

# DIVERSIDADE MICROBIANA NOS SOLOS: DEFININDO NOVOS PARADIGMAS

Márcio Rodrigues Lambais<sup>(1)</sup>, Juliano de Carvalho  
Cury<sup>(2)</sup>, Carolina Riviera Maluche-Baretta<sup>(3)</sup> &  
Ricardo de Campos Büll<sup>(4)</sup>

Introdução .....	44
Diversidade Microbiana Estimada .....	44
Métodos para o Estudo da Diversidade Microbiana nos Solos .....	49
Métodos dependentes de cultivo .....	49
Isolamento em meios de cultura .....	49
Perfil fisiológico de comunidades microbianas (Biolog) .....	52
Métodos independentes de cultivo .....	53
PLFA e FAME .....	54
PCR-DGGE .....	55
SSCP .....	58
ARDRA .....	58
T-RFLP .....	59
RISA .....	60
SARST .....	60
Seqüenciamento de clones de rDNA .....	61
Hibridização em microarranjos (GeneChips) .....	63
Abordagens para a Análise de Dados de Diversidade Microbiana .....	64
Fatores Determinantes da Diversidade e Estrutura das Comunidades Microbianas do Solo ...	66
Diversidade, Estrutura de Comunidades e Metabolismo .....	69
Diversidade Microbiana como Indicadora de Qualidade do Solo .....	71
Perspectivas .....	74
Literatura Citada .....	75

---

<sup>(1)</sup> Professor Associado do Departamento de Solos e Nutrição de Plantas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Caixa Postal 9, CEP 13418-900 Piracicaba, SP. Bolsista CNPq. E-mail: mlambais@esalq.usp.br

<sup>(2)</sup> Engenheiro Agrônomo, Doutorando em Microbiologia e Biotecnologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Bolsista CNPq. E-mail: jccury@esalq.usp.br

<sup>(3)</sup> Engenheira Agrônoma, Doutoranda em Solos e Nutrição de Plantas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Bolsista CNPq. E-mail: cmaluche@esalq.usp.br

<sup>(4)</sup> Graduando em Engenharia Agrônômica, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Bolsista PIBIC/CNPq. E-mail: rcbull@esalq.usp.br

## INTRODUÇÃO

Os microrganismos representam as formas de vida mais abundantes do planeta e detêm a maior proporção da diversidade genética global estimada. A microbiota dos solos é responsável por transformações fundamentais nos ciclos biogeoquímicos, reciclando a matéria orgânica, degradando xenobiontes, fixando N<sub>2</sub> atmosférico e produzindo gases relacionados ao efeito estufa, entre outras transformações conhecidas e muitas ainda por serem descobertas. A microbiota do solo está também associada à formação e manutenção da estabilidade de agregados, pela produção de proteínas e polissacarídeos extracelulares, e pode ser fator determinante no controle da diversidade vegetal e de outros organismos que vivem acima do solo.

Os processos bioquímicos prevaletentes nos solos são definidos em função da organização das comunidades microbianas, a qual é chave para o funcionamento do sistema solo-planta. Contudo, as relações entre a estrutura das comunidades microbianas e as atividades bioquímicas que ocorrem nos solos são pouco conhecidas, dificultando a plena compreensão dos mecanismos que regulam o funcionamento dessas comunidades.

Como a vasta maioria da diversidade microbiana nos solos, bem como seus papéis na manutenção da estabilidade dos ecossistemas, ainda não foi caracterizada, é *sine qua non* inventariá-la e associá-la aos processos bioquímicos que ocorrem no ambiente, bem como com a diversidade biológica acima do solo. Esse processo pode contribuir para o desenvolvimento de sistemas agrícolas mais sustentáveis e para a diminuição da degradação dos ecossistemas naturais.

A diversidade microbiana pode ter papel importante na manutenção da qualidade dos solos. Organizando-se de forma previsível em diferentes condições edáficas ou em resposta a diferentes tipos de distúrbios, as comunidades microbianas poderiam ser utilizadas como indicador de qualidade. No entanto, como a maioria dos microrganismos dos solos não pode ser cultivada nos meios de cultura convencionais, esse processo só será possível pela utilização de técnicas avançadas de biologia molecular associadas a técnicas de bio e ecoinformática, para análise de grandes bancos de dados.

## DIVERSIDADE MICROBIANA ESTIMADA

A comunidade microbiana dos solos é constituída por representantes dos três domínios: *Bacteria*, *Archaea* e *Eucarya* (Figura 1), com os

procariotos (domínios *Bacteria* e *Archaea*) representando a maior parte da biota da Terra. Tem sido estimado que o número global de células procarióticas é de  $4-6 \times 10^{30}$  e que sua biomassa pode conter entre  $350$  e  $550 \times 10^9$  t de C, representando 60-100 % do total de C na biomassa vegetal do planeta (Whitman et al., 1998). Além disso, a biomassa global de procariotos pode conter  $85-130 \times 10^9$  t de N e  $9-14 \times 10^9$  t de P, representando o maior reservatório desses nutrientes em organismos vivos. Segundo estimativas de Whitman et al. (1998), aproximadamente 2-3 % dos procariotos ocorrem nas águas dos oceanos, 4,5-6,5 % no solo e a vasta maioria em subsuperfície (abaixo de 8 m em ambientes terrestres e 10 cm em sedimentos marinhos).

Os microrganismos têm papel essencial nos ciclos biogeoquímicos, dos quais muitos aspectos ainda são pouco conhecidos, muito embora exista um entendimento dos mecanismos gerais que controlam cada ciclo. Novas atividades microbianas têm sido descritas, contribuindo para um melhor entendimento dos ciclos do C, N, Fe, Mn e As (Zengler et al., 1999; Boetius et al., 2000; Liburn et al., 2001; Neubauer et al., 2002; Dalsgaard et al., 2003; Oremland & Stolz, 2003). Um exemplo típico é a oxidação anaeróbia de  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{N}_2$ , descoberta há alguns anos em sistemas de tratamento de efluentes, e atribuída a bactérias não-cultiváveis da ordem *Planctomycetales*,

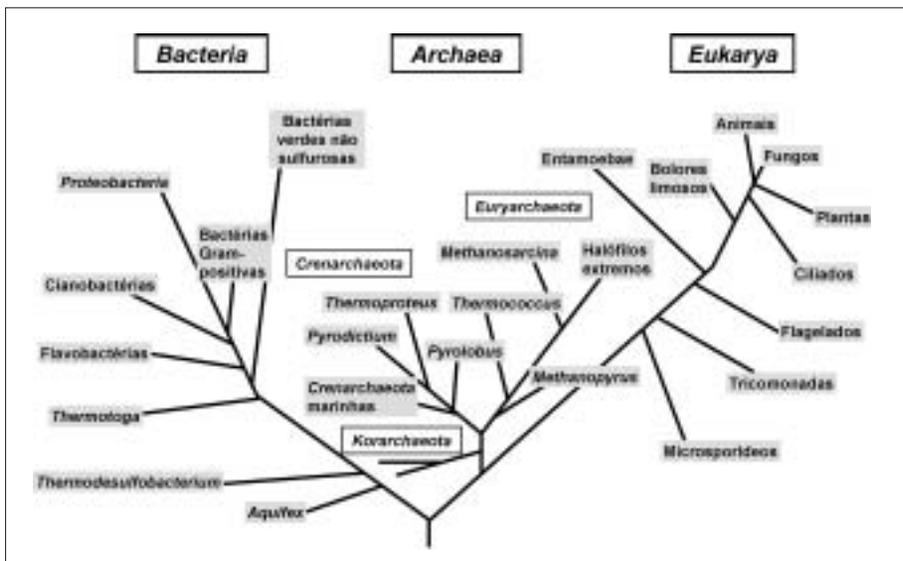


Figura 1. Relações evolutivas entre organismos dos domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eucarya*, determinadas pela análise comparativa das seqüências de nucleotídeos do RNA ribossômico. Apenas alguns grupos de organismos de cada domínio são apresentados.

purificadas de biofilmes multiespecíficos por meio de centrifugação em gradiente de densidade (Strous et al., 1999). Perdas substanciais de N de solos, sedimentos e ambientes aquáticos têm sido reportadas, sugerindo que a oxidação anaeróbia de  $\text{NH}_4^+$  pode ser mais ubíqua na natureza do que se imaginava (Jetten, 2001). Adicionalmente, em solo sob floresta da Austrália, Liesack et al. (1997), utilizando seqüenciamento de clones dos genes que codificam as subunidades 16S do rRNA, i.e., rDNA 16S, observaram a presença de vários membros da família *Planctomycetaceae*, sugerindo que os microrganismos responsáveis por esse processo bioquímico são parte significativa da comunidade de bactérias do solo. Outro exemplo interessante que leva à mudança de paradigmas é a mediação da oxidação de fosfito para fosfato por uma bactéria sulfato-redutora, indicando uma possível ciclagem do P (Schink et al., 2002).

Pouca atenção tem sido dada à participação de microrganismos na regulação da estrutura e no funcionamento dos ecossistemas. Alterações na estrutura ou nas atividades de comunidades microbianas podem ter efeitos significativos sobre a estabilidade e o funcionamento dos ecossistemas (McGrady-Steed et al., 1997).

Segundo Øvreås (2000), a caracterização da diversidade microbiana nos solos é importante para:

- Aumentar o conhecimento das fontes de diversidade genética em uma comunidade.
- Entender os padrões de distribuição relativa dos microrganismos.
- Aumentar o conhecimento do papel funcional dessa diversidade.
- Identificar diferenças em diversidade associadas a distúrbios causados por práticas de manejo.
- Entender a regulação da biodiversidade.
- Entender o envolvimento da biodiversidade no funcionamento e na sustentabilidade de ecossistemas.

Em microbiologia, o termo biodiversidade tem sido definido como o número de diferentes espécies em uma comunidade, para um ambiente específico. Do ponto de vista da ecologia molecular, biodiversidade pode ser definida como o número de seqüências de DNA divergentes presentes no DNA total extraído de uma comunidade, para um ambiente específico (Garbeva et al., 2004). Já o termo estrutura da comunidade microbiana implica a existência de informações sobre o número de indivíduos dos diferentes táxons e sua distribuição relativa na comunidade. Embora haja

controvérsais, espécie pode ser definida como “um agrupamento monofilético e genomicamente coerente de organismos individuais que apresentam alto grau de similaridade geral em várias características independentes, os quais podem ser diagnosticados através de uma propriedade fenotípica discriminativa” (Rosseló-Mora & Amann, 2001). Frequentemente, devido à inexistência de consenso na definição de espécie microbiana, unidades taxonômicas operacionais (UTOs) têm sido definidas com base em características específicas e utilizadas para descrever e comparar populações e comunidades microbianas.

Devido ao rápido desenvolvimento das técnicas de classificação de microrganismos com base nas seqüências de nucleotídeos do rRNA, o número de espécies microbianas descritas tem aumentado significativamente. Em 1985, Woese et al. descreveram 11 filos bacterianos. Hoje, depois de quase duas décadas, 53 filos bacterianos são reconhecidos (Rappé & Giovannoni, 2003). Aproximadamente 6.950 diferentes espécies de procariotos foram cultivadas e descritas até setembro de 2004, das quais aproximadamente 96 % são do domínio *Bacteria* e 4 % do domínio *Archaea* (<http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>).

No entanto, com base na cinética de reassociação de DNA de fita simples extraído de solo sob pastagem, uma complexidade equivalente a 3.500-8.800 genomas de *E. coli* foi observada, o que poderia representar aproximadamente 10.000 espécies (Øvreås & Torsvik, 1998). Solos orgânicos não-perturbados podem conter o equivalente a 6.000-10.000 genomas de *E. coli*, enquanto solos agrícolas ou contaminados com metais pesados podem conter 350–1.500 genomas. Em contraste, a complexidade do genoma da comunidade de procariotos, recuperada por meio de cultivo *in vitro*, é menor do que o equivalente a 40 genomas de *E. coli* (Torsvik & Øvreås, 2002). Curtis et al. (2002) desenvolveram um estimador de diversidade de procariotos em amostras ambientais com base na curva de distribuição de abundância de espécies nas comunidades e estimaram que a diversidade de bactérias no solo seria de 6.400-38.000 espécies por grama de solo. Assim, a maior parte da comunidade de procariotos do solo é composta de organismos que não podem ser cultivados, ou são de difícil cultivo nos meios de cultura tradicionalmente utilizados. Estima-se que somente 0,1–0,5 % dos procariotos do solo podem ser cultivados utilizando-se os meios tradicionais, dificultando a estimativa de sua diversidade (Torsvik et al., 1990).

A diversidade de fungos é tão impressionante quanto a de procariotos. Aproximadamente 74.000 espécies de fungos são conhecidas, e estima-se

que o número total de espécies possa chegar a 1.500.000 (Hawksworth, 2001). Viaud et al. (2000), utilizando PCR-RFLP (“Polimerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism”) de ITS (“Internal Transcribed Spacers”) de seqüências clonadas a partir de DNA metagenômico (DNA total extraído do ambiente) e de micélio de 67 espécies de fungos isoladas do solo, mostraram que somente uma seqüência era comum a ambas as amostras, sugerindo uma elevada diversidade de espécies não-cultiváveis. No entanto, as dificuldades em identificar uma espécie fúngica com base na seqüência do rDNA 18S, devido ao baixo número de seqüências fúngicas presentes nos bancos de dados, têm tolhido a inventariação de sua diversidade nos solos.

Nas últimas décadas, numerosos estudos têm dado importância às medidas da variação da diversidade de microrganismos no solo e ao seu papel na saúde e no funcionamento dos ecossistemas. De maneira geral, verifica-se que a organização e o funcionamento das comunidades microbianas governam as transformações bioquímicas que ocorrem no solo. As atividades da microbiota do solo são essenciais para a reciclagem da matéria orgânica, formação do húmus, nitrificação e fixação biológica do N<sub>2</sub>, entre outros processos, os quais podem contribuir para a alteração da disponibilidade de nutrientes e elementos tóxicos no solo, concentração de gases associados ao efeito estufa na atmosfera, bem como para a alteração dos atributos físicos dos solos.

O estudo da diversidade microbiana nos solos é essencial tanto para a definição de estratégias para preservação de biomassa quanto para o desenvolvimento de sistemas indicadores de alterações ambientais associadas a distúrbios, como a presença de poluentes ou a utilização não-sustentável de solos agrícolas. Além disso, o conhecimento dos recursos genéticos da microbiota dos solos pode contribuir para a descoberta de genes codificando novas enzimas, enzimas com atividade ótima em condições ambientais extremas e peptídeos com atividades de interesse biotecnológico.

Um dos primeiros passos para a caracterização de um ecossistema é a descrição dos organismos que o habitam, gerando informações que permitam estimar a diversidade das comunidades e a relação entre a diversidade e as funções e estabilidade do ecossistema (Valinsky et al., 2002). A diversidade genética das comunidades microbianas e sua relação com os processos biogeoquímicos definem a diversidade funcional dos ecossistemas.

Diferentes estratégias vêm sendo empregadas para estudar a diversidade microbiana nos solos. Contudo, essas estratégias dependem de técnicas, as quais, por mais modernas que sejam, possuem limitações. Assim, para

a obtenção de resultados conclusivos, a abordagem para o estudo da diversidade microbiana nos solos deve ser holística.

As técnicas de biologia molecular aplicadas ao estudo da ecologia de microrganismos têm revelado a existência de uma grande biodiversidade ainda não caracterizada em diferentes ambientes, criando um novo paradigma. Esse novo paradigma demanda novas abordagens para comparar a diversidade microbiana de diferentes ambientes. Aparentemente, voltou-se ao estágio da pesquisa descritiva do início do século XX, nos tempos de Sergius Winogradsky (1856-1953) e Martinus Willem Beijerinck (1851-1931), mas com ferramentas mais sofisticadas. As vastas quantidades de informações de seqüências de DNA e ferramentas de análise de dados disponíveis atualmente têm acelerado o desenvolvimento de novos métodos para comparar a diversidade microbiana em diferentes ambientes e para poder associá-la a atributos específicos do solo.

Resolvidas as limitações metodológicas, seria possível utilizar a diversidade microbiana como indicadora de impactos antrópicos que levem a alterações de qualidade do solo? Antes de testar essa hipótese, é necessário um esforço concentrado para a caracterização da diversidade microbiana nos solos, e, para isso, inúmeros métodos podem ser utilizados.

## MÉTODOS PARA O ESTUDO DA DIVERSIDADE MICROBIANA NOS SOLOS

Até recentemente, a maioria dos métodos para estudo da diversidade microbiana nos solos valia-se do crescimento do microrganismo em um meio de cultura seletivo. Atualmente, uma grande variedade de métodos pode ser utilizada para essa finalidade, sem haver necessidade de cultivo da microbiota (Figura 2). Alguns métodos dependentes e independentes de cultivo, mais comumente utilizados em estudos de ecologia de microrganismos do solo e outros com potencial para elucidar as principais questões sobre a diversidade microbiana nos solos, são descritos a seguir.

### **Métodos dependentes de cultivo**

#### **Isolamento em meios de cultura**

A caracterização da diversidade microbiana nos solos tem sido feita tradicionalmente com base no isolamento dos microrganismos em meios

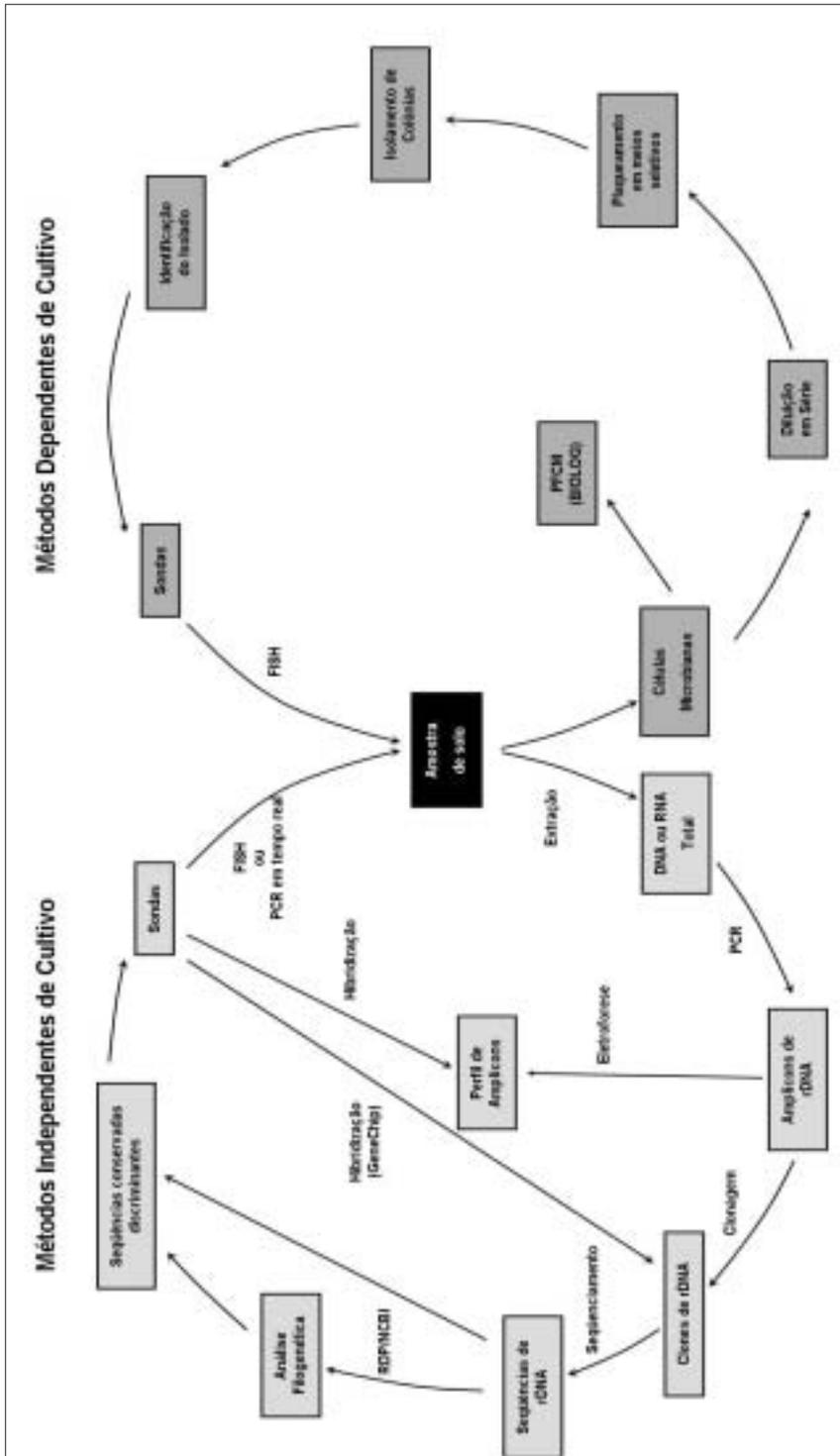


Figura 2. Métodos dependentes e independentes de cultivo para o estudo da diversidade microbiana nos solos.

de cultura com diferentes graus de seletividade. Esse método é rápido e econômico e fornece informações sobre os grupos de microrganismos viáveis e cultiváveis em uma amostra de solo. Normalmente, os métodos dependentes de cultivo tendem a selecionar populações com taxas de reprodução mais elevadas em meios de cultura com altas concentrações de nutrientes e em condições aeróbias. Da mesma forma, fungos com alta capacidade de produção de esporos também são favorecidos.

Várias limitações metodológicas estão associadas à cultura de microrganismos *in vitro*, como: dificuldades em desalojar microrganismos associados a biofilmes e partículas do solo, seletividade do meio, condições ótimas para crescimento e interações negativas entre as colônias de microrganismos (Kirk et al., 2004). Assim, de maneira geral, os métodos tradicionais de cultivo influenciam a estimativa da abundância relativa das diferentes espécies, levando à sub ou super-representação de grupos específicos e dificultando, conseqüentemente, a determinação da estrutura das comunidades microbianas.

Testes de viabilidade celular, usando corantes como Syto9/iodeto de propídeo e microscopia, têm mostrado que a maioria das células dos microrganismos extraídos do solo por sonicação são potencialmente viáveis (Janssen et al., 2002). Os mesmos autores observaram que a simples diluição do meio de cultura (caldo nutriente) pode aumentar a percentagem de bactérias cultiváveis em relação ao total de células detectadas por microscopia. Já em caldo nutriente diluído e solidificado com ágar e goma gelana a percentagem de bactérias cultiváveis, com base no número de unidades formadoras de colônias (UFCs), aumenta aproximadamente 3,6 (5,2 % do total de células detectadas) e 5,4 vezes (7,5 % do total de células detectadas), respectivamente, em relação ao número mais provável de células em caldo nutriente diluído sem agente solidificante. Após homogeneização da amostra de solo por sonicação, para dispersão das células agrupadas, a percentagem de células cultiváveis em caldo nutriente solidificado com goma gelana aumenta para 14,1 %, se comparado ao máximo de UFCs possíveis, considerando-se agrupamentos de células detectados por microscopia. Utilizando esse método, representantes das divisões *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* nunca antes cultivados foram reportados (Janssen et al., 2002).

Zengler et al. (2002) associaram microencapsulamento de células únicas, seguido de citometria em fluxo para detectar microcolônias com 20-100 células, com o objetivo de cultivar em larga escala microrganismos sob condições nutricionais semelhantes às do ambiente de onde as células

provieram. O método permite o isolamento das células e, ao mesmo tempo, o fluxo livre de metabólitos e moléculas sinais produzidas pelas diferentes microcolônias, tornando-se uma alternativa atrativa para o estudo de interações entre diferentes microrganismos que ocorrem *in situ* e que podem afetar a capacidade de crescimento destes *in vitro*.

### **Perfil fisiológico de comunidades microbianas (Biolog)**

O perfil fisiológico de comunidades microbianas (PFCM) é determinado pela capacidade dessa comunidade em utilizar diferentes fontes de C *in vitro*. A análise comparativa dos PFCMs, sob diferentes condições, pode indicar alterações na capacidade metabólica da comunidade e sua diversidade funcional (Garland & Mills, 1991; Zak et al., 1994; Garland, 1996; Degens & Harris, 1997). Essa metodologia foi desenvolvida inicialmente utilizando microplacas Biolog™ contendo 95 substratos de C e tetrazólio, as quais eram utilizadas para caracterização taxonômica de bactérias patogênicas (Garland & Mills, 1991). Posteriormente, foi desenvolvida a Ecoplate Biolog™ contendo 31 substratos de C diferentes e um controle sem C, com três repetições (Choi & Dobbs, 1999). A Ecoplate é mais apropriada para estudos de ecologia microbiana, pois contém fontes de C normalmente encontradas no solo. O princípio do método é bastante simples: o meio de cultura nas cavidades da microplaca é inoculado com uma suspensão de microrganismos de uma amostra de solo e as microplacas são incubadas em condições controladas de temperatura por períodos variáveis de tempo. A atividade microbiana é monitorada pela redução do tetrazólio, por meio de espectrofotometria a 590 nm.

A diversidade metabólica pode ser mensurada em termos de riqueza e equitabilidade de utilização de substratos de C e expressa por índices de diversidade usualmente utilizados para espécies (Zak et al., 1994; Goodfriend, 1998; Dauber & Wolters, 2000; Lupwayi et al., 2001). A diversidade metabólica é conseqüência da diversidade genética, dos efeitos ambientais na expressão gênica e das interações ecológicas entre as diferentes populações (Zak et al., 1994). Wunsche et al. (1995) consideram as comunidades microbianas como unidades funcionais nos ecossistemas, as quais são caracterizadas pela soma das capacidades metabólicas das diferentes espécies. Conseqüentemente, o padrão de utilização de substratos de C de uma comunidade é resultado da diversidade de espécies e da abundância relativa de cada espécie.

Uma das limitações desse método é o favorecimento de células bacterianas heterotróficas aeróbias e anaeróbias facultativas de rápido

crescimento e a inibição do crescimento de fungos pelo tetrazólio. Placas especiais para a avaliação do perfil fisiológico de comunidades de fungos foram desenvolvidas e podem contribuir para reduzir parte das limitações do método (Classen et al., 2003). Além disso, o método é sensível à densidade de inóculo e reflete a diversidade metabólica potencial e não aquela existente *in situ* (Garland & Mills, 1991).

A análise do PFCM utilizando placas Biolog tem mostrado diferenças significativas na diversidade metabólica de comunidades em variadas condições. Zak et al. (1994), avaliando o PFCM de um solo de deserto, localizado em um gradiente altimétrico e colonizado por seis comunidades distintas de plantas, mostraram que este estava relacionado ao teor de matéria orgânica no solo. Já Goodfriend (1998), comparando o PFCM em ambientes diferentes, observaram que este era similar em solos do mesmo tipo coletados em locais geograficamente distintos e que diferia entre diferentes tipos de solo. O PFCM tem sido usado também para comparar o efeito de sistemas de manejo sobre a diversidade funcional. Lupwayi et al. (2001) compararam os PFCMs em solos sob manejo convencional e plantio direto e observaram que a diversidade metabólica aumentava em solos sob plantio direto, quando a cultura já estava estabelecida, e com o aumento do tamanho dos agregados. Comparando vários indicadores de alterações dos processos microbianos no solo, Bending et al. (2000) observaram que o PFCM era o mais sensível para detectar efeitos de diferentes sistemas de manejo sobre a comunidade microbiana. Adicionalmente, o PFCM pode ser útil na avaliação das mudanças sofridas pela comunidade microbiana do solo em função de impactos causados por poluição por hidrocarbonetos (Wunsche et al., 1995), metais (Yao et al., 2003; Davis et al., 2004; Wang et al., 2004) e xenobióticos (El Fantroussi et al., 1999; Busse et al., 2001; Itoh et al., 2003).

## Métodos independentes de cultivo

As evidências de que existe uma vasta diversidade de microrganismos não-cultiváveis nos solos têm estimulado o desenvolvimento de novas metodologias para o seu estudo sem a necessidade de cultivo prévio. Os métodos mais recentes exploram as características dos rRNAs e a composição de ácidos graxos das membranas celulares para essa finalidade. Esses métodos, aliados aos avanços da bioinformática e dos métodos de análise estatística, são ferramentas cada vez mais promissoras para estudos que objetivem caracterizar a diversidade microbiana e como as comunidades microbianas se organizam em diferentes ambientes.

Várias metodologias para caracterização de comunidades microbianas têm sido utilizadas nos últimos anos para o estudo da microbiota dos solos. Dentre as mais importantes, podem-se citar: PLFA (“Phospholipids Fatty Acid”, análise de ácidos graxos de fosfolipídeos), FAME (“Fatty Acid Methyl Ester”, análise de ésteres metílicos de ácidos graxos), PCR-DGGE (“Polimerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis”, reação em cadeia da polimerase-eletroforese em gel com gradiente desnaturante), SSCP (“Single Strand Conformation Polymorphism”, polimorfismo de conformação de fita simples), ARDRA (“Amplified Ribosomal DNA Restriction Analyses”, análise de restrição de rDNA amplificado), T-RFLP (“Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism”, polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição terminais), RISA (“Ribosomal Intergenic Spacer Analysis”, análise de espaçadores intergênicos ribossomais), SARST (“Serial Analyses of Ribosomal Sequence Tags”, análise serial de etiquetas de seqüências ribossomais), seqüenciamento de clones de rDNA e hibridização em microarranjos (“GeneChips”)

### **PLFA e FAME**

A análise de comunidades microbianas pela determinação dos perfis de ácidos graxos fornece informações de sua estrutura por meio da presença de ácidos graxos específicos que diferenciam os principais grupos taxonômicos de uma comunidade (Ibekwe & Kennedy, 1999). De modo geral, essas técnicas baseiam-se na extração de ácidos graxos diretamente do solo e sua análise por cromatografia gasosa. Os perfis de ácidos graxos de diferentes comunidades microbianas podem ser comparados por técnicas de estatística multivariada. Como os ácidos graxos representam uma proporção relativamente constante da biomassa microbiana, alterações no perfil desses ácidos indicam alterações na abundância de populações específicas. PLFA e FAME têm sido usadas extensivamente para a determinação da estrutura das comunidades de bactérias e fungos em solos de ecossistemas naturais (Madan et al., 2002; Leckie et al., 2004; Nilsson et al., 2005), em resposta à contaminação com metais (Khan & Scullion, 2000) e presença de plantas transgênicas (Blackwood & Buyer, 2004), por exemplo. Entretanto, no estudo de comunidades de *Archaea* esses métodos apresentam limitações. Gattinger et al. (2003) propuseram uma nova abordagem para os estudos de microrganismos desse domínio, por meio da análise de éterlipídios de fosfolipídios (PLEL, “Phospholipid Etherlipid”) por cromatografia gasosa/espectrometria de massa. Usando PLEL, lipídios

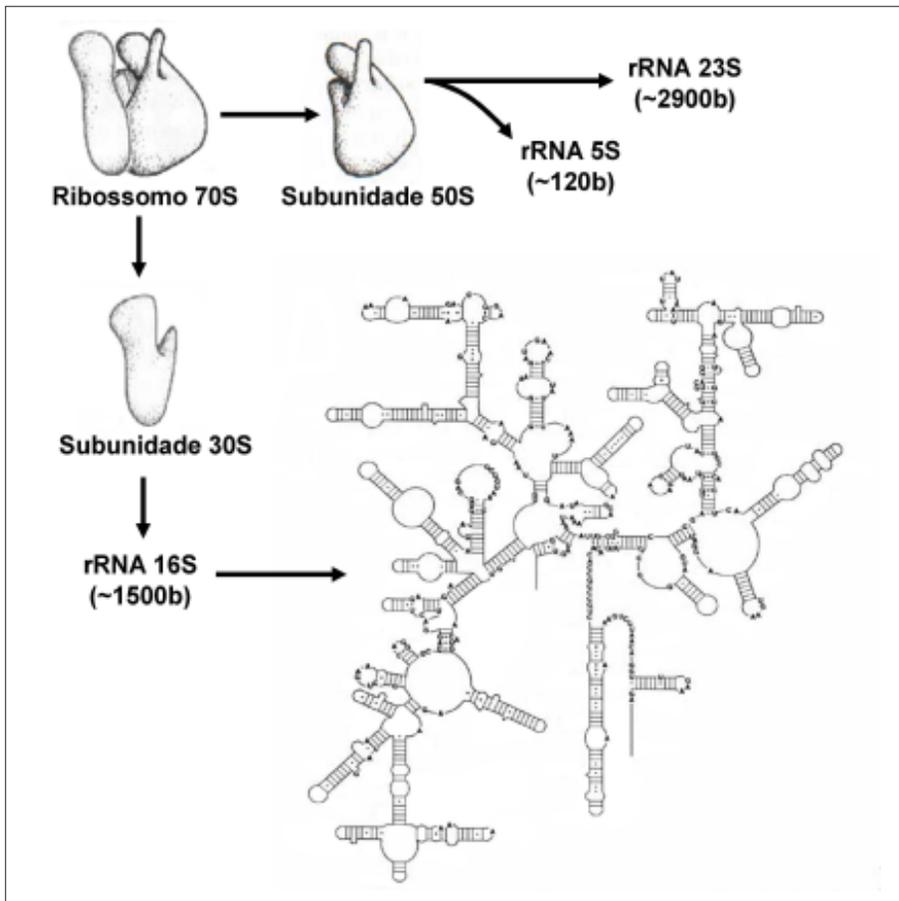
identificados em culturas de isolados pertencentes aos reinos *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota* foram observados em extratos de solo, demonstrando que a abordagem utilizada é mais sensível para a detecção de espécies de *Archaea* do que os métodos tradicionalmente usados.

### PCR-DGGE

Com o desenvolvimento das técnicas de seqüenciamento de DNA, Woese et al. (1985) estabeleceram a comparação das seqüências da subunidade menor do rRNA como padrão para determinar as relações filogenéticas entre organismos. Adicionalmente, o rápido avanço no seqüenciamento de rDNAs de um grande número de organismos e o desenvolvimento de numerosas técnicas moleculares para a análise de fragmentos de rDNA revolucionaram os estudos de ecologia microbiana. Além do alto nível de conservação do rDNA entre as espécies, a utilização desse gene para inferências filogenéticas e análise de comunidades microbianas tem-se fundamentado em uma série de vantagens, em relação a outros genes, como: abundância de rDNA nas células; aparente ausência de transferência genética lateral; o rDNA apresenta regiões altamente conservadas em grupos definidos de organismos flanqueando regiões hipervariáveis; e o gene que codifica a subunidade menor do rRNA tem um tamanho satisfatório para análises filogenéticas, cerca de 1.500 nucleotídeos (Figura 3) (Amann & Ludwig, 2000).

Normalmente, as técnicas que utilizam o rDNA para a análise de comunidades microbianas dependem da amplificação inicial de um fragmento específico desse gene, a partir de DNA metagenômico. Essa amplificação é feita por meio da PCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos. Uma das limitações da PCR é a amplificação preferencial de algumas subpopulações dentro de uma comunidade microbiana complexa, de modo que, dependendo do número de ciclos de amplificação, somente seqüências de rDNA proveniente das espécies mais abundantes estarão representadas ao final do processo de amplificação (Vetriani et al., 1999).

Para a DGGE, os fragmentos de rDNA são amplificados com iniciadores que flanqueiam regiões hipervariáveis, e um dos iniciadores possui um grampo rico em guanina e citosina (G + C), essencial para a separação dos fragmentos amplificados (amplicons) no gel com gradiente desnaturante. Os amplicons resultantes têm o mesmo tamanho, mas apresentam diferenças quanto ao seu teor em G + C. A composição de nucleotídeos dos diferentes amplicons determina seu padrão de migração em um gel de



**Figura 3. Representação dos RNAs que compõem os ribossomos de procaríotos. As estruturas primária e secundária mostradas referem-se ao rRNA 16S de *E. coli*. O rRNA 16S de arqueas apresenta estrutura secundária similar à de bactérias, mas diferem nas estruturas primárias (seqüências de nucleotídeos).**

poliacrilamida contendo um gradiente linear de formamida e uréia. O padrão de migração dos amplicons do rDNA no gel desnaturante é governado não apenas pela composição de nucleotídeos (conteúdo de G + C), mas também pelas interações entre os nucleotídeos da molécula (Breslauer et al., 1986; Sugimoto et al., 1996).

Além das limitações do processo de extração de DNA metagenômico representativo da comunidade microbiana e da PCR, a DGGE também possui limitações intrínsecas. Sabe-se que muitas bactérias possuem mais de uma cópia do rDNA 16S, cujos amplicons podem apresentar diferentes mobilidades no gel com gradiente desnaturante. Assim, múltiplas bandas

poderão representar uma mesma espécie bacteriana (Nubel et al., 1996; Boon, 2000). Parte dessas limitações pode ser solucionada pela utilização de genes com cópia única nos genomas microbianos, como o gene que codifica a subunidade- $\beta$  da RNA polimerase em bactérias (Peixoto et al., 2002). Como a técnica é fundamentada na separação de amplicons com base em seu padrão de desnaturação no gel, determinado basicamente pelo conteúdo de G + C, uma banda detectada no gel pode representar mais de um genótipo bacteriano, com seqüências divergentes, mas com teores de G + C iguais. Por essas razões, não se pode estabelecer uma relação direta entre a quantidade de bandas detectadas por DGGE e o número de espécies presentes no ambiente estudado. Além disso, as informações geradas pela DGGE não são suficientes para identificar as espécies ou os grupos taxonômicos presentes na amostra. Para identificação das espécies das quais os amplicons são provenientes é necessário fazer a excisão do amplicon do gel, reamplificar o DNA e seqüenciá-lo.

Muyzer et al. (1993) foram os primeiros a utilizar PCR-DGGE com o objetivo de avaliar a diversidade de amplicons de rDNA 16S de uma comunidade microbiana. Embora existam várias limitações, a PCR-DGGE de fragmentos do rDNA é um método adequado para análises comparativas de duas ou mais situações (Muyzer et al., 1993; Jackson et al., 2000). Nesse caso, se as amostras exibirem padrões de bandamento de amplicons diferentes, então, certamente, as comunidades microbianas apresentam diferenças. O contrário não é verdadeiro, e amostras com padrões de bandamento de amplicons idênticos podem apresentar estruturas de comunidades diferentes. Nesse caso, uma abordagem polifásica deve ser adotada para determinar as alterações nas estruturas dessas comunidades microbianas.

Inúmeros estudos têm sido realizados utilizando PCR-DGGE para determinar e comparar estruturas de comunidades microbianas em solos, sob as mais diversas condições. Agnelli et al. (2004), avaliando a diversidade e estrutura de comunidades de bactérias e fungos em um solo sob floresta temperada, por meio da abundância de amplicons de um fragmento do rDNA 16S e 18S, observaram maior diversidade de bactérias em relação à de fungos, a qual diminuía em função da profundidade de amostragem. A mesma relação entre profundidade e complexidade da comunidade bacteriana foi observada por Cury (2002) em solo de mangue contaminado com petróleo, utilizando PCR-DGGE da região V3 do rDNA 16S. Já o contrário foi observado para *Archaea*, cuja diversidade aumentou com a

profundidade de amostragem. Alterações na estrutura das comunidades de bactérias na rizosfera, em função da localização nas raízes e do tipo de solo e planta, também foram constatadas utilizando-se PCR-DGGE da região V3 do rDNA 16S (Marschner et al., 2001a,b; Yang & Crowley, 2000). De Souza et al. (2004), avaliando diferentes regiões do rDNA 18S para determinar a diversidade de fungos micorrízicos arbusculares do gênero *Gigaspora* por meio de PCR-DGGE, observaram que a região V9 poderia ser usada para diferenciar todas as espécies do gênero. A aplicação de PCR-DGGE no estudo de comunidades de fungos micorrízicos arbusculares no solo e raízes é uma alternativa promissora aos métodos convencionais, os quais envolvem o isolamento de esporos do solo e sua classificação taxonômica com base em características morfológicas e ontogenia.

### **SSCP**

Este método baseia-se na separação eletroforética de fragmentos de DNA de mesmo tamanho, mas com seqüências de nucleotídeos diferentes, de forma similar à do DGGE. Resumidamente, o DNA total de uma amostra ambiental é extraído e fragmentos específicos do rDNA são amplificados. Os amplicons resultantes são desnaturados para separar as fitas simples de DNA e separados por eletroforese em condições não-desnaturantes, permitindo a renaturação parcial das fitas simples e a formação de estruturas secundárias em função das interações entre as bases nucleotídicas. As diferentes conformações que as fitas de DNA assumem resultam em mobilidade diferencial durante a eletroforese, possibilitando a separação de fitas de DNA diferindo em até um par de bases. Contudo, um mesmo fragmento pode apresentar múltiplas conformações, resultando em múltiplas bandas no gel. Diferentemente da DGGE, a SSCP não necessita de iniciadores com grampos ricos em G + C ou géis com gradiente desnaturante.

Entre outras aplicações, a SSCP tem sido utilizada no estudo da diversidade de bactérias em solos contaminados com BTXE (Junca & Pieper, 2004), bactérias em solo rizosférico (Miethling et al., 2003; Schmalenberger & Tebbe, 2003), crenárqueas em solo rizosférico e não-rizosférico (Sliwinski & Goodman, 2004), bactérias oxidantes de amônio (Backman et al., 2003) e fungos micorrízicos arbusculares (Jansa et al., 2003; Kjoller & Rosendahl, 2001).

### **ARDRA**

A ARDRA é uma técnica utilizada para a caracterização de comunidades microbianas que se baseia na análise de fragmentos de restrição de

amplicons do rDNA (Liu et al., 1997). O padrão de bandeamento dos fragmentos de restrição em gel de agarose ou poliacrilamida não-desnaturante determina a estrutura da comunidade microbiana (Massol-Deya et al., 1995). No entanto, esses padrões de bandeamento não são indicadores de diversidade, já que uma única espécie pode apresentar 4-6 fragmentos de restrição (Ranjard et al., 2000). Smit et al. (1997) utilizaram ARDRA para determinar alterações nas estruturas de comunidades de bactérias de solos contaminados com Cu, em relação a solos não contaminados. ARDRA pode ser utilizada também na análise de bibliotecas de clones de rDNA para a estimativa de diversidade (Moffett et al., 2003). Além disso, ela tem sido usada na caracterização de isolados de microrganismos, já que cada espécie apresenta um padrão de restrição típico (Aquilanti et al., 2004; Viti & Giovanetti, 2005).

### **T-RFLP**

A T-RFLP é uma técnica que consiste basicamente na amplificação de um fragmento do rDNA, a partir de DNA metagenômico, utilizando um dos iniciadores marcados com um fluoróforo, restrição dos amplicons com uma enzima de restrição adequada, separação eletroforética e detecção dos fragmentos de restrição terminais marcados. A detecção somente dos fragmentos marcados diminui consideravelmente a complexidade dos padrões de bandeamento, facilitando a análise de comunidades complexas e possibilitando que estimativas de diversidade sejam feitas, já que cada banda representa uma UTO ou ribotipo (Tiedje et al., 1999). A automação da eletroforese dos fragmentos de restrição possibilita o processamento de um grande número de amostras de solo, com alta reprodutibilidade. O método, no entanto, apresenta limitações associadas à extração e amplificação de DNA metagenômico por PCR, bem como aos iniciadores que serão utilizados.

Usando agrupamento hierárquico de perfis de T-RFLP, Mummey & Stahl (2004) mostraram que as estruturas das comunidades de bactérias associadas a microagregados são distintas em solos não-impactados e solos recuperados após atividade de mineração de carvão. Adicionalmente, tanto em solos não-impactados como naqueles recuperados, as comunidades bacterianas do interior do microagregado diferiam daquela observada no microagregado como um todo.

Hackl et al. (2004), estudando as comunidades bacterianas de seis solos sob florestas naturais da Áustria, verificaram que suas estruturas apresentavam alta similaridade entre si, com base nos perfis de T-RFLP,

com exceção do solo sob floresta de pinheiros, no qual predominavam bactérias Gram-positivas ricas em G + C. Também, usando T-RFLP, Johnson et al. (2004) observaram que a diversidade de fungos micorrízicos arbusculares, em condições de microcosmos, era significativamente afetada pela composição florística e pela concentração de P na parte aérea das plantas.

## **RISA**

Da mesma forma que ARDRA e T-RFLP, a RISA possibilita a caracterização das comunidades microbianas com base nas variações genéticas do rDNA. Na RISA, as regiões espaçadoras entre os genes que codificam as subunidades 16S e 23S do rRNA de bactérias são amplificadas por PCR, sendo os amplicons desnaturados e separados em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes (Ranjard et al., 2000). Devido à heterogeneidade de tamanho e seqüência de bases, a análise dessa região intergênica permite a discriminação de espécies muito próximas filogeneticamente e até mesmo de estirpes (Fisher & Triplett, 1999; Jensen et al., 1993).

A RISA tem sido utilizada na análise comparativa da dinâmica de populações microbianas em solos após desflorestamento (Borneman & Triplett, 1997), bem como no estudo de comunidades bacterianas da rizosfera durante o desenvolvimento de milho (Baudoin et al., 2002) e em solos contaminados com Hg (Ranjard et al., 2000). A automação da RISA, pelo uso de iniciadores marcados com fluoróforos e eletroforese capilar, permitiu aumentar significativamente a sensibilidade do método, possibilitando a análise de comunidades de maior complexidade (Kirk et al., 2004).

## **SARST**

A caracterização de comunidades microbianas complexas, como as de solos e sedimentos, usando SARST foi proposta por Neufeld et al. (2004). O método descrito originalmente consiste basicamente na amplificação de um fragmento da região V1 do rDNA 16S de bactérias, utilizando iniciadores marcados com biotina. Após uma série de reações enzimáticas, as RSTs ("Ribosomal Sequence Tags") são isoladas e ligadas de forma concatenada. Os fragmentos contendo as RSTs concatenadas são clonados e seqüenciados. A comparação das seqüências obtidas com seqüências depositadas em bancos de dados (GenBank e Ribosomal Database Project II) permite a identificação taxonômica de RSTs individuais. Como

cada fragmento clonado possui várias RSTs, um menor número de reações de seqüenciamento podem ser realizadas para analisar em detalhes uma comunidade microbiana complexa. Utilizando SARST, 2.500 RSTs de uma única amostra de solo ártico foram caracterizadas por meio do seqüenciamento de apenas 384 clones (Neufeld et al., 2004).

Kysela et al. (2005) desenvolveram um método similar à SARST, utilizando amplicons da região V6 do rDNA 16S (SARST-V6), o qual exige um menor número de reações para preparação e purificação das RSTs antes da reação de ligação destas. Uma das vantagens da SARST-V6 é o fato de se utilizarem iniciadores cujo alvo são regiões altamente conservadas da região V6 do rDNA 16S, já seqüenciada em mais de 30.000 organismos. Assim, RSTs que não apresentarem similaridade com seqüências conhecidas são candidatas a novos filotipos.

A utilização de SARST para caracterização de comunidades microbianas é uma alternativa altamente promissora, pois, além de fornecer informações acerca da estrutura da comunidade, permite a obtenção de informações sobre as relações filogenéticas entre os filotipos. Apesar de ser simples, a aplicação de SARST apresenta as limitações inerentes aos métodos dependentes da amplificação de DNA metagenômico por PCR e exige alta capacidade de seqüenciamento e recursos de bioinformática. Sua utilização até o momento tem sido limitada.

### **Seqüenciamento de clones de rDNA**

Trata-se de uma abordagem alternativa para a caracterização de comunidades microbianas complexas. Consiste na amplificação de um fragmento específico do rDNA 16S ou 18S, na clonagem em vetor apropriado e no seqüenciamento dos insertos.

Após o seqüenciamento de clones de rDNA de amostras ambientais, uma grande quantidade de informações, armazenadas na forma de seqüências de nucleotídeos, é gerada. Essas seqüências de nucleotídeos precisam ser editadas para remoção de contaminações com bases do vetor de clonagem e remoção de bases de baixa qualidade, para posteriormente serem utilizadas em estudos de filogenia. O tratamento de grandes quantidades de dados exige uma abordagem sistemática e automatizada, havendo necessidade de algoritmos específicos.

Na análise em larga escala de seqüências de clones de rDNA são utilizados algoritmos para determinação da qualidade das seqüências, remoção de seqüências contaminantes e de baixa qualidade, agrupamento

e alinhamento múltiplo de seqüências, além de algoritmos para a análise filogenética destas. As seqüências de DNA podem ser analisadas quanto à sua qualidade por meio dos programas PHRED/PHRAP (Brent et al., 1998). Após a remoção das bases de baixa qualidade e fragmentos idênticos à seqüência de bases do vetor de clonagem, normalmente nas extremidades 5' e 3' das seqüências, as seqüências de rDNA podem ser agrupadas por similaridade, utilizando-se os programas PHRAP (Brent et al., 1998), CAP3 (Huang & Madan, 1999) ou Vector NTI® (Informax Inc.), por exemplo.

A etapa mais limitante para o agrupamento das seqüências é a definição do limiar de similaridade entre as seqüências, já que não existe consenso na literatura sobre o grau de similaridade entre seqüências de rDNA 16S para definir as UTOs. Kemp & Aller (2004) relatam que a maioria dos estudos considera uma similaridade mínima de 97 % entre seqüências de rDNA 16S para distinguir diferentes UTOs. No entanto, particularidades de determinados grupos microbianos devem ser consideradas. Comparando a similaridade de seqüências do rDNA 16S com valores de reassociação DNA-DNA de membros da classe *Actinobacteria*, Stach et al. (2003) definiram que a similaridade mínima para diferenciar UTOs dessa classe de bactérias é de 99 %.

Uma vez definido o valor mínimo de similaridade para diferenciar UTOs, suas seqüências consenso podem ser comparadas com seqüências depositadas em bancos de dados públicos (GenBank e Ribosomal Database Project II) para determinação do organismo mais relacionado e suas possíveis funções no solo. Embora a quantidade de informação sobre a identidade dos clones possa ser suficiente para afiliação filogenética em nível de espécie, essa abordagem exige o seqüenciamento de um número relativamente alto de clones para que o resultado seja representativo da comunidade estudada. Assim, a utilização dessa abordagem para caracterização de comunidades microbianas complexas requer alta capacidade de seqüenciamento e processamento computacional das seqüências geradas.

Depois do agrupamento das seqüências em UTOs, estas são submetidas a alinhamento múltiplo para determinação do grau de similaridade entres elas. Com a matriz de similaridade resultante, é possível então realizar análises filogenéticas, utilizando-se os programas Phylip (Felsenstein, 1993) ou Paup (Swofford, 2003), por exemplo. Esse procedimento foi utilizado na caracterização e comparação da diversidade bacteriana em solos de mangue e marismas, mostrando uma riqueza de até 391 e 1.744 filotipos, respectivamente (Lambais et al., dados não publicados).

Kemp & Aller (2004) compararam os dados de 225 bibliotecas de rDNA 16S publicadas na literatura, para avaliar o nível de cobertura e riqueza de filotipos estimada, e verificaram que somente 56 delas foram consideradas adequadas a uma estimativa não-enviesada da riqueza de filotipos, visando à comparação da diversidade bacteriana em diferentes ambientes. Na maioria das bibliotecas analisadas, a cobertura dos diferentes grupos taxonômicos era baixa e a riqueza de filotipos estava subestimada. Visando minimizar o problema de sub-representatividade de filotipos, Singleton et al. (2001) desenvolveram um método estatístico para a comparação de bibliotecas de rDNA de amostras ambientais. Por meio desse método, um número relativamente baixo de seqüências é suficiente para, estatisticamente, comparar comunidades microbianas.

Outro aspecto importante dos projetos de caracterização da diversidade microbiana nos solos é o armazenamento das informações em bancos de dados dinâmicos, para acesso em múltiplas estações de trabalho. Esses bancos de dados são importantes para o rápido e fácil acesso às informações dos filotipos e para o processamento conjunto de informações sobre a ocorrência de filotipos e variações de atributos do solo, possibilitando estabelecer relações entre a diversidade microbiana e suas possíveis funções no solo.

### **Hibridização em microarranjos (GeneChips)**

Com a possibilidade de confeccionar arranjos de oligonucleotídeos de rDNA por meio de fotolitografia, a análise da estrutura de comunidades microbianas por hibridização em microarranjos (GeneChip) tem sido apontada como uma alternativa à clonagem e ao seqüenciamento. Usando essa abordagem, Wilson et al. (2002) confeccionaram microarranjos contendo 31.179 oligonucleotídeos de 20 bases, complementares a um subalinhamento de seqüências do rDNA 16S e 18S obtidas do Ribosomal Database Project. Utilizando amplicons do rDNA, obtidos a partir de DNA extraído de culturas puras, como sondas na hibridização com GeneChips, foi possível a identificação filogenética da maioria dos organismos testados. Utilizando amplicons de rDNA 16S de comunidades mais complexas, esse método permitiu a identificação filogenética de oito entre dez agrupamentos, identificados previamente por clonagem e seqüenciamento. Apesar de ser muito promissor, o uso de GeneChips na análise de comunidades microbianas depende do conhecimento prévio das seqüências dos rDNAs para a confecção dos arranjos. Além disso, em ambientes de grande diversidade, como em solos, a presença de grupos filogenéticos muito próximos poderia diminuir a acurácia do método, devido à ocorrência de hibridização não-específica, e espécies novas não seriam detectadas.

## ABORDAGENS PARA A ANÁLISE DE DADOS DE DIVERSIDADE MICROBIANA

Os estudos de diversidade e estrutura de comunidades microbianas têm gerado uma enorme quantidade de dados de difícil análise por meio das técnicas estatísticas convencionais, exigindo abordagens mais complexas. Normalmente a diversidade e a estrutura de comunidades microbianas são analisadas em função da ocorrência de UTOs, já que o conceito de espécie, principalmente para os procaríotos, é controverso (Rosselló-Mora & Amann, 2001). Essas UTOs podem ser bandas de amplicons do rDNA separadas por DGGE ou seqüências de nucleotídeos de um fragmento do rDNA, por exemplo.

Várias abordagens estatísticas têm sido usadas para estimar e comparar a diversidade microbiana, bem como as estruturas de suas comunidades em diferentes ambientes, incluindo métodos paramétricos e não-paramétricos. Os métodos paramétricos estimam o número de UTOs não-observadas em uma comunidade, ajustando os dados amostrados a modelos de abundância relativa de UTOs, como lognormal ou Poisson lognormal, entre outros (Bohannan & Hughes, 2003). Por meio dessa abordagem é possível estimar a diversidade partindo de amostras relativamente pequenas das UTOs de um ambiente. Existe, no entanto, uma série de limitações ao uso desses modelos, já que não há dados suficientes sobre diversidade microbiana para indicar com certeza o modelo mais adequado. Assim, a adoção de modelos específicos deve ser feita com base em uma sólida argumentação teórica. A diversidade de comunidades de procaríotos pode depender de duas variáveis mensuráveis: o número total de indivíduos na comunidade e a abundância das UTOs mais abundantes, assumindo uma curva lognormal de abundância de UTOs (Curtis et al., 2002). Essa abordagem pode ser facilmente aplicada na estimativa da diversidade microbiana com base em dados obtidos por clonagem e seqüenciamento de clones, já que a quantidade de dados necessária para a estimativa pode ser reduzida.

Os métodos não-paramétricos, ao contrário dos paramétricos, são capazes de estimar a diversidade microbiana a partir de uma pequena amostra da comunidade, dependendo de informações sobre UTOs observadas, sem considerar modelos de distribuição de abundância relativa. Dos métodos não-paramétricos, o mais utilizado na estimativa da diversidade microbiana é o Chao1 (Chao, 1987). Essa abordagem utiliza o número de UTOs com um único e dois representantes na amostra para

estimar a diversidade total. Esse modelo é particularmente útil, pois estima também a variância associada a múltiplas amostragens da mesma comunidade, possibilitando uma comparação estatística de duas amostras. Uma das desvantagens dessa abordagem é que ela depende de estimativas da abundância relativa de UTOs, a qual pode sofrer distorções em métodos que dependem da extração de DNA da comunidade microbiana e de sua amplificação por PCR. De maneira geral, os métodos não-paramétricos tendem a subestimar a diversidade microbiana. Chao & Lee (1992) propuseram um novo algoritmo para a estimativa de diversidade, chamado ACE (“Abundance-based Coverage Estimator”), no qual as UTOs (espécies) são separadas em grupos raros e abundantes e somente os grupos raros são usados para estimar a diversidade não-conhecida.

Stach et al. (2003) utilizaram várias abordagens estatísticas, incluindo Chao1 e ACE, para estimar a diversidade de actinomicetos em sedimentos marinhos, com base em bibliotecas de clones de rDNA 16S, e observaram que ambos os algoritmos mostram a mesma tendência de variação das estimativas em função da profundidade de amostragem. No entanto, para as amostras da camada mais superficial, as estimativas de riqueza de UTOs com base em Chao1 mostraram maior diversidade do que com base em ACE, provavelmente devido ao tamanho da amostra em relação à complexidade da comunidade.

Na análise de dados provenientes de bibliotecas de clones de rDNA, os fatores mais limitantes são: determinar a representatividade dos clones seqüenciados em relação à diversidade genética do ambiente amostrado (cobertura) e fazer a comparação estatística de bibliotecas (comunidades). Para isso, Singleton et al. (2001) desenvolveram um programa computacional chamado LIBSHUFF. Esse programa pode ser utilizado para determinar o grau de cobertura de uma biblioteca para diferentes distâncias evolutivas e para determinar a dissimilaridade entre duas ou mais bibliotecas. A vantagem dessa abordagem é que ela não é sensível ao agrupamento filogenético dos táxons. No entanto, os resultados do LIBSHUFF são dependentes do número de amostras, de forma que o número mínimo de seqüências para distinguir duas comunidades dissimilares aumenta com a complexidade da comunidade e diminui com a magnitude da dissimilaridade (Singleton et al., 2001).

Outra abordagem para a análise de dados de seqüenciamento de bibliotecas de clones de rDNA é a filogenética (Martin, 2002; Bohannan & Hughes, 2003), a qual considera a diversidade genética entre comunidades e pode ser usada para comparar a complexidade genética destas.

Adicionalmente, essa abordagem permite, por meio da análise da topologia de árvores filogenéticas, revelar processos determinantes da estrutura das comunidades (Bohannan & Hughes, 2003).

Uma vez que as diferentes abordagens para a análise de dados de diversidade microbiana têm vantagens e desvantagens, e nenhuma delas é consenso nos estudos de ecologia de microrganismos, a tendência é a utilização de várias abordagens para uma análise completa dos dados. Assim, os métodos paramétricos podem ser usados para estimar a diversidade absoluta no ambiente; os não-paramétricos, para comparar a diversidade em diferentes ambientes; e a filogenia, para realizar comparações genéticas de comunidades microbianas diferentes.

## FATORES DETERMINANTES DA DIVERSIDADE E ESTRUTURA DAS COMUNIDADES MICROBIANAS DO SOLO

O solo é um sistema complexo que contém uma grande variedade de micro-habitats, os quais são caracterizados por propriedades físicas, químicas e biológicas únicas. Essas propriedades, além de mostrarem grande variabilidade espacial (horizontal e vertical), apresentam também elevada variabilidade temporal, o que dificulta enormemente a definição de amostras representativas e, conseqüentemente, o estudo do sistema (Torsvik et al., 2002).

A estrutura do solo parece ter papel fundamental na organização das comunidades microbianas. Tem sido observado que mais de 80 % das bactérias se localizam em microporos de microagregados estáveis do solo, medindo 2-20  $\mu\text{m}$  (Ranjard & Richaume, 2001). Além disso, as comunidades microbianas no solo variam até mesmo em função da posição no microagregado (Mummey & Stahl, 2004). Utilizando seqüenciamento de clones de rDNA 16S, foi observado que *Proteobacteria* e *Actinobacteria* são as divisões predominantes em microagregados. No entanto, a primeira divisão predomina na região mais externa dos microagregados, enquanto a segunda predomina no interior destes. Da mesma forma, *Verrucomicrobia* só foi observada no interior dos microagregados. Outra observação interessante é que as comunidades bacterianas do exterior dos microagregados são mais similares a comunidades da rizosfera, quando comparadas àquelas do interior dos microagregados.

A estrutura das comunidades microbianas pode variar também em função da fração granulométrica à qual os microrganismos estão associados. A maior parte da diversidade bacteriana está associada às frações silte e argila, quando comparado à fração areia, sugerindo que as estruturas das comunidades bacterianas são partícula-específicas. Uma grande diversidade de bactérias da divisão *Halophaga/Acidobacteria* e *Prostheco bacter* está associada a pequenas partículas (silte e argila). Já partículas maiores (areia) apresentam menor diversidade de bactérias da divisão *Halophaga/Acidobacteria*, predominando *Proteobacteria* subclasse  $\alpha$  (Torsvik, 2002). Essa localização diferencial na matriz do solo é essencial para a sobrevivência e atividade das bactérias e pode determinar suas funções ecológicas.

Gelsomino et al. (1999), utilizando DGGE para determinar a estrutura das comunidades bacterianas de 16 tipos de solo, provenientes de áreas geográficas diferentes, observaram que solos mais similares tendem a selecionar comunidades bacterianas mais similares, sugerindo que o tipo de solo é o fator preponderante na organização das comunidades microbianas. Da mesma forma, Chiarini et al. (1998), comparando a influência do tipo de solo, cultivar e estágio de desenvolvimento de plantas de milho na estrutura das comunidades de bactérias da rizosfera, observaram que o maior efeito sobre a organização dessas comunidades era exercido pelo tipo de solo e que o genótipo da planta não tinha efeito significativo. A diversidade de *Paenibacillus* e *Pseudomonas* spp. fluorescentes na rizosfera também foi significativamente afetada pelo tipo de solo, em detrimento do genótipo vegetal crescendo no solo (Latour et al., 1996; Da Silva et al., 2003).

Outros estudos têm demonstrado que tanto a quantidade quanto a qualidade da matéria orgânica do solo podem afetar significativamente a diversidade microbiana e a estrutura de suas comunidades (Kim et al., 2002; Zhou et al., 2002; Girvan et al., 2003; Banu et al., 2004; Leckie et al., 2004). Da mesma forma, o estado nutricional do solo pode afetar a diversidade e estrutura das comunidades microbianas. Em solos com altas concentrações de nutrientes disponíveis predominam *Proteobacteria* das subclasses  $\alpha$  e  $\gamma$ , indicando a predominância de seleção do tipo r (Smit et al., 2001). Já em solos com baixa disponibilidade de nutrientes ou com altas concentrações de moléculas recalcitrantes a abundância relativa de *Acidobacteria* é mais elevada do que a de *Proteobacteria*, indicando predominância de seleção do tipo k. Uma maior proporção de *Proteobacteria* em relação a *Acidobacteria* pode ser indicativa de solos que recebem altas concentrações de matéria

orgânica. Em contraste, uma maior proporção de *Acidobacteria* em relação a *Proteobacteria* pode indicar solos distróficos (McCaig et al., 2001).

Outro fator determinante da distribuição de microrganismos nos micro-habitats é o teor de água no solo. Analisando mais de 9.000 perfis de RFLP do rDNA 16S de 29 amostras de solo de quatro regiões geográficas distintas, coletadas de diferentes profundidades (superfície, subsuperfície não-saturada e subsuperfície saturada), Zhou et al. (2002) observaram que em amostras de solo da subsuperfície saturada a comunidade bacteriana apresentava alto grau de dominância, enquanto em amostras da superfície a distribuição dos ribotipos era mais uniforme e todas as espécies de bactérias eram igualmente abundantes. Da mesma forma, em amostras ricas em C, a distribuição de espécies bacterianas era uniforme, independentemente do teor de água e da profundidade de amostragem. Esses dados sugerem que o isolamento espacial pode limitar a competição entre as populações bacterianas nos horizontes superficiais e em solos ricos em C, resultando em alta diversidade e uma estrutura de comunidade uniforme, sem dominância.

As comunidades microbianas desses micro-habitats respondem de forma diferencial a fatores como: umidade, difusão de gases, temperatura, pH, textura, mineralogia, concentração de nutrientes, teor e qualidade da matéria orgânica, vegetação, interferências antrópicas, entre outros. A combinação desses fatores resulta em uma infinidade de condições ambientais distintas, as quais direcionam o processo de seleção e sucessão de populações de microrganismos no solo, contribuindo para a definição da diversidade genética e funcional do ambiente e da estrutura da comunidade microbiana, de maneira geral (Øvreås, 2000).

Atividades antrópicas podem afetar o funcionamento dos ecossistemas e reduzir sua biodiversidade, resultando em desequilíbrios ecológicos de conseqüências imprevisíveis e na extinção de espécies essenciais à manutenção do ecossistema. McGrady-Steed et al. (1997) descreveram o efeito da biodiversidade microbiana em ambientes aquáticos em um processo do ecossistema (respiração) e verificaram que a diversidade estava inversamente relacionada com a variação desse atributo. Constataram também que em ecossistemas com valores de biodiversidade moderada a alta (mais de oito espécies) seus processos são pouco afetados. Como os solos podem conter 6.000-10.000 espécies de procaríotos, seria de esperar que os processos biogeoquímicos não fossem afetados por alterações de biodiversidade. No entanto, no solo, a diminuição da diversidade microbiana pode resultar em diminuição da ciclagem de nutrientes e crescimento de

plantas (Reber, 1992). Talvez os limiares de biodiversidade capazes de manter as funções do ecossistema tenham de ser melhor definidos para solos, já que o grau de isolamento espacial entre as diferentes comunidades microbianas dos micro-habitats é normalmente bastante elevado, se comparado a ecossistemas aquáticos.

Purvis & Hector (2000) relatam que aproximadamente 95 % dos experimentos sobre as relações entre diversidade e funcionamento do ecossistema demonstraram que 20-50 % das espécies são necessárias para manutenção de inúmeros processos biogeoquímicos. Comentam ainda que o aumento da diversidade de um grupo de organismos pode promover a diversidade da associação existente entre diferentes grupos, como a que ocorre entre fungos micorrízicos e plantas, ou, ainda, entre plantas e alguns insetos.

A relação entre diversidade microbiana e qualidade do solo tem sido muito discutida, mas não foi completamente elucidada. O tempo necessário para o ecossistema retornar ao seu estado inicial, após um distúrbio qualquer, define a resiliência do sistema. Quanto maior esse tempo, menor a resiliência. Se a diversidade das comunidades microbianas do solo está diretamente relacionada com sua resiliência, não se sabe; entretanto, esta é uma hipótese plausível, já que a diminuição da diversidade microbiana pode resultar em diminuição da redundância de funções bioquímicas e conseqüente redução da diversidade metabólica (Reber, 1992).

Como as alterações da diversidade e estrutura das comunidades microbianas não implicam necessariamente efeitos deletérios à qualidade do solo, é necessário entender como essas alterações afetam as funções dessas comunidades e sua relação com variações nos atributos do solo.

## DIVERSIDADE, ESTRUTURA DE COMUNIDADES E METABOLISMO

Um dos maiores desafios da microbiologia do solo atualmente é desvendar o papel que um determinado grupo filogenético de microrganismo tem no solo. O desafio fica ainda maior quando esse grupo filogenético não pode ser cultivado. A combinação de metodologias independentes de cultivo tem revelado uma enorme diversidade de microrganismos nos solos, muito superior à diversidade observada no mar, e outros ecossistemas (Curtis et al., 2002), sem, no entanto, elucidar suas funções nos diferentes processos biogeoquímicos.

Os métodos para estudo de comunidades microbianas baseados no seqüenciamento de rDNA geram grandes quantidades de informações sobre os grupos taxonômicos presentes em um determinado ambiente. No entanto, dificilmente essas informações podem ser associadas às funções que cada grupo filogenético pode ter em diferentes processos biogeoquímicos, principalmente quando se refere àqueles grupos com poucos ou sem nenhum representante cultivado.

Boschker et al. (1998) propuseram um método para ligar diretamente populações microbianas a processos biogeoquímicos específicos, pelo suprimento de uma fonte de C marcada com  $^{13}\text{C}$  e a detecção da incorporação do  $^{13}\text{C}$  a lipídeos diagnósticos por PLFA. Com esse método, foi possível determinar que as bactérias mais ativas na incorporação de acetato marcado com  $^{13}\text{C}$  eram também as responsáveis pela redução do sulfato em sedimentos e pertenciam a um grupo similar ao grupo da *Desulfotomaculum acetoxidans* e não ao grupo da *Desulfobacter* spp., a bactéria sulfato-redutora mais amplamente estudada. Observaram também, por meio da assimilação de metano marcado com  $^{13}\text{C}$ , que bactérias metanotróficas tipo I são as principais responsáveis pela oxidação do metano em sedimento de um lago eutrófico.

Outra abordagem metodológica para identificar microrganismos que são ativos em processos metabólicos específicos é por meio da incorporação de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) ao DNA. Yin et al. (2000) utilizaram essa abordagem para avaliar redundâncias funcionais em solos de Rondônia localizados em um gradiente de recuperação de vegetação após degradação por atividade de mineração. Nesse caso, amostras de solos foram incubadas com diferentes fontes de C (L-serina, L-treonina, citrato de sódio ou hidrato de  $\alpha$ -lactose) e BrdU. O DNA metagenômico foi extraído e a fração marcada com BrdU foi isolada por imunocaptura. A avaliação da estrutura da comunidade microbiana ativa foi avaliada por meio do perfil de amplicons do espaço intergênico ribossomal. Essa abordagem pode ser aplicada a diferentes tipos de substratos, porém deve-se considerar que a aplicação de uma fonte de C pode estimular populações microbianas que não estavam ativas *in situ*.

Alternativamente, para ligar a identidade de um microrganismo à sua função no solo tem sido usada a combinação de microauto-radiografia e hibridização *in situ* fluorescente (MAR-FISH) (Gray & Head, 2001). Por meio dessa técnica, substratos marcados podem ser supridos a uma comunidade microbiana e sua incorporação detectada por microauto-radiografia. Os grupos filogenéticos responsáveis pela incorporação do substrato marcado

podem ser então co-localizados por meio de hibridização *in situ*, utilizando-se sondas específicas. Da mesma forma, a combinação da detecção de diferentes espécies iônicas com microsondas e a co-localização de grupos filogenéticos por FISH são uma abordagem interessante para determinar grupos microbianos associados com processos biogeoquímicos (Gray & Head, 2001).

A abordagem usada por Tyson et al. (2004) para associar estrutura de comunidades microbiana e metabolismo difere de outras, por se basear na reconstrução de genomas microbianos diretamente de amostras ambientais. De maneira geral, o DNA metagenômico é extraído do solo, fragmentado, clonado e seqüenciado aleatoriamente (“random shotgun sequencing”). Posteriormente, as seqüências são montadas e agrupadas segundo seu teor em G + C. Esses agrupamentos baseados no teor em G + C, normalmente representando o genoma de um microrganismo, são analisados para afiliação filogenética das seqüências do rDNA presentes nos agrupamentos. Com essa abordagem, utilizando amostras de um biofilme de baixa complexidade biológica que se desenvolve em minas de pirita ( $\text{FeS}_2$ ), foi possível reconstruir os genomas de *Leptospirillum* grupo II e *Ferroplasma* tipo II, uma espécie de bactéria desconhecida e nunca antes cultivada, quase que na totalidade. Foi possível também recuperar parcialmente os genomas de *Leptospirillum* grupo III, *Ferroplasma* tipo I e G-Plasma. A reconstrução de uma cadeia de transporte de elétrons putativa no grupo das *Leptospirillum* possibilitou estabelecer os possíveis mecanismos de oxidação do Fe em condições microaeróbias, predominantes nesse tipo de biofilme. Outros aspectos da geração de energia, fixação do C e N, e homeostase foram desvendados, possibilitando uma visualização das estratégias de sobrevivência microbiana em ambientes extremos. Embora seja promissora, essa abordagem depende de uma elevada capacidade de seqüenciamento e processamento de seqüências de DNA (bioinformática), dificultando sua aplicação na maioria dos laboratórios de microbiologia do solo.

## DIVERSIDADE MICROBIANA COMO INDICADORA DE QUALIDADE DO SOLO

Quando o objetivo for definir atributos do solo que permitam inferir sua qualidade, existem indicadores físicos e químicos que podem ser utilizados com certo grau de confiabilidade (Tótola & Chaer, 2002). Já os indicadores

microbiológicos são menos confiáveis, pois a base de informações disponíveis ainda não é suficientemente consistente. Se a diversidade funcional da microbiota do solo é determinada pela diversidade genética e está associada à ocorrência de processos essenciais para a manutenção de sua qualidade, é plausível supor-se que a diversidade genética pode ser usada como indicadora da qualidade dos solos. A possibilidade de explorar a relação entre diversidade microbiana e processos biogeoquímicos constitui o novo paradigma da microbiologia do solo.

Alguns estudos utilizam características biológicas, como: C e N na biomassa microbiana, N potencialmente mineralizável, respiração do solo, relação C-microbiano:C-total e quociente metabólico (relação entre a biomassa microbiana e respiração basal), como indicadores de mudanças na comunidade microbiana impostas pelo tipo de manejo, distúrbio ou estresse. Assim, em sistemas de manejo conservacionistas, como o plantio direto, aumentos significativos da biomassa microbiana e diminuição das taxas respiratórias, bem como aumento da eficiência de utilização dos nutrientes do solo, são comumente observados (Cattelan & Vidor, 1990; Balota et al., 1998). Essas alterações podem ser explicadas pela melhoria do conjunto das características físicas, químicas e biológicas do solo, que incluem elevação dos teores de água, menores oscilações térmicas e aumento nos espaços porosos, permitindo a aeração necessária aos processos biológicos (Sidiras et al., 1982; Sidiras & Pavan, 1985; Lal, 1999; Werner, 1997; Mendes, 2003). Vários estudos têm demonstrado a eficiência de diferentes indicadores biológicos para comparar respostas de sistemas de manejo a modificações das condições ambientais, sem, no entanto, apontar para um bioindicador único (Nuernberg et al., 1984; Cattelan & Vidor, 1990; Werner 1997; Gunapala & Scow, 1998; Swezey et al., 1998; Goh et al., 2000).

As enzimas do solo também podem ser utilizadas como indicadores sensíveis das mudanças decorrentes de práticas de manejo, incluindo aplicação de resíduos orgânicos, compactação do solo, rotação de culturas (Brussard et al., 2003). Enzimas como proteases, fostatases, urease,  $\beta$ -glicosidase e arilsulfatase, entre outras, têm sido propostas como indicadoras de alterações da qualidade de solos (Matsuoka et al., 2003; Mendes et al., 2003). No entanto, nenhuma delas apresenta todas as características inerentes a um bom indicador de qualidade.

Vários processos biogeoquímicos apresentam alto grau de redundância, isto é, diferentes populações de microrganismos podem, em diferentes condições ambientais, realizá-los. Assim, a diminuição da atividade de uma população de microrganismos por alteração das condições ambientais

poderá ser compensada pelo aumento da atividade de outra população, sem alteração significativa da atividade total da comunidade. Atividades que apresentam alto grau de redundância dificilmente se correlacionam com alterações da qualidade do solo, embora essas medidas sejam úteis na determinação das taxas de degradação de materiais orgânicos no solo (Brookes, 1995). Provavelmente, os melhores indicadores de qualidade de solo poderão ser encontrados entre as atividades microbiológicas menos redundantes, havendo necessidade de estudos detalhados sobre os grupos de microrganismos associados a essas atividades.

Stenberg (1999) enfatiza que nenhum indicador individualmente conseguirá descrever e quantificar todos os aspectos da qualidade do solo, e múltiplos indicadores devem ser utilizados. Os critérios para a seleção de indicadores relacionam-se, principalmente, com a sua exatidão em definir os processos do ecossistema, além da sensibilidade a fatores como poluição, manejo e variações climáticas (Doran, 1997). Como a diversidade microbiana é responsável pelos processos biogeoquímicos mais importantes no solo, é possível que, avaliando-se essa diversidade como um todo, os processos biogeoquímicos possam ser integrados em um fator único de expressão de qualidade, por meio de um índice associado à diversidade microbiana. A identificação de grupos de microrganismos endêmicos em solos com características comuns, ou grupos de microrganismos que respondem de forma similar a um distúrbio, poderia ser uma das abordagens para o uso da diversidade microbiana como indicador de qualidade de solos. As informações geradas pelos estudos de ecologia e diversidade microbiana em solos sob as mais variadas condições ambientais terão papel fundamental na identificação de indicadores microbiológicos de qualidade de solos mais confiáveis e de fácil determinação.

Smit et al. (2001) realizaram estudos filogenéticos com o objetivo de relacionar a presença de diferentes grupos de microrganismos com o estado nutricional do solo e constataram que em solos com grande quantidade de nutrientes disponíveis ocorre seleção positiva para  $\alpha$ - e  $\gamma$ -*Proteobacteria*. Já em solos com poucos nutrientes ou com alta concentração de substâncias recalcitrantes, a proporção relativa de *Acidobacterium* aumenta. Dessa forma, a razão entre a abundância de *Proteobacteria* e a de *Acidobacterium* poderia ser um indicador do estado trófico do solo (McCaig et al., 2001; Smit et al., 2002). Talvez o exemplo citado seja simplista demais, mas é uma indicação de que comunidades microbianas, e não populações específicas, é que devem ser monitoradas para a diagnose de distúrbios ou estresses aos quais o solo foi submetido.

## PERSPECTIVAS

A microbiota dos solos detém a maior parte da biodiversidade do planeta, porém somente uma pequena fração dessa diversidade é conhecida e passível de cultivo *in vitro*. Até recentemente, os estudos de microbiologia do solo eram feitos com base nos microrganismos capazes de crescer em meios seletivos, gerando uma visão distorcida da organização e do funcionamento das comunidades microbianas. Essa visão distorcida da ecologia microbiana nos solos tem resultado em baixa efetividade na utilização biotecnológica dos processos microbianos para aumentar a produção agrícola e para a biorremediação de solos contaminados, ou como bioindicadores de qualidade de solos, para citar alguns exemplos. O aprimoramento das técnicas para inventariar microrganismos nos solos e definir os processos biogeoquímicos aos quais eles estão associados, bem como das técnicas para análise estatística de grandes conjuntos de dados biológicos e ambientais, conjuntamente, são essenciais para o avanço da pesquisa em microbiologia do solo e para a efetiva aplicação biotecnológica dos conhecimentos gerados. Outro aspecto da microbiologia do solo que carece de aprimoramento é o método usado para cultivo de microrganismos considerados “não-cultiváveis”. Certamente, esses métodos deverão considerar processos de sinalização entre diferentes microrganismos que ocorrem em biofilmes no solo e informações geradas por análise de metagenomas.

Alguns países têm investido consideráveis montantes de recursos financeiros na pesquisa da diversidade microbiana em diferentes ambientes, por meio de projetos especiais de prospecção da biodiversidade microbiana, suas funções no ambiente e interações com outros microrganismos, plantas e animais, como o “Microbial Observatory” e o “Microbial Interactions and Processes”, financiados pela “National Science Foundation”. No Brasil, relativamente pouco tem sido feito institucionalmente com essa finalidade. Na maioria dos casos, os projetos para pesquisa da diversidade microbiana são iniciativas individuais, com muitas limitações metodológicas. O conhecimento detalhado da diversidade microbiana nos solos de diferentes biomas brasileiros é estratégico para o desenvolvimento biotecnológico, bem como para a formulação de políticas públicas de preservação ambiental, e deve ser incentivado nacionalmente por meio de programas especiais de agências de fomento à pesquisa. Sem essa iniciativa, continuaremos na penumbra tecnológica decorrente do parco conhecimento de nossa biodiversidade.

## LITERATURA CITADA

- AGNELLI, A.; ASCHER, J.; CORTI, G.; CECCHERINI, M.T.; NANNIPIERI, P. & PIETRAMELLARA, G. Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. *Soil Biol. Biochem.*, 36:859-868, 2004.
- AMANN, R.L. & LUDWIG, W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *Microbiol. Rev.*, 24:555-565, 2000.
- AQUILANTI, L.; FAVILLI, F. & CLEMENTI, F. Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. *Soil Biol. Biochem.*, 36:1475-1483, 2004.
- BACKMAN, J.S.K.; HERMANSSON, A.; TEBBE, C.C. & LINDGREN, P.E. Liming induces growth of a diverse flora of ammonia-oxidising bacteria in acid spruce forest soil as determined by SSCP and DGGE. *Soil Biol. Biochem.*, 35:1337-1347, 2003.
- BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S. & HUNGRIA, M. Biomassa microbiana e sua sustentabilidade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. *R. Bras. Ci. Solo*, 22:641-649, 1998.
- BANU, N.A.; SINGH, B. & COPELAND, L. Soil microbial biomass and microbial biodiversity in some soils from New South Wales, Australia. *Aust. J. Soil Res.*, 42:777-782, 2004.
- BAUDOIN, E.; BENIZRI, E. & GUCKERT, A. Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Appl. Soil Ecol.*, 19:135-145, 2002.
- BENDING, G.D.; PUTLAND, C. & RAYNS, F. Changes in microbial community metabolism and labile organic matter fractions as early indicators of the impact of management on soil biological quality. *Biol. Fertil. Soils*, 31:78-84, 2000.
- BLACKWOOD, C.B. & BUYER, J.S. Soil microbial communities associated with *Bt* and non-*Bt* corn in three soils. *J. Environ. Qual.*, 33:832-6, 2004.
- BOETIUS, A.; RAVENSCHLAG, K.; SCHUBERT, J.C.; RICKERT, D.; WIDDEL, F.; GIESEKE, A.; AMANN, R.; JORGENSEN, B.B.; WITTE, U. & PFANNKUCHE, O. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature*, 407:623-626, 2000.
- BOHANNAN, B.J.M. & HUGHES, J. New approaches to analyzing microbial biodiversity data. *Curr. Op. Microbiol.*, 6:282-287, 2003.
- BOON, N.; MARLÉ, C.; TOP, E.M. & VERSTRAETE, W. Comparison of the spatial homogeneity of physico-chemical parameters and bacterial 16S rRNA genes in sediment samples from a dumping site for dredging sludge. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 53:742-747, 2000.
- BORNEMAN, J. & TRIPLETT, W.E. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:2647-2653, 1997.

- BOSCHKER, H.T.S.; NOLD, S.C.; WELLSBURY, P.; BOS, D.; DE GRAAF, W.; PEL, R.; PARKES, R.J. & CAPPENBERG, T.E. Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by <sup>13</sup>C-labelling of biomarkers. *Nature*, 392:801-805, 1998.
- BRENT, E. & PHILL, G. Base-calling of automated sequencer traces using PHRED. II. Error probabilities. *Genome Res.*, 8:186-194, 1998.
- BRESLAUER, K.J.; FRANK, R.; BLOCKER, H. & MARKY, L.A. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 83:3746-3750, 1986.
- BROOKES, P.C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metal. *Biol. Fertil. Soils.*, 19:269-279, 1995.
- BRUSSAARD, L.; KUYPER, T.W.; DIDDEN, W.A.M.; DE GOEDE, R.G.M. & BLOEM, J. Biological soil quality from biomass to biodiversity - importance and resilience to management stress and disturbance. In: SCHIONNING, P.; CHRISTENSEN, B.T. & ELMHOLT, S., eds. *Managing soil quality: challenges in modern agriculture*. Walingford, CAB International, 2003. p.139-161.
- BUSSE, M.D.; RATCLIFF, A.W.; SHESTAK, C.J. & POWERS, R.F. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.*, 33:1777-1789, 2001.
- CATTELAN, A.J. & VIDOR, C. Sistemas de culturas e a população microbiana do solo. *R. Bras. Ci. Solo*, 14:125-132, 1990.
- CHAO, A. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics*, 43:783-791, 1987.
- CHAO, A. & LEE, S.M. Estimating the number of classes via sample coverage. *J. Am. Stat. Associ.*, 87:210-217, 1992.
- CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; NACAMULLI, C. & TABACCHIONI, S. Influence of plant development, cultivar and soil type on microbial colonization of maize roots. *Appl. Soil Ecol.*, 226:11-18, 1998.
- CHOI, K. & DOBBS, F.C. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. *J. Microbiol. Methods*, 36:203-213, 1999.
- CLASSEN, A.T.; BOYLE, S.I.; HASKINS, K.E.; OVERBY, S.T. & HART, S.C. Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubation temperature influences on contrasting soils. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 44:319-328, 2003.
- CURTIS, T.P.; SLOAN, W.T. & SCANNEL, J.W. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 99:10494-10499, 2002.
- CURY, J.C. Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solos de mangue contaminado com petróleo. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2002. 84p. (Tese de Mestrado)
- DALSGAARD, T.; CANFIELD, D.E.; PETERSEN, J.; THAMDRUP, B. & ACUNA-GONZALES, J. N<sub>2</sub> production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. *Nature*, 422:606-608, 2003.

- DAUBER, J. & WOLTERS, V. Microbial activity and functional diversity in the mounds of three different ant species. *Soil Biol. Biochem.*, 32:93-99, 2000.
- DAVIS, M.R.H.; ZHAO, F.J. & McGRATH, S.P. Pollution-induced community tolerance of soil microbes in response to a zinc gradient. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23:2665-2672, 2004.
- DA SILVA, K.R.A.; SALLES, J.F.; SELDIN, L. & van ELSAS, J.D. Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. *J. Microbiol. Methods.*, 54:213-231, 2003.
- DE SOUZA, F.A.; KOWALCHUK, G.A.; LEEFLANG, P.; van VEEN, J.A. & SMIT, E. PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis profiling of inter- and intraspecies 18S rRNA gene sequence heterogeneity is an accurate and sensitive method to assess species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi of the genus *Gigaspora*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:1413-1424, 2004.
- DEGENS, B.P. & HARRIS, J.A. Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.*, 29:1309-1320, 1997.
- DORAN, J.W. Soil quality and sustainability. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26., Rio de Janeiro, 1997. Anais. Rio de Janeiro, Comissão do "V Inventory, Genesis, Morphology and Classification of Soils", 1997, 19p.
- EL FANTROUSSI, S.; VERSCHUER, L.; VERSTRAETE, W. & TOP, E.M. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:982-988, 1999.
- FELSESTEIN, J.P. (Phylogenetic Inference Package) version 3.5c. Seattle, University Washington, 1993.
- FISHER, M.M. & TRIPLETT, E.W. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:4630-4636, 1999.
- GARBEVA, P.; vanVEEN, J.A. & van ELSAS, J.D. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 42:243-270, 2004.
- GARLAND, J.L. & MILLS, A.L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:2351-2355, 1991.
- GARLAND, J.L. Patterns of potential C source utilization by rhizosphere communities. *Soil Biol. Biochem.*, 28:223-230, 1996.
- GATTINGER, A.; GÜNTNER, A.; SCHLOTTER, M. & MUNCH, ?.?. Characterisation of *Archaea* in soils by polar lipid analysis. *Acta Biotech.*, 23:21-28, 2003.
- GELSOMINO, A.; KEIJZER-WOLTERS, A.C.; CACCO, G. & van ELSAS, J.D. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods*, 38:1-15, 1999.

- GIRVAN, M.S.; BULLIMORE, J.; PRETTY, J.N.; OSBORN, A.M. & BALL, A.S. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:1800-1809, 2003.
- GOH, K.M.; BRUCE, G.E.; DALY, M.J. & FRAMPTON, C.M.A. Sensitive indicators of soil organic matter sustainability in orchard floors of organic, conventional and integrated apple orchards in New Zealand. *Biol. Agric. Hortic.*, 17:197-205, 2000.
- GOODFRIEND, W.L. Microbial community patterns of potential substrate utilization: a comparison of salt marsh, sand dune, and seawater-irrigated agronomic systems. *Soil Biol. Biochem.*, 30:1169-1176, 1998.
- GRAY, N.D. & HEAD, I.M. Linking genetic identity and function in communities of uncultured bacteria. *Environ. Microbiol.*, 3:481-492, 2001.
- GUNAPALA, N. & SCOW, K.M. Dynamics of soil microbial biomass and activity in conventional and organic farming systems. *Soil Biol. Biochem.*, 30:805-826, 1998.
- HACKL, E.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S.; BODROSSY, L. & SESSITSCH, A. Comparison of diversities and compositions of bacterial populations inhabiting natural forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:5057-65, 2004.
- HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.*, 105:1422-1432, 2001.
- HUANG, X. & MADAN, A. CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Res.*, 9:868-877, 1999.
- IBEKWE, A.M. & KENNEDY, A.C. Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as a tool to investigate community structure of two agricultural soils. *Plant Soil*, 206:151-161, 1999.
- ITOH, K.; IKUSHIMA, T.; SUYAMA, K. & YAMAMOTO, H. Evaluation of pesticide effects on microbial communities in a paddy soil comparing with that caused by soil flooding. *J. Pest. Sci.*, 28:51-54, 2003.
- JACKSON, C.R.; RODEN, E.E. & CHURCHILL, P.F. Denaturing gradient gel electrophoresis can fail to separate 16S rDNA fragments with multiple base differences. *Mol. Biol. Today*, 1:49-51, 2000.
- JANSA, J.; MOZAFAR, A.; KUHN, G.; ANKEN, T.; RUH, R.; SANDERS, I.R. & FROSSARD, E. Soil tillage affects the community structure of mycorrhizal fungi in maize roots. *Ecol. Appl.*, 13:1164-1176, 2003.
- JANSSEN, P.H.; YATES, P.S.; GRINTON, B.E.; TAYLOR, P.M. & SAIT, M. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:2391-2396, 2002.
- JENSEN, M.A.; WEBSTER, J.A. & STRAUS, N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:945-952, 1993.
- JETTEN, M.S.M. New pathways for ammonia conversion in soil and aquatic systems. *Plant Soil*, 230:9-19, 2001.

- JOHNSON, D.; VANDENKOORNHUYSE, P.J.; LEAKE, J.R.; GILBERT, L.; BOOTH, R.E.; GRIME, J.P.; YOUNG, J.P.W. & READ, D.J. Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms. *New Phytol.*, 161:503-515, 2004.
- JUNCA, H. & PIEPER, D.H. Functional gene diversity analysis in BTEX contaminated soils by means of PCR-SSCP DNA fingerprinting: comparative diversity assessment against bacterial isolates and PCR-DNA clone libraries. *Environ. Microbiol.*, 6:95-110, 2004.
- KEMP, P.F. & ALLER, J.Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 47:161-177, 2004.
- KHAN, M. & SCULLION, J. Effect of soil on microbial responses to metal contamination. *Environ. Poll.*, 110:115-25, 2000.
- KIM, J.S.; JOO, J.B.; WEON, H.Y.; KANG, C.S.; LEE, S.K. & YAHNG, C.S. FAME analysis to monitor impact of organic matter on soil bacterial populations. *J. Microbiol. Biotech.*, 12:382-388, 2002.
- KIRK, J.L.; BEAUDETTE, L.A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J.N.; LEE, H. & TREVORS, J.T. Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Methods*, 58:169-188, 2004.
- KYSELA, D.T.; PALACIOS, C. & SOGIN, M.L. Serial analysis of V6 ribosomal sequence tags (SARST-V6): a method for efficient, high-throughput analysis of microbial community composition. *Environ. Microbiol.*, 7:356-364, 2005.
- KJOLLER, R. & ROSENDAHL, S. Molecular diversity of glomalean (arbuscular mycorrhizal) fungi determined as distinct *Glomus* specific DNA sequences from roots of field grown peas. *Mycol. Res.*, 105:1027-1032, 2001.
- LAL, R. Métodos para a avaliação do uso sustentável dos recursos solo e água nos trópicos. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 1999. 97p.
- LATOUR, X.; CORBERAND, T.; LAGUERRE, G.; ALLARD, F. & LEMANCEAU, P. The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2449-2456, 1996.
- LECKIE, S.E.; PRESCOTT, C.E.; GRAYSTON, S.J.; NEUFELD, J.D. & MOHN, W.W. Characterization of humus microbial communities in adjacent forest types that differ in nitrogen availability. *Microbiol. Ecol.*, 48:29-40, 2004.
- LIESACK, W.; JANSSEN, P.H.; RAINEY, F.A.; WARD-RAINEY, N.L. & STACHEBRANDT, E. Microbial diversity in soil - the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. In: van ELSAS, J.D.; WELLINGTON, E.M.H. & TREVORS, J.T., eds. *Modern soil microbiology*. New York, Marcel Dekker, 1997, 693p.
- LILBURN, T.G.; KIM, K.S.; OSTROM, N.E.; BYZEK, K.R.; LEADBETTER, J.R. & BREZNAK, J.A. Nitrogen fixation by symbiotic and free-living spirochetes. *Science*, 292:2495-2498, 2001.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4516-4522, 1997.

- LUPWAYI, N.Z.; ARSHAD, M.A.; RICE, W.A. & CLAYTON, G.W. Bacterial diversity in water-stable aggregates of soils under conventional and zero tillage management. *Appl. Soil Ecol.*, 16:251-261, 2001.
- MADAN, R.; PANKHURST, C.; HAWKE, B. & SMITH, S. Use of fatty acids for identification of AM fungi and estimation of the biomass of AM spores in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 34:125-128, 2002.
- MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.E. & LIEBEREI, R. Arbuscular mycorrhizal infection changes the bacterial 16S rDNA community composition in the rhizosphere of maize. *Mycorrhiza*, 11:297-302, 2001a.
- MARSCHNER, P.; YANG, C.H.; LIEBEREI, R. & CROWLEY, D.E. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.*, 33:1437-1445, 2001b.
- MARTIN, A.P. Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:3673-3682, 2002.
- MASSOL-DEYA, A.A.; ODELSON, D.A.; HICKEY, R. F. & TIEDJE, J.M. Bacterial community fingerprinting of amplified 16 and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In: AKKERMANS, A.D.L.; van ELSAS, J.D. & BRUIJN F.J., eds. *Molecular microbial ecology manual*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1995. p.1-8.
- MATSUOKA, M.; MENDES, I.C. & LOUREIRO, M.F. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste/MT. *R. Bras. Ci. Solo*, 27:425-433, 2003.
- McCAIG, A.E.; GLOVER, L.A. & PROSSER, J.I. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimens by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:4554-4559, 2001.
- McGRADY-STEED, J.; HARRIS, P.M. & MORIN, P.J. Biodiversity regulates ecosystem predictability. *Nature*, 390:162-165, 1997.
- MENDES, I.C.; SOUZA, L.V.; RESCK, D.V.S. & GOMES, A.C. Propriedades biológicas em agregados de um LE sob plantio convencional e direto no Cerrado. *R. Bras. Ci. Solo*, 27:435-443, 2003.
- MIETHLING, R.; AHREND, K. & TEBBE, C.C. Structural differences in the rhizosphere communities of legumes are not equally reflected in community-level physiological profiles. *Soil Biol. Biochem.*, 35:1405-1410, 2003.
- MOFFETT, B.F.; NICHOLSON, F.A.; UWAKWE, N.C.; CHAMBERS, B.J.; HARRIS, J.A. & HILL, T.C.J. Zinc contamination decreases the bacterial diversity of agricultural soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 43:13-19, 2003.
- MUMMEY, D.L. & STAHL, P.D. Analysis of soil whole- and inner-microaggregate bacterial communities. *Microbiol Ecol.*, 48:41-50, 2004.
- MUYZER, G.; WAAL, E.C. & UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:695-700, 1993.
- Tópicos Ci. Solo, 4:43-84, 2005

- 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. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:3988-3995, 2002.
- NEUFELD, J.D.; YU, Z.; LAM, W. & MOHN, W.W. Serial analysis of ribosomal sequences tags (SARST): a high-throughput method for profiling complex microbial communities. *Environ. Microbiol.*, 6:131-144, 2004.
- NILSSON, L.O.; GIESLER, R.; BAATH, E. & WALLANDER, H. Growth and biomass of mycorrhizal mycelia in coniferous forests along short natural nutrient gradients. *New Phytol.*, 165:613-622, 2004.
- NUBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R.I.; LUDWIG, W. & BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymixa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Bacteriol.*, 178:5636-5643, 1996.
- NUERNBERG, N.J.; VIDOR, C. & STAMMEL, J.G. Efeito de sucessões de culturas e tipos de adubação na densidade populacional e atividade microbiana do solo. *R. Bras. Ci. Solo*, 8:197-203, 1984.
- OREMLAND, R.S. & STOLZ, J.F. The ecology of arsenic. *Science*, 300:939-944, 2003.
- ØVREÅS, L. Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. *Ecol. Lett.*, 3:236-251, 2000.
- ØVREÅS, L. & TORSVIK, V. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microb. Ecol.*, 36:303-315, 1998.
- PEIXOTO, R.S.; COSTA, C.; RUMJANEK, N.G.; MACRAE, A. & ROSADO, A.S. Use of *rpoB* and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. *Letter. Appl. Microbiol.*, 35:316-320, 2002.
- PURVIS, A. & HECTOR, A. Getting the measure of biodiversity. *Nature*, 405:212-218, 2000.
- RANJARD, L.; POLY, F. & NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Res. Microbiol.*, 151:167-177, 2000.
- RANJARD, L. & RICHAUME, A. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Res. Microbiol.*, 152:707-716, 2001.
- RAPPÉ, M.S. & GIOVANNONI, S.J. The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.*, 57:369-394, 2003.
- REBER, H.H. Simultaneous estimates of the diversity and the degradative capability of heavy-metal-affected soil bacterial communities. *Biol. Fertil. Soils.*, 13:181-186, 1992.
- ROSSELLÓ-MORA, R. & AMANN, R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25:39-67, 2001.
- SCHINK, B.; THIEMANN, V.; LAUE, H. & FRIEDRICH, W. *Desulfotignum phosphitoxidans* sp. Nov., a new marine sulfate reducer that oxidizes phosphite to phosphate. *Arch. Microbiol.*, 177:381-391, 2002.

- SCHMALENBERGER, A. & TEBBE, C.C. Genetic profiling of noncultivated bacteria from the rhizospheres of sugar beet (*Beta vulgaris*) reveal field and annual variability but no effect of a transgenic herbicide resistance. *Can. J. Microbiol.*, 49:1-8, 2003.
- SIDIRAS, N. & PAVAN, M.A. Influência do sistema de manejo do solo no seu nível de fertilidade. *R. Bras. Ci. Solo*, 9:249-254, 1985.
- SIDIRAS, N.; HENKLAIN, J.C. & DERPSCH, R. Comparison of three different tillage systems with respect to aggregate stability, the soil and water conservation and the yields of soybean and wheat on an oxisol. *J. Agric. Crop Sci.*, 151:137-148, 1982.
- SINGLETON, D.R.; FURLONG, M.A.; RATHBUN, S.L. & WHITMAN, W.B. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:4374-4376, 2001.
- SLIWINSKI, M.K. & GOODMAN, R.M. Comparison of *Crenarchaea consortia* inhabiting the rhizosphere of diverse terrestrial plants with those in bulk soil in native environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:1821-1826, 2004.
- SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GOMMANS, S.; van den BROEK, J.; van, M.S. & WERNARS, K. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Appl. Environ. Microb.*, 67:2284-2291, 2001.
- SMIT, E.; LEEFLANG, P. & WERNARS, K. Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soils caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 23:249-261, 1997.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:6189-6200, 2003.
- STENBERG, B. Monitoring soil quality of arable land: microbiological indicators. *Soil Plant*, 49:1-24, 1999.
- STROUS, M.; FUERST, J.A.; KRAMER, E.H.M.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; van de PAS-SCHOONEN, K.T.; WEBB, R.; KUENEN, J.G. & JETTEN, M.S.M. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, 400:446-449, 1999.
- SUGIMOTO, N.; NAKANO, S.; YONEYAMA, M. & HONDA, K. Improved thermodynamic parameters and helix initiation factor to predict stability of DNA duplexes. *Nucleic Acids Res.*, 24:4501-4505, 1996.
- SWEZEY, S.L.; WERNER, M. R.; BUCHANAN, M. & ALLISON, J. Comparison of conventional and organic apple production systems during three years of conversion to organic management in coastal California. *Am. J. Alter. Agric.*, 13:162-180, 1998.
- SWOFFORD, D.L. PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods), version 4.0b 10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2003.
- TIEDJE, J.M.; ASUMING-BREMPPONG, S.; NÜSSLEIN, K.; MARSH, T.L. & FLYNN, S.J. Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl. Soil Ecol.*, 13:109-122, 1999.

- TORSVIK, V.; GOKSOYR, J. & DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:78-787, 1990.
- TORSVIK, V. & ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.*, 5:240-245, 2002.
- TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. & THINGSTAD, T.F. Prokaryotic diversity - magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, 296:1064-1066, 2002.
- TÓTOLA, M.R. & CHAER, G.M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: ALVAREZ V., V.H.; SCHAEFER, C.E.G.R.; BARROS, N.F.; MELLO, J.W.V. & COSTA, L.M., eds. *Tópicos em ciência do solo*. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002, v.2, p.195-276.
- TYSON, G.W.; CHAPMAN, J.; HUGENHOLTZ, P.; ALLEN, E.E.; RAM, R.J.; RICHARDSON, P.M.; SOLOVYEV, V.V.; RUBIN, E.M.; ROKHSAR, D.S. & BANFIELD, J.F. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genome from the environment. *Nature*, 428:37-43, 2004.
- VALINSKY, L.; VEDOVA, G.D.; SCUPHAM, A.J.; ALVEY, S.; FIGUEROA, A.; YIN, B.; HARTIN, R.J.; CHROBAK, M.; CROWLEY, D.E.; JIANG, T. & BORNEMAN, J. Analysis of bacterial community composition by oligonucleotide fingerprinting of rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:3243-3250, 2002.
- VETRIANI, C.; JANNASCH, H.W.; MCGREGOR, B.J.; STAHL, D.A. & REYSENBACH, A.L. Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic *Archaea* in deep-sea sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:4375-4384, 1999.
- VIAUD, M.; PASQUIER, A. & BRYGOO, Y. Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS. *Mycol. Res.*, 104:1027-1032, 2000.
- VITI, C. & GIOVANNETTI, L. Characterization of cultivable heterotrophic bacterial communities in Cr-polluted and unpolluted soils using Biolog and ARDRA approaches. *Appl. Soil Ecol.*, 28:101-112, 2005
- WANG, A.Y.; CHEN, J. & CROWLEY, D.E. Changes in metabolic and structural diversity of a soil bacterial community in response to cadmium toxicity. *Biol. Fertil. Soils*, 39:452-456, 2004.
- WERNER, M.R. Soil quality characteristics during conversion to organic orchard. *J. Soil Ecol.*, 5:151-167, 1997.
- WHITMAN, W.B.; COLEMAN, D.C. & WIEBE, W.J. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 95:6578-6583, 1998.
- WILSON, K.H.; WILSON, W.J.; RADOSEVICH, J.L.; DeSANTIS, T.Z.; VISWANATHAN, V.S.; KUCZMARSKI, T.A. & ANDERSEN, G.L. High-density microarray of small-subunit ribosomal DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:2535-2541, 2002.
- WOESE, C.R.; STACKEBRANDT, E.; MACKE, T.J. & FOX, G.E. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Syst. Appl. Microbiol.*, 6:143-151, 1985.
- WUNSCH, L.; BRUGGEMANN, L. & WOLFGANG B. Determination of substrate utilization patterns of soil microbial communities: an approach to assess population changes after hydrocarbon pollution. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 17:295-306, 1995.

- YANG, C.H. & CROWLEY, D.E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:345-351, 2000.
- YAO, H.Y.; XU, J.M. & HUANG, C.Y. Substrate utilization pattern, biomass and activity of microbial communities in a sequence of heavy metal-polluted paddy soils. *Geoderma*, 115:139-148, 2003.
- YIN, B.; CROWLEY, D.; SPAROVEK, G.; MELO, W.J. & BORNEMAN, J. Bacterial functional redundancy along a soil reclamation gradient. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:4361-4365, 2000.
- ZAK, J.C.; WILLIG, M.R.; MOORHEAD, D.L. & WILDMAN, H.G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biol. Biochem.*, 26:1101-1108, 1994.
- ZENGLER, K.; RICHNOW, H.H.; ROSSELLÓ-MORA, R.; MICHAELIS, W. & WIDDEL, F. Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature*, 401:266-269, 1999.
- ZENGLER, K.; TOLEDO, G.; RAPPÉ, M.; ELKINS, J.; MATHUR, E.J.; SHORT, J.M. & KELLER, M. Cultivating the uncultured. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 99:15681-15686, 2002.
- ZHOU, J.Z.; XIA, B.C.; TREVES, D.S.; WU, L.Y.; MARSH, T.L.; O'NEILL, R.V.; PALUMBO, A.V. & TIEDJE, J.M. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:326-334, 2002.