curva de desnaturação (*melting*) da reação de qPCR para confirmação da amplificação específica do fragmento do gene *bph* das amostras dos sítios TPI ADJ e do clone de biblioteca genômica contendo o gene *bph* utilizado na padronização



Figura 3.16 - Curva de amplificação padrão e quantificação do gene *bph* para as amostras de solo dos sítios TPI e ADJ. Os valores de Cts (*cycle threshold*) obtidos na reação foram utilizados para normalização dos dados. Pontos em cinza escuro: curva padrão a partir de um clone do gene *bph*; Pontos em preto: amostras de solo dos sítios TPI e ADJ analisadas neste estudo

Na PCR quantitativa para o gene 16S rRNA, a temperatura de *melting* média foi de 85 °C, e a eficiência de amplificação foi de 99,3 % com um valor de  $R^2>0,99$  (Figuras 3.17 e 3.18).



Figura 3.17 - Curva de desnaturação (*melting*) da reação de qPCR para confirmação da amplificação específica do fragmento do gene 16S rRNA das amostras dos sítios TPI ADJ e do clone de biblioteca genômica contendo o gene ribossomal utilizado na padronização





Quantidade

Figura 3.18 - Curva de amplificação padrão e quantificação do gene 16S rRNA para as amostras e solo dos sítios TPI e ADJ. Os valores de Cts (*cycle threshold*) obtidos na reação foram utilizados para normalização dos dados. Pontos em cinza escuro: curva padrão a partir de um clone do gene 16S rRNA; Pontos em preto: amostras de solo dos sítios TPI e ADJ analisadas neste estudo

A abundância média do gene *bph* variou de 2,9 x  $10^6$  a 2,7 x  $10^6$  cópias.g de solo⁻¹ para os sítios TPI (FS e CULT respectivamente) e de 2,4 x  $10^6$  a 1,5 x  $10^6$  cópias.g de solo⁻¹ para os sítios ADJ (FS e CULT respectivamente). A abundância média do gene *bph* diferiu entre os diferentes usos da terra para ambos os solos estudados. É possível notar maior abundância deste gene nos solos sob floresta secundária para ambos os tipos de solo (Figura 3.19). As diferenças apresentadas para o número de cópia do gene *bph* foi estatisticamente significativa (Teste de Tukey, p < 0,01), o que fortalece a ideia de que solos de TPI apresentam maior quantidade de genes catabólicos.

Para o gene 16S, abundância média variou de 9,7 x  $10^7$  a 7,5 x  $10^7$  de cópias.g de solo⁻¹ para os sítios de TPI (FS e CULT respectivamente) e de 3,3 x  $10^7$  a 2,7 x  $10^7$  de cópias.g de solo⁻¹ para os sítios ADJ (FS e CULT respectivamente). É possível notar maior abundância deste gene nos solos sob floresta secundária para ambos os tipos de solo (Figura 3.19). As diferenças apresentadas para o número de cópia do gene 16S rRNA foi estatisticamente significativa (Teste de Tukey, p < 0,01).



Figura 3.19 – Gráfico da quantificação (abundância) dos genes 16S rRNA e *bph* nas amostras de solo dos sítios TPI e ADJ (indicados no eixo horizontal) analisados por PCR quantitativa. Eixo vertical: escala logarítmica (cópias do gene.g de solo⁻¹). Barra de erros representa o erro padrão (n=4)

A abundância dos genes 16S rRNA e *bph* estimada por qPCR para os sítios de TPI da estação experimental do Caldeirão (Emprapa Amazônia) analisados neste estudo está em concordância com o número de cópias já observados para esses genes, nos mesmos sítios de TPI, por Silva (2011).

De modo geral, foi possível verificar maior número de cópias de genes catabólicos e do gene ribossomal nas amostras TPI quando comparadas ao solo dos seus sítios de origem (Figura 3.19). O sítio que apresentou maior número de cópias do gene *bph* e do gene ribossomal 16S por grama de solo foi o TPI FS, com 2,9 x  $10^6$  e 9,7 x  $10^7$  cópias.g de solo⁻¹, respectivamente.

A aplicação da PCR quantitativa mostrou-se uma ferramenta importante e útil para detectar e monitorar genes envolvidos em processos metabólicos no solo. Nesse contexto, é essencial não somente obter informação quantitativa sobre funções catabólicas específicas, mas também ser capaz de relacionar esta informação com a filogenia e a biologia das populações microbianas correspondentes. Ao invés de monitorar um único genótipo, o foco deste tipo de análise é a detecção de certas funções biológicas realizadas por grupos microbianos específicos (FUTAMATA et al., 2001; BALDWIN et al., 2003).

Neste estudo, a PCR quantitativa em tempo real indicou que os sítios de TPI apresentaram maior número de cópias do gene catabólico. Conforme descrito anteriormente,

os solos de TPI apresentam elevado grau de resiliência da fertilidade (GLASER et al., 2001), e esse fenômeno pode estar diretamente relacionado às comunidades funcionais, principalmente as populações microbianas envolvidas na ciclagem de carbono e nitrogênio (TAKETANI; TSAI, 2010).

Os resultados apresentados neste estudo sobre a diversidade de genes funcionais nas Terras Pretas da Amazônia produziram informação importante acerca do papel da comunidade bacteriana em processos metabólicos relacionados à fertilidade destes solos, além de participarem na sobrevivência de populações funcionalmente ativas e, consequentemente, na manutenção da diversidade biológica de solos tropicais no Brasil, reforçando a necessidade de futuros estudos sobre os fatores que afetam e controlam a diversidade e a função de grupos microbianos relacionados a processos de biodegradação e biotransformação no ambiente.

### 3.5 Conclusões

Os solos TPI são valorizados pelos agricultores por sua fertilidade sustentável em regiões de infertilidade do solo. Essa fertilidade pode ter tido origem na ação antropogênica de modificações orgânicas, incluindo material vegetal e animal, cerâmica e carvão vegetal, o que mudou as características originais dos solos nestas áreas. Sendo assim, os solos de TPI mostram maior estabilidade em sua estrutura microbiana e podem ser utilizados em estudo de prospecção de genes funcionais de interesse biotecnológico.

Neste estudo, foi investigada a diversidade de comunidades bacterianas funcionais presentes em solos TPI e ADJ, sob diferentes cultivos. A elevada concentração de matéria orgânica, carvão vegetal recalcitrante, pH neutro entre outras características específicas de sítios antropogênicos, já citadas anteriormente, pode ter criado condições químicas que favorecem a estabilidade de populações únicas em comunidades microbianas, aumentando a resiliência e melhorando a fertilidade do solo.

As técnicas moleculares utilizadas neste estudo (i.e. bibliotecas de clone e pirosequenciamento para o gene funcional *bph*) revelaram que os solos de TPI apresentaram maiores índices de diversidade e riqueza de genes catabólicos em relação aos solos ADJ para ambos os usos da terra, sugerindo que este tipo de solo pode constituir um ambiente mais estável para a sobrevivência de comunidades bacterianas envolvidas em processos específicos no solo, quando comparados com seus solos adjacentes.

Quando os solos são comparados em relação ao diferente uso da terra, o solo sob floresta secundária apresentou maior diversidade e riqueza de espécies em relação ao solo sob cultivo agrícola, porém essa diferença não é tão marcante quanto às diferenças encontradas nos diferentes tipos de solo (TPI e ADJ), sugerindo que a diversidade do gene catabólico estudado é fortemente influenciada pelo manejo histórico e a ação antropogênica sobre estes solos.

Apesar de ambas as técnicas mostrarem uma maior diversidade do gene catabólico em solos de TPI, os dados obtidos por pirosequenciamento mostraram uma variedade de sequências descritas unicamente neste estudo, representando uma relevante diversidade de genes catabólicos bacterianos em solos TPI, e sugerindo a enorme complexidade de dioxigenases ambientais em solos tropicais antropizados.

O número de cópias do gene 16S rRNA e *bph* em solos de TPI, determinada por PCR quantitativa, foi maior em relação aos solos ADJ, confirmando que as características específicas destes solos antropogênicos contribuem na manutenção da diversidade microbiana e de comunidades funcionais específicas nestes solos.

Sob condições intensas de intemperismo, que podem esgotar facilmente a fertilidade na maioria dos solos tropicais, a composição química de solos de TPI e a diversidade de suas populações microbianas podem explicar, em parte, a fertilidade sustentável destes tipo de solo, mesmo centenas de anos após a sua formação. A reprodução das condições biogeoquímicas, associada às populações microbianas encontradas nestes solos antropogênicos, pode ajudar a aprimorar os resultados agronômicos, além de favorecer a recuperação biológica de solos degradados.

### Referências

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.L. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403-410, 1990.

BALDWIN, B.R.; NAKATSU, C.H.; NIES, L. Detection and Enumeration of Aromatic Oxygenase Genes by Multiplex and Real-Time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 69, p. 3350-3358, 2003.

BECHER, D.; SPECHT, M.; HAMMER, E.; FRANCKE, W.; SCHAUER, F. Cometabolic degradation of dibenzofuran by biphenyl-cultivated Ralstonia sp. strain SBUG 290. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 66, p. 4528-4531, 2000.

BOHANNAN, B.J.M.; HUGHES, J. New approaches to analyzing microbial biodiversity data. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 6, p. 282-287, 2003.

CANNAVAN, F.S. A estrutura e composição de comunidades microbianas (Bacteria e Archaea) em fragmentos de carvão pirogênico de Terra Preta de Índio da Amazônia Central. 2012. 116 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; COSTELLO, E.K.; FIERER, N.; PENA, A.G.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J.I.; HUTTLEY, G.A.; KELLEY, S.T.; KNIGHTS, D.J.E.; LEY, R.E.; LOZUPONE, C.A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B.D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.R.; TURNBAUGH, P.J.; WALTERS, W.A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, T.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nature Methods, New York, v. 7, p. 335-336, 2010.

CHAO, A. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. **Scandinavian Journal of Statistics**, Oxford, v. 11, p. 265-270, 1984.

CHAO, A. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. **Biometrics**, Malden, v. 43, p. 783-791, 1987.

CHAO, A.; MA, M.C.; YANG, M.C.K. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. **Biometrika**, Cambridge, v. 80, p. 193-201, 1993.

CHAO, A.; SHEN, T.J.; HWANG, W. Application of laplace's boundary-mode approximations to estimate species and shared species richness. **Australian & New Zealand Journal of Statistics**, Oxford, v. 48, p. 117-128, 2006.

DUARTE, R.T.D. **Micro-organismos em ambientes criogênicos**: gelo glacial, solos expostos por recuo de geleiras e *permafrost* polares. 2010. 202 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

FAUTH, J.E.; BERNARDO, J.; CAMARA, M.; RESETARITS JUNIOR, W.J.; VAN BUSKIRK, J.; McCOLLUM, S.A. Simplifying the jargón of community ecology: a conceptual approach. **The American Naturalist**, Chicago, v. 147, n. 2, p. 282-286, 1996.

FUTAMATA, H.; HARAYAMA, S.; WATANABE, K. Groupspecific monitoring of phenol hydroxylase genes for a functional assessment of phenol-stimulated trichloroethylene bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 67, p. 4671–4677, 2001.

GORIS, J.; DE VOS, P.; CABALLERO-MELLADO, J.; PARK, J.; FALSEN, E.; QUENSEN 3rd, J.F.; TIEDJE, J.M.; VANDAMME, P. Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as Burkholderia xenovorans sp. nov. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, n. 5, p. 1677-1681, 2004.

GLASER, B.; HAUMAIER, L.; GUGGENBERGER, G.; ZECH, W. The 'Terra Preta' phenomenon: a model for sustainable agriculture in the humid tropics. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 88, p. 37-41, 2001.

GLASER, B.; LEHMANN, J.; ZECH, W. Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soil in the tropics with charcoal – a review. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 35, p. 219-230, 2002.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gelelectrophoresis separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, p. 3233–3241, 1997.

IIDA, T.; NAKAMURA, K.; IZUMI, A.; MUKOUZAKA, Y.; KUDO, T. Isolation and characterization of a gene cluster for dibenzofuran degradation in a new dibenzofuranutilizing bacterium, Paenibacillus sp. strain YK5. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 184, p. 305-315, 2006.

IWAI, S.; YAMAZOE, A.; TAKAHASHI, R.; KURISU, F.; YAGI, O. Degradation of monochlorinated dibenzo-p-dioxins by Janibacter sp. strain YA isolated from river sediment. **Current Microbiology**, New York, v. 51, p. 353–358, 2005.

IWAI, S.; KURISU, F.; URAKAWA, H.; YAGI, O.; KASUGA, I.; FURUMAI, H. Developmentofan oligonucleotide microarray to detect di- and monooxygenase genes for benzene degradation in soil. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 285, p. 111–121, 2008.

IWAI, S.; CHAI. B.; SUL, W.J.; COLE, J.R.; HASHSHAM, S.A.; TIEDJE, J.M. Genetargeted-metagenomics reveals extensive diversity of aromatic dioxygenase genes in the environment. **The ISME Journal**, London, v. 4, p. 279-285, 2010.

KASUGA, K.; HABE, H.; CHUNG, J.S.; YOSHIDA, T.; NOJIRI, H.; YAMANE, H.; OMORI, T. Isolation and characterization of the genes encoding a novel oxygenase component of angular dioxygenase from the Gram-positive dibenzofuran-degrader Terrabacter sp. strain DBF63. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 283, p. 195-204, 2001.

KAUPPI, B.; LEE, K.; CARREDANO, E.; PARALES, R.E.; GIBSON, D.T.; EKLUND, H.; RAMASWAMY, S. Structure of an aromatic-ring hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase. **Structure**, London, v. 6, p. 571–586, 1998.

KIM, S.J.; KWEON, O.; FREEMAN, J.P.; JONES, R.C.; ADJEI, M.D.; JHOO, J.W.; EDMONDSON, R.D.; CERNIGLIA, C.E. Molecular cloning and expression of genes encoding a novel dioxygenase involved in low- and high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. Applied and Environmental Microbiology, Washington, DC, v. 72, p. 1045–1054, 2006.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. ClustalW2 and ClustalX version 2. **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.

LIANG, B.; LEHMANN, J.; SOLOMON, D.; KINYANGI, J.; GROSSMAN, J.; O'NEILL, B.; SKJEMSTAD, J.O.; THIES, J.; LUIZÃO, F.J.; PETERSEN, J.; NEVES, E.G. Black carbon increases cation exchange capacity in soils. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 70, p. 1719–1730, 2006.

LIANG, B.; LEHMANN, J.; SOHI, S.P.; THIES, J.E.; O'NEILL, B.; TRUJILLO, L.; GAUNT, J.; SOLOMON, D.; GROSSMAN, J.; NEVES, E.G.; LUIZÃO, F.J. Black carbon affects the cycling of non-black carbon in soil. **Organic Geochemistry**, Amsterdam, v. 41, p. 206–213, 2010.

MARCOS, M.S.; LOZADA, M.; DIONISI, H.M. Aromatic hydrocarbon degradation genes from chronically polluted Subantarctic marine sediments. Letters in Applied Microbiology, Amsterdam, v. 49, p. 602-608, 2009.

NAM, J.W.; NOJIRI, H.; YOSHIDA, T.; HABE, H.; YAMANE, H.; OMORI, T. New classification system for oxygenase components involved in ring-hydroxylating oxygenations. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 65, n. 2, p. 254-263, 2001.

PENG, R.H.; XIONGM, A.S.; XUE, Y.; FU, X.Y.; GAO, F.; ZHAO, W.; TIAN, Y.S.; YAO, Q.H. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 32, n. 6, p. 927-955, 2008. Review.

PIETIKAINEN, J.; KIIKKILA, O.; FRITZE, H. Charcoal as a habitat for microbes and its effect on the microbial community of the underlying humus. **Oikos**, Kobenhavn, v. 89, p. 231-242, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 78, p. 117-130, 1989.

SCHLOSS, P.D.; LARGETE, B.R.; HANDELSMAN, J. Integration of Microbial Ecology and Statistics: a Test to Compare Gene Libraries. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, p. 5485-5492, 2004.

SCHLOSS, P.D.; WESTCOTT, S.L.; RYABIN, T.; HALL, J.R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E.B.; LESNIEWSKI, R.A.; OAKLEY, B.B.; PARKS, D.H.; ROBINSON, C.J.; SAHL, J.W.; STRES, B.; THALLINGER, G.G.; VAN HORN, D.J.; WEBER, C.F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 75, p. 7537-7541, 2009.

SHANNON, C.E.; WEANER, W. **The mathematical theory of communication**. Urbana: University of Illinois Press, 1949. 117 p.

SEI, K.; INOUE, D.; WADA, K.; MORI, K.; IKE, M.; KOHNO, T.; FUJITA, M. Monitoring behaviour of catabolic genes and change of microbial community structures in seawater microcosms during aromatic compound degradation. **Water Research**, New York, v. 38, p. 4405-4414, 2004.

SHEN, T.J.; CHAO, A.; LIN, C.F. Predicting the number of new species in further taxonomic sampling. **Ecology**, Ithaca, v. 84, n. 3, p. 789-804, 2003.

SMETS, B.F.; RITTMANN, B.E.; STAHL, D.A. The specific growth rate of Pseudomonas putida PAW1 influences the conjugal transfer rate of the TOL plasmid. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 59, n. 10, p. 3430-3437, 1993.

SILVA, M.G.G. **Diversidade funcional em solos de Terra Preta de Índio da Amazônia e carvão pirogênico.** 2011. 187 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

TAKETANI, R.G.; TSAI, S.M. The influence of different land uses on the structure of archaeal communities in Amazonian anthrosols based on 16S rRNA and amoA genes. **Microbial Ecology**, Heidelberg, v. 59, p. 734-743, 2010.

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

THIES, J.; RILLING, M. Characteristics of biochar: biological properties. In: LEHMANN, J.; JOSEPH, S. (Ed.). **Biochar for environmental management**: science and technology. London: Earthscan, 2009.

TSAI, S.M.; CANNAVAN, F.S.; SILVA JUNIOR, J.P.; CHAVES, M.G.; PASSIANOTO, C.C.; BORGES, C.P. 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.

TSAI, S.M.; O'NEILL, B.; CANNAVAN, F.S.; SAITO, D.; FALCÃO, N.P.S.; KERN, D.C.; GROSSMAN, J.; THIES, J. The microbial world of Terra Preta. In: WOODS, W.I.; TEIXEIRA, W.G.; LEHMANN, J.; STEINER, C.; REBELLATO, L. (Ed.). Amazonian Dark Earths: Wim Sombroek's Vision. Berlin: Springer Science, 2009.

WANG, L.; QIAO, N.; SUN, F.; SHAO, Z. Isolation, gene detection and solvent tolerance of benzene, toluene and xylene degrading bacteria from nearshore surface water and Pacific Ocean sediment. **Extremophiles**, Berlin, v. 12, n. 3, p. 335-342, 2008.

WILSON, M.S.; BAKERMANS, C.; MADSEN, E.L. *In situ*, real-time catabolic gene expression: extraction and characterization of naphthalene dioxygenase mRNA Transcripts from Groundwater. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 65, p. 80-87, 1999.

## 4 Efeitos da adição de hidrocarbonetos aromáticos em solos de TPI e ADJ sobre a diversidade dos genes 16S rRNA e *bph*

### **RESUMO**

Os solos de Terra Preta de Índio (TPI) apresentam características específicas que os tornam um solo de alta fertilidade em uma região de solos poucos férteis, como é o caso da Amazônia (Brasil). Essas características tornaram esses solos muito populares e estimularam a comunidade científica a estudá-los, levando em consideração diferentes aspectos. No caso da área de microbiologia, muito vem sendo estudado sobre a diversidade microbiana nestes solos e a busca por genes funcionais para utilização na área de biotecnologia, além da busca por informações do comportamento e funcionamento da comunidade microbiana em solos antrópicos. Devido à elevada concentração de matéria orgânica e carvão pirogênico nestes tipos de solo, genes relacionados à degradação de compostos aromáticos têm sido estudados em solos de TPI. Geralmente genes catabólicos são estudados em solos contaminados por compostos aromáticos, sendo assim, este estudo teve como objetivo analisar os efeitos da adição de hidrocarbonetos aromáticos em solos de TPI e seus respectivos solos adjacentes (ADJ), através da construção de microcosmos, a fim de analisar mudanças na estrutura da comunidade microbiana do gene 16S rRNA de bactéria e do gene catabólico bph, por meio da técnica de T-RFLP, e também quantificar esses genes, a partir da técnica de qPCR, nas amostras dos solos dos sítios TPI a ADJ, antes e após. Os resultados mostraram uma mudança na estrutura da comunidade do gene bph e também um aumento significativo no número de cópias deste gene por grama de solo, após incubação com hidrocarbonetos aromáticos. De maneira geral foi possível observar agrupamentos dos solos de TPI (FS e CULT) e dos solos ADJ (FS e CULT) entre si, para ambos os genes estudados, tanto para as amostras de solos dos sítios, como para as amostras de solos dos microcosmos, o que permite concluir que a estrutura da diversidade destes genes foi mais influenciada pela diferença dos solos antrópicos em relação aos seus originais, do que pela cobertura vegetal.

Palavras-chave: Microcosmos. T-RFLP. Estutura da diversidade microbiana.

### ABSTRACT

Amazon Dark Earth (ADE) soils have specific characteristics which make them a high fertility soil in a region of low fertility soils, such as the Amazon (Brazil). These characteristics make these soils very popular and encouraged the scientific community to study them, taking into account several aspects. In the case of microbiology, much has been studied about the microbial diversity in these soils and the search for functional genes to use in biotechnology, as well as search for information about the behavior and function of the microbial community in these soils. Due to the high concentration of organic matter and black carbon found in these soils, genes related to the degradation of aromatic compounds have been studied in ADE soils. Generally catabolic genes are studied in hydrocarbon contaminated soils, so this study aimed to examine the effects of aromatic hydrocarbons added in this anthropogenic soils and their adjacent soils (ADJ), using microcosms, in order to analyze changes in microbial community structure of the gene 16S rRNA of bacteria and the catabolic gene bph, through T-RFLP approach, and also quantify these genes in sites and microcosms soil samples through qPCR approach. The results showed a shift in the community structure of the gene bph and also a significant increase in the number of copies of this gene per gram of soil, after aromatic hydrocarbons incubation. Generally it was also observed a cluster of ADE soil (under secondary forest and under agricultural cultivation) and another cluster of ADJ soil (under secondary forest and under agricultural cultivation), for both genes studied and for sites and microcosm soil samples, which indicates that the structure and diversity of these genes showed to be more influenced by the differences in the soils type than by the land use.

Keywords: Microcosm. T-RFLP. Microbial diversity structure.

### 4.1 Introdução

A manutenção da diversidade dos microrganismos no ambiente está baseada principalmente em sua notável versatilidade metabólica e adaptabilidade genética (KURTBOKE et al., 2004), o que os torna uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento sustentável. Os microrganismos apresentam papel essencial na funcionalidade dos solos, no desenvolvimento de vias metabólicas e também nos ciclos biogeoquímicos. Sendo assim, uma mudança no aspecto e nas características de um solo, causadas pela adição de compostos (e.g. contaminação, fertilização) podem também modificar sua microbiota e consequentemente sua funcionalidade.

Chadhain et al. (2006) sugeriram que a contaminação de ambientes por hidrocarbonetos aromáticos pode levar a um aumento significativo na diversidade de genes dioxigenase, o que permite a sucessão das diferentes populações destes genes em resposta à presença de HAs diferentes. Quando estudados ambientes não perturbados, conseguiu-se demostrar um aumento no número de cópias do gene de dioxigenases phnAc após a contaminação com HAs (LAURIE; LLOYD-JONES, 2000). No entanto o estudo ainda se mostrou limitado, não relatando a modificação da diversidade detectável de genes envolvidos na degradação de HAs nesses ambientes após a contaminação. Fingerprinting de genes funcionais tais como os genes de tolueno / bifenil dioxigenase, através de polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP) e de eletroforese em gel com gradiente de temperatura (TGGE) tem sido recentemente relatado para o estudo de comunidades microbianas em solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos (DE CÁRCER et al., 2007; WITZIG et al., 2006). Além disso, estudos mostram a importância do uso da técnica molecular de Polimorfirmo do Tamanho do Fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP), para o fingerprinting de genes funcionais, por apresentarem alta resolução e boa reprodutibilidade (HORZ et al., 2001; SMALLA et al., 2007).

Nesse contexto, o principal objetivo desse estudo foi investigar a mudança da estrutura e abundância da comunidade bacteriana total (por meio do gene 16S rRNA) e do gene catabólico *bph* em solos de TPI e ADJ sob o efeito de sua incubação com hidrocarbonetos aromáticos em microcosmos. Foram utilizadas as técnicas moleculares de T-RFLP para acessar a estrutura da comunidade bacteriana total e de bactérias com potencial de degradação de hidrocarbonetos aromáticos, e PCR quantitativa em tempo real para quantificar a abundância dos genes 16S rRNA e *bph*. Estudos sobre modificações da estrutura microbiana
após a contaminação com hidrocarbonetos mostraram a adaptação de comunidades bacterianas após a contaminação (RÔLING et al., 2002; EVANS et al., 2004; KAUFMANN et al., 2004).

Desta maneira, investigar a mudança da microbiota total e de bactérias com capacidade metabólicas após a contaminação do solo com hidrocarbonetos aromáticos podem gerar respostas sobre o efeito da contaminação nas comunidades microbianas dos solos estudados (i.e. TPI e ADJ) e fornecer informações sobre a resiliência destes tipos de solo e o papel da microbiota na biodegradação destes compostos.

#### 4.2 Objetivos

Detectar mudanças na estrutura da comunidade do gene catabólico *bph* e do gene 16S rRNA, por meio da técnica T-RFLP ("DNA *fingerprinting*"), através da comparação de solos de sítios de TPI e ADJ e em microcosmos incubados com hidrocarbonetos aromáticos.

Quantificar o número de cópias do gene *bph* e 16S rRNA, por meio de técnica de PCR quantitativa, e comparar a abundância destes genes em solos de sítios de TPI e ADJ e em microcosmos incubados com hidrocarbonetos aromáticos.

#### 4.3 Materiais e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, CENA/USP, Piracicaba-SP.

## 4.3.1 Áreas de estudo

A descrição detalhada das áreas de estudo e amostragem estão disponíveis na seção 1.4 Materiais e Métodos, subseção 1.4.2 Áreas de estudo e amostragem (página 35, capítulo 1). Brevemente, a área de estudo está localizada na Embrapa Amazônia Ocidental (Estação Experimental do Caldeirão, Iranduba, AM). Para acessar bactérias potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos em sítios de TPI e seus respectivos sítios ADJ foi selecionado um sítio sob floresta secundária (FS) e outro sob plantio de mandioca (CULT) para cada sítio (TPI e ADJ). A coleta para este estudo foi realizada em janeiro de 2011.

# 4.3.2 Produção dos microcosmos para incubação do solo na presença de hidrocarbonetos aromáticos

Para produção dos microcosmos, foram utilizados os solos dos quatro sítios de TPI e ADJ que estão sendo analisados neste estudo. O protocolo para realização deste experimento foi baseado no trabalho de Leigh et al. (2007). Na produção de microcosmos, foram adicionados a frascos de vidro estéreis de 250 mL, 30 mL de uma solução de bifenil, 30 mL de uma solução de naftaleno e por fim 30 mL de uma solução de fenantreno, todas a uma concentração de 10 mg.mL⁻¹ em acetona. Em seguida os frascos foram deixados abertos por duas horas em fluxo laminar para que a acetona secasse por completo e assim permitisse a formação de cristais dos hidrocarbonetos utilizados. A quantidade de 5g de solo de cada sítio homogeneizado e misturado com 5 mL de água Milli-Q autoclavada foi então adicionada aos frascos e os microscosmos foram fechados com folhas de alumínio furadas, permitindo a entrada de ar. Os frascos dos microcosmos foram incubados à 30 °C e as amostras para análise foram coletadas após 15 dias de incubação. Três repetições de microcosmos foram estabelecidas para cada amostra (Figura 4.1).



Figura 4.1 - Microcosmos dos solos dos sítios TPI e ADJ (FS e CULT) incubados com hidrocarbonetos aromáticos (fenantreno, naftaleno e bifenil)

#### 4.3.3 Extração do DNA total da comunidade microbiana do solo

O DNA dos solos dos sítios TPI e ADJ e dos respectivos microcosmos foi extraído em triplicata, utilizando-se o Kit *Power Soil DNA extraction* (MoBio, Carlsbad, CA). Em microtubo contendo micro esferas de vidro foram adicionados 0,25 g de amostras de solo e agitados gentilmente para homogeneização das amostras. O DNA total do solo foi extraído de acordo com as instruções indicadas pelo fabricante.

Para a quantificação do material extraído, alíquotas de 5  $\mu$ l foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1 % (p.v⁻¹) e coradas com brometo de etídio (0,5  $\mu$ g.ml⁻¹ de gel). Como padrão molecular foram utilizados 2  $\mu$ l de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Life Technologies). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 minutos e depois registrado por foto-documentação.

O DNA extraído foi também quantificado em espectrofotômetro, adotando-se a relação de 1,0 densidade ótica a 260 nm (OD 260) como sendo igual a 50 ng de DNA. $\mu$ l⁻¹ (SAMBROOK et al., 1989). O DNA extraído foi armazenado à -20 °C.

### 4.3.4 Amplificação do gene 16S rRNA

Para as reações de amplificação do gene 16S rRNA de *Bacteria*, foram utilizados os *primers* universais 27f (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e 1492r (5' ACC TTG TTA CGA CTT 3') (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995). Para a detecção de fluorescência na análise de T-RFLP, a extremidade 5' do *primer* 27f foi marcada com 6-carboxyfluorescein (FAM). A amplificação foi feita em solução contendo 10 ng de DNA, 2,5  $\mu$ l 10X *Reaction buffer* (Invitrogen), 3,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,25 mM de cada *primer*, 1,0 U de *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) e água Milli-Q autoclavada para volume final de 25 $\mu$ L. As reações de amplificação foram realizadas nas seguintes condições: 94 °C por 3 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 59 °C por 45 segundos e 72 °C por 1 minuto; e uma extensão final de 72 °C por 15 minutos. Uma alíquota de 5  $\mu$ L do produto de amplificação foi analisada em gel de agarose 1 % (p.v⁻¹) em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004), utilizando como padrão molecular 2  $\mu$ L de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 minutos e posteriormente foto documentado.

### 4.3.5 Amplificação do gene bph

Para as reações de amplificação do gene *bph*, foram utilizados os *primers* BPHD F0 (5' TAYATGGGBBGARGAYCCIGT 3') e BPHD R1 (5' ACCCAGTTYTCICCRTCGTC 3') (IWAI et al., 1995). Para a detecção de fluorescência na análise de T-RFLP, a extremidade 5' do *primer* BPHD F1 foi marcada com 6-carboxyfluorescein (FAM). Soluções "mix" foram preparadas para as reações de amplificação com os reagentes dNTPs (0,2 mM); tampão 10X (Tris-base a 200 mM, pH 8,4; KCl a 500 mM) (1X); MgCl₂ (1,5 mM); *Taq* DNA polimerase (1U); *primers* (25 pmol.reação⁻¹); DNA (40 ng.reação⁻¹), e água ultra pura estéril (Milli-Q) para volume final de 25  $\mu$ L. Os ciclos utilizados foram: um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 segundos; anelamento dos *primers* a 60 °C por 45 segundos, e extensão a 72°C por 40 segundos; um ciclo de extensão final a 72 °C por 5 minuntos e manutenção a 4 °C. Uma alíquota de 5  $\mu$ L do produto de amplificação foi analisada em gel de agarose 1 % (p.v⁻¹) em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004), utilizando como padrão molecular 2  $\mu$ L de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology).

### 4.3.6 Purificação dos produtos de PCR

Para a purificação dos produtos de PCR a serem analisados pela técnica de T-RFLP foi utilizado o Kit *GFXTM* PCR DNA *and Gel Band Purification* (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. Uma alíquota de 5  $\mu$ L do DNA purificado foi analisada em gel de agarose 1 % (p.v⁻¹) em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004), utilizando como padrão molecular 2  $\mu$ L de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 minutos e fotodocumentado.

#### 4.3.7 Reação de restrição dos produtos de PCR para análise de T-RFLP

Os produtos de PCR dos genes 16S e *bph* purificados foram utilizados nas reações de restrição com a endonuclease *Hha*I (GCG^C) que apresentou melhores resultados para uso em T-RFLP (MARSH et al., 2000). Nas reações foram utilizados 1,5  $\mu$ L do Buffer React 10X; 0,15  $\mu$ L de BSA 1 ng.  $\mu$ L⁻¹; 0,06  $\mu$ L da endonuclease 10U (Invitrogen); 5  $\mu$ L do produto de PCR purificado e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para o volume final de 15  $\mu$ L. As reações de restrição foram realizadas nas seguintes condições: 37° C por 3 horas e 68 °C por 10 minutos para inativação da endonuclease.

#### 4.3.8 Precipitação dos produtos de digestão

Após a reação de restrição, os produtos digeridos foram precipitados para análise de fragmentos no seqüenciador automático. Para a precipitação foram adicionados 2  $\mu$ L de tampão Acetato de Sódio/EDTA e 60  $\mu$ L de etanol absoluto à 15  $\mu$ L do produto da digestão. A mistura foi agitada levemente no vortex e centrifugada por 15 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 150  $\mu$ L de etanol 70 % recém preparado e centrifugou-se a 14.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em concentrador de DNA a 45 °C por aproximadamente 10 minutos. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até sua utilização.

# 4.3.9 Processamento e análises do Polimorfismo dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP) do gene 16S rRNA e *bph*

A obtenção dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFs) foi adquirida em sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Para o carregamento das amostras no sequenciador, o produto precipitado foi ressuspendido em mistura contendo 9,75  $\mu$ L de Formamida HiDi e 0,25  $\mu$ L de padrão de comprimento GeneScanTM – 500 ROXTM Size Standard (Applied Biosystems). Antes do carregamento as amostras foram desnaturadas por 5 minutos a 95 °C e resfriadas a 0 °C por 4 min.

Após a realização da técnica de T-RFLP para as amostras dos sítios TPI e ADJ e seus respectivos microcosmos, os dados obtidos foram primeiramente analisados com o programa PeakScanner v1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA), sendo inspecionados visualmente para conferir a qualidade das corridas. Após a confirmação da qualidade das corridas, os

dados foram exportados em uma matriz para o programa Excel (Microsoft) onde foram organizados para a análise multivariada. Para as amostras dos genes 16S rRNA e *bph*, uma linha base limite de 50 unidades de fluorescência foi usada para discriminar os "picos verdadeiros" dos ruídos do background proveniente da técnica, e T-RFs menores que 50 pares de base e maiores que 800 foram eliminados de todos os dados (CULMAN et al., 2008).

Os dados de altura dos picos (unidades de fluorescência) foram transformados em dados relativos, onde os valores absolutos referentes à intensidade dos picos no eletroferograma e correspondentes aos comprimentos dos fragmentos foram apresentados na forma de valores percentuais de detecção. Essa transformação dos dados foi calculada dividindo cada valor de tamanho de pico pelo valor total dos picos de uma amostra. Isso é análogo em transformar cada altura de pico em dados de porcentagem em relação ao total de valores de altura de pico em uma amostra (CULMAN et al., 2008).

Após a montagem da matriz dos dados, a mesma foi transformada em uma matriz de distância, usando a medida de Hellinger (LEGENDRE; GALLAGHER, 2001). As análises estatísticas foram realizadas nos programas Canoco for Windows 4.5 (Biometris, Wageningen, Holanda) e Primer5 (Plymouth Marine Laboratory, Primer-E, Reino Unido).

#### 4.3.10 PCR quantitativa em tempo real

As análises de PCR em tempo real foram realizadas para quantificação do número de cópias de genes de dioxigenases aromáticas (*bph*) e do gene ribossomal 16S rRNA em solos dos sítios TPI e ADJ, bem como para os seus respectivos microcosmos. As reações foram realizadas no equipamento StepOnePlus® (Applied Biosytems), utilizando o sistema SYBR Green.

### 4.3.10.1 Amplificação de genes bph e 16S rRNA para qPCR

A descrição da metodologia utilizada para a amplificação dos genes 16S rRNA e *bph*, encontra-se na seção 3.3 Materiais e Métodos, subseção 3.3.6 PCR quantitativa em tempo real (página 108, capítulo 3).

#### 4.4 Resultados e Discussão

#### 4.4.1 Extração do DNA total da comunidade microbiana do solo

O DNA total das comunidades microbianas dos solos TPI e ADJ e dos solos de microcosmos (15 dias de incubação) foi extraído utilizando-se o *Power Soil DNA extraction* (MoBio, Carlsbad, CA). O total de amostras de solo com o DNA extraído foi de 24 amostras, sendo 12 amostras de solo dos sítios TPI e ADJ e 12 amostras de solo dos microcosmos (Tabela 4.1) A verificação da qualidade do material extraído foi feita em gel de agarose a 1 % (Figura 4.2). O padrão de peso molecular (PM) utilizado foi o *Low Mass DNA Ladder*[™] (Invitrogen Life Technologies).

Tabela 4.1 – Identificação dos solos dos sítios TPI e ADJ e dos solos dos microcosmos coletados aos 5 e 15 dias de incubação

Solos	Repeticões	Sigla
TPI FS	3	TPI FS
TPI CULT	3	TPI CULT
ADJ FS	3	ADJ FS
ADJ CULT	3	ADJ CULT
MICROCOSMO TPI FS (15 DIAS)	3	TPI FS M
MICROCOSMO TPI CULT (15 DIAS)	3	TPI CULT M
MICROCOSMO ADJ FS (15 DIAS)	3	ADJ FS M
MICROCOSMO ADJ CULT (15 DIAS)	3	ADJ CULT M



Figura 4.2 - Gel de agarose do DNA total dos solos TPI e ADJ e seus respectivos microcosmos. PM: padrão de peso molecular *Low Mass DNA Ladder*TM (Invitrogen Life Technologies)

A pureza e o rendimento das extrações foram satisfatórios para todos os solos dos sítios TPI e ADJ e dos microcosmos. O material extraído foi suficiente para as amplificações por técnica de PCR para o gene 16S rRNA e *bph*.

# 4.4.2 Análise do Polimorfismo dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP) do gene 16S rRNA e *bph*

Após a análise visual dos eletroferogramas gerados para as amostras analisadas, as matrizes de dados foram convertidas em matrizes de distância pelo programa Canoco 4.5, utilizando o índice de Hellinger (LEGENDRE; GALLAGHER, 2001), recomendado para análises de T-RFLP.

Os perfis de T-RFLP foram comparados calculando a abundância relativa dos fragmentos terminais de restrição (T-RF), para os sítios e microcosmos analisados, onde cada T-RF foi considerado uma UTO distinta. As análises de T-RFLP permitem uma análise quantitativa da comunidade por meio da abundância relativa dos picos, os quais representam os membros de uma comunidade numa reação de PCR (BRAKER et al., 2001; SESSITSCH et al., 2001). A partir dos dados das T-RFs geradas para cada amostra, foram gerados histogramas para a observação dos fragmentos com abundância relativa >1 % (Figura 4.3), sendo considerados UTOs de organismos dominantes nessas comunidades (LEHOURS et al., 2005).



Figura - 4.3 - Abundância relativa de T-RFs de comunidades do gene 16S rRNA de *Bacteria* nas amostras de solo dos sítios estudados (A) e nas amostras dos microcosmos estudados (B) e também abundância relativa de T-RFs de comunidades do gene *bph* de *Bacteria* nas amostras de solo dos sítios estudados (C) e nas amostras dos microcosmos estudados (D).

Analisando o histograma de abundância relativa de UTOs não foi possível observar grandes diferenças na estrutura da comunidade microbiana de bactéria (16S rRNA), quando comparamos os solos entre si, e também quando os solos são comparados com os respectivos microcosmos de cada sítio. Esses resultados mostram que não houve uma mudança na comunidade de bactérias das amostras dos sítios analisados após sua incubação com os hidrocarbonetos aromáticos. Em estudos realizados comparando a comunidade microbiana de bactéria de solos de Terra Preta de outros sítios, com seus solos adjacentes, pela técnica de T-RFLP foi observada mudanças significativas na estrutura da comunidade (CANNAVAN, 2012). Esse fato pode indicar que pode haver diferenças entre as comunidades microbianas entre solos antrópicos de diferentes sítios, que tiverem diferentes assentamentos, além do tempo de ação antropogênica que cada solo recebeu.

De maneira diferente, quando se observa a abundância relativa para o gene *bph*, é possível notar diferenças na estrutura da comunidade desse gene entre os sítios analisados. O mesmo ocorre ao analisar a comunidade desse gene após incubação com os hidrocarbonetos, onde se torna possível observar grande diferença na estrutura da comunidade do gene nas amostras de microcosmos, comparadas às amostras antes da incubação. Um estudo de microcosmo realizado por Leigh et al. (2007) mostrou que após incubação de amostras de solos com o hidrocarboneto bifenil houve um aumento no número C¹³ associados à TRFs, sugerindo que o carbono fluiu através de microrganismos que utilizam bifenil como fonte de carbono para outros organismos da comunidade microbiana do solo.

Para testar a diferença na composição das comunidades de ambos os genes para as amostras analisadas, a análise de similaridade ANOSIM (teste calculado com base no coeficiente de similaridade de Bray-Curtis) foi realizada (Tabela 4.2) utilizando o programa Primer5 (CLARKE, 1993). ANOSIM é um teste estatístico baseado em permutação, análogo ao teste ANOVA, o qual testa a diferença entre grupos de amostras de diferentes locais e tratamentos experimentais (YANNARELL; TRIPLETT, 2004; DANOVARO et al., 2006). Neste trabalho foi utilizado o valor de R global para analisar diferenças estatísticas entre as amostras dentro de um grupo (i.e. as amostras dos solos dos sítios de TPI e ADJ para um determinado gene; as amostras dos solos dos microcosmos para um determinado gene). O Valor de R global varia de -1 a +1. Valores negativos, ou que não apresentaram p<0,05, indicam que os grupos comparados não foram considerados estatisticamente diferentes entre si. Valores positivos de R global revelam diferenças entre os grupos comparados e quanto mais próximos de 1, maior a diferença entre os grupos.

inicrocosmos analisados		
Grupos comparados	Valor de R global	Teste de Tukey
16S Solo Sítios TPI e ADJ	0,17	p<0,01
16S Solos Microcosmos	0,62	p<0,05
bph Solo Sítios TPI e ADJ	1,00	p<0,05
bph Solo Sítios Microcosmos	1,00	p<0,05

Tabela 4.2 – Valores de R global calculados por ANOSIM para os dados obtidos através de T-RFLP considerando os genes 16S rRNA e *bph* de bactéria nas amostras dos sítios e microcosmos analisados

Os valores de R global confirma a análise do histograma de abundância relativa (Figura 4.3), onde as maiores mudanças na estrutura da comunidade, tanto para as amostras de solo dos sítios TPI e ADJ, quanto para as amostras de solo dos microcosmos, aconteceram para a comunidade do gene *bph* de bactérias. Comparando os grupos de amostras para a estrutura da comunidade do gene 16S rRNA, é possível observar maior diferença entre as amostras dos solos de microcosmos.

# **4.4.3** Estruturas das comunidades microbianas (gene 16S rRNA) e do gene catabólico (*bph*) no perfil dos solos dos sítios de TPI e ADJ

A análise de Componentes Principais dos perfis de T-RFLP das estruturas de comunidades dos genes 16S rRNA e *bph* de bactérias dos solos dos sítios TPI e ADJ e dos solos de microcosmos mostraram distintos agrupamentos (Figura 4.4).

Para as comunidades de *Bacteria* (16S rRNA), as amostras foram separadas de forma distinta no gráfico de ordenação, sendo a variabilidade das amostras explicada 74,4 % no eixo 1 para os solos dos sítios e 82,4 % no eixo 1 para os solos dos microcosmos. Os grupos ficaram divididos de acordo com o tipo de solo (TPI e ADJ).

Os agrupamentos definidos no gráfico de ordenação para o gene *bph* demarcaram posições separando as amostras também de acordo com o tipo de solo (TPI e ADJ) e também de acordo com o uso do solo (FS e CULT) para ambos os estudos (amostras de solos dos sítios e dos microcosmos). As amostras foram separadas de forma distinta no gráfico de ordenação, sendo a variabilidade das amostras explicada 62,6 % no eixo 1 para os solos dos sítios e 89,7 % no eixo 1 para os solos dos microcosmos.



Figura 4.4 - Análises de Componentes Principais da comunidade microbianas de bactéria (16S rRNA) dos sítios (A) e dos microcosmos (B) estudados; Análises de Componentes Principais da comunidade do gene *bph* dos sítios (C) e microcosmos (D) estudados

De modo geral, a PCA realizada com os dados de T-RFLP das comunidades dos genes 16S rRNA e *bph* de bactérias revelou diferenças estruturais na composição dessas comunidades nos ambientes estudados, formando grupos claramente definidos para cada ambiente amostrado. Os resultados de T-RFLP também foram sensíveis em revelar a mudança do agrupamento das amostras das comunidades microbianas do gene catabólico *bph* depois da incubação das amostras de solo com hidrocarbonetos aromáticos, sendo que foi observado que antes da incubação os grupos se davam principalmente pelo tipo de solo, separando os solos de TPI dos solos de ADJ de maneira bem demarcada, e após a incubação os grupos estão separados de acordo com sua cobertura vegetal, sendo observados os solos TPI e ADJ sob cultivo agrícola do lado esquerdo e os solos TPI e ADJ sob floresta secundária do lado direito do plote (Figura 4.4 - C). Pode-se notar também que as amostras para o gene *bph* se agrupam de forma mais evidentes, sendo separadas de acordo com o tipo de solo ou uso da terra, confirmando os dados de R global (ANOSIM) que mostram maior diferença dessas amostras nos resultados de T-RFLP para o gene *bph*.

#### 4.4.4 Análise de riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais

A partir dos dados obtidos com a técnica de T-RFLP, foram analisados os dados de riqueza de UTOs, considerando-se, cada T-RF encontrado no perfil de uma comunidade, uma UTO. Como as amostras foram analisadas em triplicatas biológicas, se um pico de fluorescência se mostrou presente em apenas uma das triplicatas, esse pico foi considerado uma T-RF presente no ambiente, minimizando assim, o efeito de organismos dominantes. Foram gerados gráficos de riquezas de UTOs a fim de se avaliar a quantidade de TRFs encontradas nas amostras de solos de sítios e de microcosmos estudadas (Figura 4.5).



Figura 4.5 - Riqueza de UTOs detectadas nas amostras dos sítios TPI e ADJ para os genes 16S rRNA e *bph* (A) e também detectadas nas amostras dos microcosmos, também para ambos os genes. Nesta figura também é mostrada a diferença entre a riqueza de UTOs quando comparadas as amostras antes e depois da incubação para o gene *bph* (C)

Para a comunidade microbiana de *Bacteria*, as amostras que apresentaram maior riqueza foram as dos sítios de TPI (FS e CULT) seguidas pelas amostras dos sítios ADJ (FS e CULT). Para as amostras de solo dos sítios, antes da incubação o número de UTOs variou entre 140 e 160. O mesmo padrão foi observado para a comunidade microbiana de *Bacteria* para as amostras após incubação, onde as amostras também apresentaram maiores valores para os solos de TPI, e não foi observada alteração da comunidade bacteriana de bactéria após a incubação. No estudo de Lima (2012) também foi observado que os solos de TPI apresentaram maior riqueza de UTOs que os solos adjacentes, para o mesmo sítio estudado (Caldeirão – Embrapa Amazônia).

Analisando a comunidade do gene *bph* as amostras que apresentaram maior riqueza foram as dos sítios de TPI (FS e CULT) seguidas pelas amostras dos sítios ADJ (FS e CULT). Para as amostras de solo dos sítios, antes da incubação o número de UTOs variou entre 70 e 90. O mesmo padrão foi observado para a comunidade microbiana deste gene para as amostras após incubação, onde as amostras também apresentaram maiores valores para os solos de TPI, porém foi observado um aumento no número de UTOs após incubação, apresentando valores de 80 a 100 UTOs.

Também foram construídos diagramas de Venn (FAUTH et al., 1996) para verificar as intersecções e peculiaridades entre os ambientes, identificando o número de UTOs exclusivas e compartilhadas entre as amostras analisadas (Figura 4.6).



Figura 4.6 - Diagramas de Venn baseados nas UTOs detectadas pela técnica de T-RFLP para o gene 16S rRNA dos solos dos sítios TPI e ADJ (A) e dos solos dos microcosmos (B) e para o gene *bph* dos solos dos sítios TPI e ADJ (C) e dos solos dos microcosmos (D)

Após análise dos Diagramas de Veen baseados nas UTOs detectadas para o gene 16S rRNA para os solos dos sítios é possível observar que houve várias UTOs compartilhadas nas comparações entre os solos, mas que as amostras dos sítios de TPI apresentaram mais UTOs exclusivas, sendo 13 para o sítio TPI FS e 15 para o sítio TPI CULT, quando os mesmos foram comparados com seus respectivos solos ADJ. Essas amostras (TPI FS e TPI CULT) também apresentaram maior riqueza de UTOs (Figura 4.5 - A). Ainda analisando as UTOs para o gene 16S rRNA para as amostras de solos dos sítios, é possível observar maior quantidade de UTOs exclusivas nas amostras de solo dos sítios sob floresta secundária quando comparadas com as amostras de solo dos sítios sob cultivo agrícola. Ainda fazendo a análise dos diagramas para o mesmo gene, porém nas amostras de solos após a incubação é mantido o padrão para maior quantidade de UTOs exclusivas em sítios de TPI, sendo 14 para o sítio TPI FS e 24 para o sítio TPI CULT.

Continuando a análise das UTOs detectadas para o gene catabólico *bph* foi possível observar que houve várias UTOs compartilhadas nas comparações entre os solos, mas que as

amostras dos sítios de TPI apresentaram mais UTOs exclusivas, sendo 63 para o sítio TPI FS e 60 para o sítio TPI CULT, quando os mesmos foram comparados com seus respectivos solos ADJ. Essas amostras (TPI FS e TPI CULT) também apresentaram maior riqueza de UTOs (Figura 4.5 - B). Ainda analisando as UTOs para o gene *bph* para as amostras de solos dos sítios, é possível observar maior quantidade de UTOs exclusivas nas amostras de solo dos sítios sob floresta secundária quando comparadas com as amostras de solo dos sítios sob cultivo agrícola. Para a análise dos diagramas para o mesmo gene, porém nas amostras de solos após a incubação é mantido o padrão para maior quantidade de UTOs exclusivas em sítios de TPI, sendo 51 para o sítio TPI FS e 61 para o sítio TPI CULT.

#### 4.4.5 PCR quantitativa em tempo real

A técnica de PCR quantitativa em tempo real permitiu quantificar os genes 16S e *bph* nas amostras de solo dos sítios de TPI e ADJ após a incubação com hidrocarbonetos aromáticos. Os dados de qPCR para as amostras de microcosmos foram obtidos juntamente com os dados para as amostras de solos dos sítios (Capítulo 3, seção 3.4 Resultados e discussão, subseção 3.4.5 PCR quantitativa em tempo real, página 129)

Sendo assim, na PCR quantitativa para o gene *bph*, a temperatura de *melting* média foi de 88 °C, e a eficiência de amplificação foi de 99,9 % com um valor de R²>0,99 (Capítulo 3, seção 3.4 Resultados e discussão, subseção 3.4.5 PCR quantitativa em tempo real, Figuras 3.15 e 3.16, páginas 130 e 131).

Da mesma maneira, na PCR quantitativa para o gene 16S rRNA, a temperatura de *melting* média foi de 85°C, e a eficiência de amplificação foi de 99,3 % com um valor de  $R^2>0,99$  (Capítulo 3, seção 3.4 Resultados e discussão, subseção 3.4.5 PCR quantitativa em tempo real, Figuras 3.17 e 3.18, páginas 131 e 132).

Os dados obtidos a partir da técnica de PCR quantitativa permitiram a comparação entre as comunidades funcionais dos quatro sítios analisados antes e após a incubação com hidrocarbonetos aromáticos em microcosmos, quanto ao número de cópias de genes de dioxigenases aromáticas, e também fazendo uma comparação com a comunidade microbiana total de cada solo estudado, quantificando o número de cópias do gene 16S.

A abundância média do gene *bph* variou de 2,9 x  $10^6$  a 2,7 x  $10^6$  cópias.g⁻¹ de solo para as amostras de solo dos sítios TPI (FS e CULT respectivamente) e de 2,4 x  $10^6$  a 1,5 x  $10^6$  cópias.g⁻¹ de solo para os sítios ADJ (FS e CULT respectivamente). Já em relação ao microcosmo, a abundância média do gene *bph* variou de 1,4 x  $10^8$  a 2,9 x  $10^7$  cópias.g⁻¹ de solo para as amostras de solo dos microcosmos dos sítios TPI (FS e CULT respectivamente) e de 4,9 x  $10^6$  a 3,5 x  $10^6$  cópias.g⁻¹ de solo dos microcosmos dos sítios ADJ (FS e CULT respectivamente). A abundância média do gene *bph* diferiu entre os diferentes usos da terra para ambos os solos estudados (TPI e ADJ) e foi possível observar um aumento significativo do número de cópias deste gene após a incubação dos solos com hidrocarbonetos aromáticos (Figura 4.7). É possível notar maior abundância deste gene nos solos sob floresta secundária para ambos os tipos de solo, antes e após incubação (Figura 4.7 - A e B). As diferenças apresentadas para o número de cópia do gene *bph* foram estatisticamente significativas (Teste de Tukey, p < 0,01), o que fortalece a ideia de que solos de TPI apresentam maior quantidade de genes catabólicos e que este número ainda aumentou após a incubação dos solos de todos os sítios com hidrocarbonetos aromáticos, mostrando que experimentos de enriquecimento do solo com algum composto de interesse pode influenciar na quantidade de um gene específico em ecossistemas usados em estudo de prospecção.

Para o gene 16S rRNA, a abundância média variou de 9,7 x  $10^7$  a 7,5 x  $10^7$  de cópias.g⁻¹ de solo para os sítios de TPI (FS e CULT respectivamente) e de 3,3 x  $10^7$  a 2,7 x  $10^7$  de cópias.g⁻¹ de solo para os sítios ADJ (FS e CULT respectivamente). Já em relação ao microcosmo, a abundância média do gene 16S variou de 2,4 x  $10^9$  a 7,9 x  $10^8$  cópias.g⁻¹ de solo para as amostras de solo dos microcosmos dos sítios TPI (FS e CULT respectivamente) e de 3,4 x  $10^8$  a 3,2 x  $10^8$  cópias.g⁻¹ de solo dos microcosmos dos sítios ADJ (FS e CULT respectivamente) e de 3,4 x  $10^8$  a 3,2 x  $10^8$  cópias.g⁻¹ de solo dos microcosmos dos sítios ADJ (FS e CULT respectivamente). A abundância média do gene 16S rRNA diferiu entre os diferentes usos da terra para ambos os solos estudados (TPI e ADJ) e foi possível observar um aumento significativo do número de cópias deste gene após a incubação dos solos com hidrocarbonetos aromáticos (Figura 4.7). É possível notar maior abundância deste gene nos solos sob floresta secundária para ambos os tipos de solo, antes e após incubação (Figuras 4.7 - A e B). As diferenças apresentadas para o número de cópia do gene 16S rRNA foram estatisticamente significativas (Teste de Tukey, p < 0,01).



Figura 4.7 – Gráfico da quantificação (abundância) dos genes 16S rRNA e *bph* (indicados no eixo horizontal) analisados por PCR quantitativa, nas amostras de solo dos sítios TPI e ADJ (A) e nas amostras dos microcosmos (B). Também foi plotado um gráfico que compara o número de cópias do gene *bph* antes e após incubação com hidrocarbonetos aromáticos (C). Eixo vertical: escala logarítmica (cópias do gene g⁻¹). Barra de erros representa o erro padrão (*n*=4)

De modo geral, foi possível verificar maior número de cópias de genes catabólicos e do gene ribossomal 16S rRNA nas amostras de solos dos sítios de TPI quando comparadas ao solo dos seus sítios de origem e antes e após incubação com hidrocarbonetos aromáticos. O sítio que apresentou maior número de cópias do gene *bph* e do gene ribossomal 16S por grama de solo foi o TPI FS, após incubação com 1,4 x  $10^8$  e 2,4 x  $10^9$  cópias de genes.g⁻¹, respectivamente.

A aplicação da PCR quantitativa mostrou-se uma ferramenta eficiente para detectar e monitorar a abundância de genes específicos, envolvidos em processos metabólicos no solo, como também pôde ser observado no trabalho de Silva (2011). Estudos que utilizaram técnicas de qPCR (TAKETANI; TSAI, 2010; LIMA, 2012) também observaram ser um método confiável e de fácil repetibilidade, permitindo a comparação da abundância de genes de interesse em diferentes amostras de solo. Por fim, vale destacar sua eficácia em experimentos de microcosmos, possibilitando o monitoramento de possíveis flutuações do

gene catabólico de acordo com o efeito causado pela adição dos diferentes hidrocarbonetos aromáticos sobre as comunidades analisadas.

#### 4.5 Conclusões

O emprego da técnica de T-RFLP na análise da estrutura da comunidade microbiana de bacteria (16S rRNA) não revelou diferenças estruturais na composição das comunidades entre as amostras dos diferentes sítios analisados. Também não foi possível verificar diferenças na estrutura da comunidade bacteriana (16S rRNA) após a incubação do solo com hidrocarbonetos aromáticos nas amostras de microcosmos. Porém quando a técnica de T-RFLP foi empregada para analisar diferenças na estrutura da comunidade do gene catabólico *bph*, foi possível observar diferenças significativas entre as amostras dos diferentes sítios, e também após a incubação com hidrocarbonetos aromáticos, concluindo-se que o experimento de microcosmo foi satisfatório e causou significativo efeito sobre a diversidade deste gene catabólico após a adição de hidrocarbonetos nas amostras de solo.

Os resultados obtidos através da técnica de PCR quantitativa mostraram um aumento significativo no número de cópias de ambos os genes estudados (16S rRNA e *bph*) após incubação com hidrocarbonetos aromáticos.

Através das análises dos resultados também foi possível observar agrupamentos dos solos de TPI (FS e CULT) entre si e agrupamento dos solos ADJ (FS e CULT) entre si, para ambos os genes estudados, tanto para as amostras de solos dos sítios, como para as amostras de solos dos microcosmos, o que permite concluir que a estrutura da diversidade dos genes foi mais influenciada pela diferença dos solos antrópicos em relação aos seus originais, do que a influência do uso da terra.

Adicionalmente, os resultados apoiam o uso de ferramentas moleculares a fim de monitorar impactos de ações antrópicas e/ou contaminação no solo, sobre as comunidades microbianas destes ambientes, de forma a prever possíveis efeitos no ecossistema.

## Referências

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

BRODY, J.R.; KERN, S.E. Sodium boric acid: Atriz-less, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, New York, v. 36, p. 214-216, 2004.

BRAKER, G.; AYALA-DEL-RIO, H.L.; DEVOL, A.H.; FESEFELDT, A.; TIEDJE, J.M. Community structure of denitrifiers, *Bacteria* and *Archaea* along redox gradients in Pacific Northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nirS*) and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 67, p. 1893-1901, 2001.

CANNAVAN, F.S. A estrutura e composição de comunidades microbianas (Bacteria e Archaea) em fragmentos de carvão pirogênico de Terra Preta de Índio da Amazônia Central. 2012. 116 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

CHADHAIN, S.M.N.; NORMAN R.S.; PESCE, K.V.; KUKOR, J.J.; ZYLSTRA, G.J. Microbial dioxygenase gene population shifts during polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 72, n. 6, p. 4078–4087, 2006.

CLARKE, K.R. Nonparametric multivariate analyses of changes in community structure. **Australian Journal of Ecology**, Carlton, v. 18, p. 117-143, 1993.

CULMAN, S.W.; GAUCH, H.G.; BLACKWOOD, C.B.; THIES, J.E. Analysis of T-RFLP data using analysis of variance and ordination methods: A comparative study. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 75, p. 55-63, 2008.

DANOVARO, R.; LUNA, G.M.; DELL'ANNO, A.; PIETRANGELI, B. Comparison of two fingerprintings techniques, terminal restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis, for determination of bacterial diversity in aquatic environments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 72, p. 5982-5989, 2006.

DE CÁRCER, D.A.; MARTI, M.; KARLSON, U.; RIVILLA, R. Changes in bacterial populations and in biphenyl dioxygenase gene diversity in a polychlorinated biphenyl-polluted soil after introduction of willow trees for rhizoremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 73, p. 6224-6232, 2007.

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

FAUTH, J.E.; BERNARDO, J.; CAMARA, M.; RESETARITS JUNIOR, W.J.; VAN BUSKIRK, J.; McCOLLUM, S.A. Simplifying the jargón of community ecology: a conceptual approach. **The American Naturalist**, Chicago, v. 147, n. 2, p. 282-286, 1996.

HORZ, H.P.; TCHAWA YIMGA, M.; LIESACK, W. Detection of methanotroph diversity on roots of submerged rice plants by molecular retrieval of pmoA, mmoX, mxaF, and 16S rRNA and ribosomal DNA, including pmoA-based terminal restriction fragment length polymorphism profiling. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 67, p. 4177-4185, 2001.

IWAI, S.; CHAI. B.; SUL, W.J.; COLE, J.R.; HASHSHAM, S.A.; TIEDJE, J.M. Genetargeted-metagenomics reveals extensive diversity of aromatic dioxygenase genes in the environment. **The ISME Journal**, London, v. 4, p. 279-285, 2010.

KAUFMANN, K.; CHRISTOPHERSEN, M.; BUTTLER, A.; HARMS, H.; HÖHENER, P. Microbial community response to petroleum hydrocarbon contamination in the unsaturated zone at the experimental field site Værløse, Denmark. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 48, p. 387–399, 2004.

KURTBOKE, D.I.; SWINGS, J.; STORMS, V. **Microbial genetic resources and biodiscovery**. Egham, UK: WFCC Publications, 2004. 400 p.

LAURIE, A.D.; LLOYD-JONES, G. Quantification of phnAc and nahAc in contaminated New Zealand soils by competitive PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 66, p. 1814–1817, 2000.

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

LeHOURS, A.C.; BARDOT, C.; THENOT, A.; DEBROAS, D.; FONTY, G. Anaerobic microbial communities in Lake Pavin, a unique meromictic lake in France. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 71, p. 7389-7200, 2005.

LEIGH, M.B.; PELLIZARI, V.H.; UHLIK, O.; SUTKA, R.; RODRIGUES, J.; OSTROM, N.; ZHOU, J.; TIEDJE, J.M. Biphenyl-utilizing bacteria and their functional genes in a pine root zone contaminated with polychlorinated biphenyls (PCBs). **The ISME Journal,** London, v. 1, p. 134–148, 2007.

LIMA, A.B. Influência da cobertura vegetal nas comunidades de bactérias em Terra **Preta de Índio na Amazônia Central brasileira.** 2012. 116 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

MARSH, T.L.; SAXMAN, P.; COLE, J.; TIEDJE, J. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 66, p. 3616-3620, 2000.

RÖLING, W.F.; MILNER, M.G.; JONES, D.M.; LEE, K.; DANIEL, F.; SWANNELL, R.J.; AND HEAD, I.M. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 68, p. 5537–5548, 2002.

SESSITSCH, A.; WEILHARTER, A.; GERZABEK, M.H.; KIRCHMANN, H.; KANDELER, E. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 67, p. 4215-4224, 2001.

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

SILVA, M.G.G. **Diversidade funcional em solos de Terra Preta de Índio da Amazônia e carvão pirogênico.** 2011. 187 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

TAKETANI, R.G.; TSAI, S.M. The influence of different land uses on the structure of archaeal communities in Amazonian anthrosols based on 16S rRNA and amoA genes. **Microbial Ecology**, Heidelberg, v. 59, p. 734-743, 2010.

WITZIG, R.; JUNCA, H.; HECHT, H.J.; PIEPER, D.H. Assessment of toluene/biphenyl dioxygenase gene diversity in benzene-polluted soils: links between benzene biodegradation and genes similar to those encoding isopropylbenzene dioxygenases. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 72, p. 3504-3514, 2006.

YANNARELL, A.C.; TRIPLETT, E.W. Within- and between-lake variability in the composition of bacterioplankton communities: investigations using multiple spatial scales. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, p. 214-223, 2004.