

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**Isolamento e Identificação de Actinobactérias em Solos de Terra
Preta Antropogênica (TPA) da Amazônia Central por ARDRA e
Seqüenciamento do Gene 16S rRNA**

CARLOS EDUARDO GARCIA

Químico Industrial

Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

PROF DR. FUMIO YOKOYA

Orientador

PROFA. DRA. TSAI SI U MUI

Co-orientadora

Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do Título de Doutor
em Ciência de alimentos

Campinas - SP

2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

G165i Garcia, Carlos Eduardo
Isolamento e identificação de actinobactérias em solos de terra preta antropogênica (TPA) da Amazônia Central por ARDRA e seqüenciamento do gene 16S rRNA / Carlos Eduardo Garcia. – Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Fumio Yokoya
Co-orientador: Tsai Siu Mui
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Actinobactéria. 2. Biodiversidade. 3. Amazônia. I. Yokoya, Fumio. II. Mui, Tsai Siu. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

(ckn/fea)

Titulo em ingles: Isolation and identification of actinobacteria in anthropogenic dark earth of Central Amazônia by ARDRA and sequencing of 16S rRNA gene

Palavras-chave em inglês (Keywords): Actinobacteria, Biodiversity, Amazonia

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Fumio Yokoya

Joao Lúcio de Azevedo

José Luiz Pereira

Adriane Nunes de Souza

Aline Aparecida Pizzirani Kleiner

Lúcia Regina Durrant

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fumio Yokoya
(Presidente)

Dra. Adriane Nunes de Souza

Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani Kleiner

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Prof. Dr. José Luiz Pereira

Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant

**Se todos nós fizéssemos as
coisas de que somos capazes,
ficaríamos espantados com nós
mesmos.**

(Thomas Edison)

*Aos meus pais Valdomiro (in
memoriam) e Maria, meus irmãos e aos
meus sobrinhos Melissa, Vinicius e
Aline.*

Dedico

A Dra. Marília Oetterer.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Fumio Yokoya, pela oportunidade de ingresso no programa de doutoramento em Ciência de Alimentos da FEA/UNICAMP e pela confiança depositada.

A minha co-orientadora Dra. Tsai Siu Mui, pelo convite para a realização da parte prática deste trabalho nos Laboratórios de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP), pelo apoio e incentivo.

A Dra. Marília Oetterer que sempre me incentivou.

A todos os pesquisadores e funcionários do CENA-USP por terem me recebido de portas abertas.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

A Dra. Adriane Nunes de Souza pela amizade, ajuda na parte prática dos experimentos e construção das árvores filogenéticas.

As pesquisadoras Dra. Adriana Pinheiro Martinelli Rodriguez e Dra. Marli de Fatima Fiore pela inestimável convivência dentro CENA-USP.

Aos técnicos dos Laboratórios de Biologia Celular e Molecular, Fábio Rodrigo S. Duarte, Francisco Carlos Montrazi, José Elias Gomes e Wagner Piccinini por todo o apoio e ajuda na parte laboratorial deste trabalho.

A minha mais fiel amiga Michele First Quest (Zara) por sua companhia constante.

Aos amigos estagiários e estudantes de pós-graduação do CENA, Adriana Sturion Lorenzi, Camila Maistro Patreze, Caroline Souza Pamplona da Silva, Daniel Saito, Edenilson Rabello, Ezio Nalin de Paulo, Fabiana de Souza Cannavan, Flávia Regina Capaldi, Jeanedy Pazinato, Juliana Camargo Martinati, Juliana Maraccini, Karla Nishiyama Marques, Karime Garcia, Leila Figueiredo, Luciana Chaves Ferreira, Ludmila Campos, Marina Dellias, Miriam Gonçalves de Chaves, Othon Silva Abrahão, Raphel Medau, Samanta Maria Gobbo Fedrizzi, Simoni Souza, Vanderlei Antonio Stefanuto, pela amizade, ótima convivência no ambiente de trabalho e pela ajuda imprescindível para conclusão deste trabalho.

A estudante de pós-graduação da FEA-UNICAMP Andreia Cristiane Souza Azevedo pelo companheirismo nas disciplinas cursadas.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização de mais esta conquista, os meus mais sinceros agradecimentos.

Isolamento e Identificação de Actinobactérias em Solos de Terra Preta Antropogênica (TPA) da Amazônia Central por ARDRA e Seqüenciamento do Gene 16S rRNA

RESUMO

As actinobactérias têm sido especialmente úteis na indústria farmacêutica por sua capacidade ilimitada de produzir metabólitos secundários com diversas estruturas químicas e atividades biológicas. A procura de novas espécies de actinobactérias constitui em um componente essencial para a descoberta de novas drogas farmacêuticas. As actinobactérias estão largamente distribuídos no solo, água e outros ambientes naturais. A Floresta Amazônica é bem conhecida pela sua rica biodiversidade e ainda pouco explorada, onde ocorrem sítios de Terra Preta Antropológica (TPA) que é considerada um dos solos mais férteis do mundo. Este solo possui origem antrópica e caracteriza-se por apresentar um horizonte A espesso, de cor escura e com elevados teores de fósforo, cálcio e alguns micronutrientes, como o manganês e o zinco além de altos teores de matéria orgânica. A TPA possui também maior atividade biológica que os solos adjacentes originais, onde não ocorreu ação antrópica. A característica mais importante da TPA é a sustentabilidade de sua fertilidade, formando microecossistemas próprios que não se esgotam rapidamente, mesmo nas condições tropicais a que estão expostos ou sob uso agrícola. A presença de material orgânico estável e a grande atividade biológica em TPA indicam que este tipo de solo pode ser um sítio de alta diversidade microbiana, constituindo-se em uma fonte de germoplasma microbiano. Este estudo teve como objetivo investigar a comunidade de actinobactérias presente em TPA, no município de Rio Preto da Eva – AM. Para tanto, utilizando-se meio específico para actinobactérias, foram isoladas 100 bactérias em três diferentes profundidades de TPA e em solo adjacente perfazendo um total de 600 microrganismos estudados,. Após o cultivo destas bactérias foi extraído o DNA genômico, que passou por reação de PCR e seus produtos foram submetidos à análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) para se conhecer o polimorfismo genético dos isolados e então procedeu-se o seqüenciamento do gene 16S rRNA das bactérias que apresentaram

perfis diferentes. Foi encontrada uma população de actinobactérias bem maior em TPA do que em solo adjacente confirmando a rica microbiota destes solos com altíssima fertilidade, porém outras bactérias não pertencentes à ordem Actinomycetales, também foram isoladas e identificadas que podem explicar em parte a fertilidade destes solos. Dentre os gêneros de actinobactérias encontrados com maior ocorrência foram as do gênero *Arthrobacter* seguido de *Streptomyces*, entretanto grande parte destas bactérias apresentou uma baixa identidade pela análise contra a base de dados do NCBI, o que pode indicar a descoberta de novas espécies que deverão ser estudas e possivelmente utilizadas em processos biotecnológicos.

Palavras chave: Actinobactéria, Terra Preta, Biodiversidade, Amazônia.

Isolation and Identification of Actinobacteria in Anthropogenic Dark Earth of Central Amazonia by ARDRA and Sequencing of 16S rRNA Gene

ABSTRACT

Actinomycetes have been especially useful in the pharmaceutical industry for their unlimited capacity to produce secondary metabolites with diverse chemical structures and biological activities. The search for novel species of actinomycetes constitutes an essential component for the discovery of new pharmaceutical drugs. Actinomycetes are widely distributed in soil, water and other natural environments. Amazon rainforest is well known for its rich biodiversity and still little explored, where Anthropogenic Dark Earths (ADE) occur which is considered the most fertile soil in the world. This soil has anthropic origin and is characterized for presenting a thickness A horizon and dark color with high proportions of phosphorus, calcium and some micronutrients, as manganese and zinc (Sombroek, 1966; Kern & Kämpf 1989) and also elevated levels of organic matter (Smith, 1980; Glaser et al., 2001). ADE also has higher biological activity than the original adjacent soil, where anthropic action did not occur. The most important characteristic in ADE is the sustainability of its fertility forming own micro ecosystems that do not exhaust quickly, even in tropical conditions, which they are exposed, or under agricultural use. The presence of stable organic matter and high biological activity in ADE indicate that this kind of soil may be an elevated microbiological diversity site consisting a microbial germplasm source.

This research had as objective to investigate the actinobactéria community present in ADE, in Rio Preto da Eva – AM city, 100 bacteria in three different depths of ADE and adjacent soils had been isolated with specific media for actinomycetes totalizing 600 studied microorganisms, After bacterial growth genomic DNA was extract that passed by PCR and Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) to recognize the bacterial genetic polymorphism and then proceeded the sequencing of 16S rRNA gene in bacteria with different profiles. It was founded a higher population of actinobacteria in ADE than adjacent soil indicating that there

are a greater species richness in this soil with high fertility, although other bacteria not from Actinomycetales order were isolated that may explain in part the high fertility of these soils. Among actinobacteria found *Arthrobacter* genus was the most found and after *Streptomyces*, although some bacteria showed low identity front NCBI database, what may indicate the discovery of new species of actinobacteria that must be studied and probably used in biotechnological process.

Key words: Actinobacteria, Dark Earth, Biodiversity, Amazonia.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
SUMÁRIO	xii
LI STA DE TABELAS.....	xv
LI STA DE FI GURAS	xviii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Terra Preta Antropogênica	4
2.2 Biodiversidade do Solo.....	6
2.3 Actinobactérias	8
2.3.1 Ocorrência de actinobactérias.....	9
2.3.2 Actinobactérias endofíticas	13
2.3.3 Aplicação Biotecnológica das Actinobactérias	14
2.4 Avaliação da Diversidade Microbiana	16
2.5 Métodos para o estudo da diversidade microbiana.....	17
3 OBJETIVOS	21
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Área de estudo: Localidade	22
4.2 Amostragem	24

4.3	Quantificação de actinobactérias	26
4.4	Isolamento das actinobactérias	26
4.5	Isolamento de DNA Genômico.....	27
4.6	Amplificação do Gene que Codifica para o 16S rRNA.....	28
4.7	Purificação do DNA	28
4.8	Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) ..	29
4.9	Seqüenciamento do Gene 16S rRNA.....	29
4.9.1	Análise filogenética das seqüências	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1	Isolados de bactérias.....	32
5.2	População microbiana em TPA	33
5.2.1	Profundidade de 0-10cm	34
5.2.2	Profundidade de 10-20cm	44
5.2.3	Profundidade de 20-40cm	51
5.3	População bacteriana em solo adjacente a TPA.....	61
5.3.1	Profundidade de 0-10cm	62
5.3.2	Profundidade de 10-20cm	70
5.3.3	Profundidade de 20-40cm	76
6	CONCLUSÕES	86
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores internos para amplificação do gene 16S rRNA.	30
Tabela 2. Análise de polimorfismo do DNA genômico, através de enzimas de restrição, nos isolados de bactérias de TPA na profundidade de 0-10cm.....	34
Tabela 3a. População de actinobactérias encontradas em TPA na profundidade de 0-10cm.....	37
Tabela 3b. População de bactérias encontradas em TPA na profundidade de 0-10cm.....	38
Tabela 4. Bactérias isoladas nas amostras de TPA na profundidade de 0-10cm com os números de espécies encontradas.....	43
Tabela 5. Análise de polimorfismo do DNA genômico, através de enzimas de restrição, nos isolados de bactérias de TPA na profundidade de 10-20cm.....	45
Tabela 6a. População de actinobactérias encontradas em TPA na profundidade de 10-20cm.....	48
Tabela 6b. População de bactérias encontradas em TPA na profundidade de 10-20cm.....	49

Tabela 7. Bactérias isoladas nas amostras de TPA na profundidade de 10-20cm com os números de espécies encontradas.....	50
Tabela 8. Análise de polimorfismo do DNA genômico, através de enzimas de restrição, nos isolados de bactérias de TPA na profundidade de 20-40cm.....	54
Tabela 9a. População de actinobactérias encontradas em TPA na profundidade de 20-40cm.....	55
Tabela 9b. População de bactérias encontradas em TPA na profundidade de 20-40cm.....	56
Tabela 10. Bactérias isoladas nas amostras de TPA na profundidade de 20-40cm com os números de espécies encontradas.....	57
Tabela 11. Análise de polimorfismo do DNA genômico, através de enzimas de restrição, nos isolados de bactérias de solo adjacente a TPA na profundidade de 0-10cm.....	62
Tabela 12a. População de actinobactérias encontradas em solo adjacente TPA na profundidade de 0-10cm.....	65
Tabela 12b. População de bactérias encontradas em solo adjacente a TPA na profundidade de 0-10cm.....	66
Tabela 13. Bactérias isoladas nas amostras de solos adjacentes a TPA na profundidade de 0-10cm com os números de espécies encontradas.....	68
Tabela 14. Análise de polimorfismo do DNA genômico, através de enzimas de restrição, nos isolados de bactérias de solo adjacente a TPA na profundidade de 10-20cm.....	70
Tabela 15a. População de actinobactérias encontradas em solo adjacente TPA na profundidade de 10-20cm.....	73

Tabela 15b. População de bactérias encontradas em solo adjacente a TPA na profundidade de 10-20cm.	74
Tabela 16. Bactérias isoladas nas amostras de solos adjacentes a TPA na profundidade de 10-20cm com os números de espécies encontradas.....	75
Tabela 17. Análise de polimorfismo do DNA genômico, através de enzimas de restrição, nos isolados de bactérias de solo adjacente a TPA na profundidade de 20-40cm.	76
Tabela 18a. População de actinobactérias encontradas em solo adjacente a TPA na profundidade de 20-40cm.....	79
Tabela 18b. População de bactérias encontradas em solo adjacente a TPA na profundidade de 20-40cm.	80
Tabela 19. Bactérias isoladas nas amostras de solos adjacentes a TPA na profundidade de 20-40cm com os números de espécies encontradas.....	81

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Organização do operon do rRNA ribossômico.....	18
Figura 2. Capacidade dos métodos baseados em DNA para diferenciar níveis taxonômicos.	20
Figura 3. Localização do município de Rio Preto da Eva – AM	23
Figura 4. Vista geral do sítio D. Francisca localizado em Rio Preto da Eva – AM.	23
Figura 5. Vista geral do sítio D. Francisca localizado em Rio Preto da Eva – AM.	24
Figura 6. Coleta de amostras de solo TPA no Rio Urubu – município Rio Preto da Eva.....	25
Figura 7. Ponto de coleta das amostras de TPA, no município de Rio Preto da Eva..	25
Figura 8. Ponto de coleta das amostras de TPA, no município de Rio Preto da Eva..	26
Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease <i>Msp</i> I após a amplificação do gene 16S rRNA nos isolados das amostras de TPA na profundidade de 0-10cm.....	35

Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease <i>Taq</i> I após a amplificação do gene 16S rRNA nos isolados das amostras de TPA na profundidade de 0-10cm.....	36
Figura 11. Número de actinobactérias encontradas em amostras de TPA na profundidade de 0-10cm incluindo as bactérias não pertencentes à ordem das <i>Actinomycetales</i>	44
Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease <i>Msp</i> I após a amplificação do gene 16S rRNA nos isolados das amostras de TPA na profundidade de 10-20cm.....	46
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease <i>Taq</i> I após a amplificação do gene 16S rRNA nos isolados das amostras de TPA na profundidade de 10-20cm	47
Figura 14. Número de actinobactérias encontradas em amostras de TPA na profundidade de 10-20cm incluindo as bactérias não pertencentes à ordem das <i>Actinomycetales</i>	51
Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease <i>Msp</i> I após a amplificação do gene 16S rRNA nos isolados das amostras de TPA na profundidade de 20-40cm.....	52
Figura 16. Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease <i>Taq</i> I após a amplificação do gene 16S rRNA nos isolados das amostras de TPA na profundidade de 20-40cm.....	53

Figura 17. Gráfico apresentando o número de actinobactérias encontradas em amostras de TPA na profundidade de 20-40cm incluindo-se as bactérias não pertencentes à ordem das <i>Actinomycetales</i>.	57
Figura 18a. Árvore filogenética baseada na seqüência do gene 16S rRNA de isolados de actinobactérias(com suas respectivas porcentagens de homologia pelo NCBI), <i>Bacillus</i> e <i>Burkholderia</i> encontrados em TPA na profundidade de 0-10cm, construída pelo método “Neighbour Joining”	58
Figura 18b. Árvore filogenética baseada na seqüência do gene 16S rRNA de isolados de actinobactérias(com suas respectivas porcentagens de homologia pelo NCBI), <i>Bacillus</i> e <i>Burkholderia</i> encontrados em TPA na profundidade de 10-20cm, construída pelo método “Neighbour Joining”	59
Figura 18c. Árvore filogenética baseada na seqüência do gene 16S rRNA de isolados de actinobactérias(com suas respectivas porcentagens de homologia pelo NCBI), <i>Bacillus</i> e <i>Burkholderia</i> encontrados em TPA na profundidade de 20-40cm, construída pelo método “Neighbour Joining”	60
Figura 19. Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease Msp I após a amplificação do gene 16S rRNA nos isolados das amostras de solo adjacente a TPA na profundidade de 0-10cm	63
Figura 20. Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease Taq I após a amplificação do gene 16S rRNA nos isolados das amostras de solo adjacente a TPA na profundidade de 0-10cm	64

Figura 21. Número de actinobactérias encontradas em amostras de amostras de solos adjacentes a TPA na profundidade de 0-10cm incluindo as bactérias não pertencentes à ordem das <i>Actinomycetales</i>	69
Figura 22. Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease Msp I após a amplificação do gene 16S rRNA nos isolados das amostras de solo adjacente a TPA na profundidade de 10-20cm.....	71
Figura 23. Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease Taq I após a amplificação do gene 16S rRNA nos isolados das amostras de solo adjacente a TPA na profundidade de 10-20cm.....	72
Figura 24. Número de actinobactérias encontradas em amostras de amostras de solos adjacentes a TPA na profundidade de 10-20cm incluindo as bactérias não pertencentes à ordem das <i>Actinomycetales</i>	75
Figura 25. Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease Msp I após a amplificação do gene 16S rRNA nos isolados das amostras de solo adjacente a TPA na profundidade de 20-40cm.....	77
Figura 26. Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease Taq I após a amplificação do gene 16S rRNA nos isolados das amostras de solo adjacente a TPA na profundidade de 20-40cm.....	78
Figura 27. Número de actinobactérias encontradas em amostras de amostras de solos adjacentes a TPA na profundidade de 20-40cm incluindo as bactérias não pertencentes à ordem das <i>Actinomycetales</i>	81

Figura 28a. Árvore filogenética baseada na seqüência do gene 16S rRNA de isolados de actinobactérias (com suas respectivas porcentagens de homologia pelo NCBI), *Bacillus* e *Burkholderia* encontrados em solo adjacente na profundidade de 0-10cm, construída pelo método “Neighbour Joining”.82

Figura 28b. Árvore filogenética baseada na seqüência do gene 16S rRNA de isolados de actinobactérias (com suas respectivas porcentagens de homologia pelo NCBI), *Bacillus* e *Burkholderia* encontrados em solo adjacente na profundidade de 10-20cm, construída pelo método “Neighbour Joining”.83

Figura 28c. Árvore filogenética baseada na seqüência do gene 16S rRNA de isolados de actinobactérias (com suas respectivas porcentagens de homologia pelo NCBI), *Bacillus* e *Burkholderia* encontrados em solo adjacente na profundidade de 20-40cm, construída pelo método “Neighbour Joining”.84

Figura 29. Árvore filogenética baseada na seqüência do gene 16S rRNA de isolados de actinobactérias (com sua respectiva porcentagem de homologia pelo NCBI), *Bacillus* e *Burkholderia* encontrados em TPA e solo adjacente construída pelo método “Neighbour Joining”..85

1 INTRODUÇÃO

As actinobactérias têm sido especialmente úteis na indústria farmacêutica por sua capacidade ilimitada de produzir metabólitos secundários com diversas estruturas químicas e atividades biológicas. Dezenas de milhares destes componentes têm sido isolados e caracterizados, muitos dos quais têm sido utilizados para produção de drogas para tratamento de uma vasta gama de doenças humanas (Bull, et al., 1992; Franco & Coutinho, 1991). A procura de novas espécies de actinobactérias constitui em um componente essencial para a descoberta de novas drogas farmacêuticas.

As actinobactérias estão largamente distribuídas no solo, água e outros ambientes naturais. Entretanto, a população e os tipos de actinobactérias em um ecossistema estão determinados por numerosos fatores físicos, químicos e biológicos. A identificação de novos sítios ecológicos é, portanto crucial para a descoberta de novas espécies de actinobactérias. A Floresta Amazônica é bem conhecida pela sua rica biodiversidade e ainda pouco explorada.

A Amazônia, localizada no norte da América do Sul, é cortada pela linha do Equador, tem clima quente e úmido no ano todo, possui fauna e flora ricas em biodiversidade que ainda não foram completamente catalogadas, quanto a sua biodiversidade microbiológica tem-se informação ainda menor.

A Terra Preta Antropogênica (TPA) - também chamada de Terra Preta de Índio ou simplesmente Terra Preta - tem essa denominação porque é encontrada em sítios arqueológicos, onde viveram grupos pré-históricos. Por isso, há grande quantidade de material deixado por esses grupos indígenas como fragmentos cerâmicos, carvão e artefatos líticos (de pedra). Normalmente, o material arqueológico é bem diversificado, o que leva a crer que grupos culturais distintos habitaram um mesmo local. As áreas com Terra Preta Antropogênica são encontradas sobre os mais diversos tipos de solos e normalmente se localizam em terra firme, próximas às margens de rios, em locais bem drenados. A TPA pode ser identificada por sua cor escura, resultado da concentração de substâncias orgânicas depositadas no solo que apresentam altos teores de cálcio, carbono, magnésio, manganês, fósforo e zinco, elementos que tornam a terra fértil. As áreas de terra preta são consideradas pequenas, medem de 2 a 3 hectares. A camada de TPA, possui em média 40 a 60 cm, mas pode atingir até 2 m de profundidade. Apesar da grande quantidade de sítios arqueológicos já conhecidos, não se tem um mapeamento de todas as ocorrências de TPA na Amazônia. A estimativa é que ocorram centenas de sítios espalhados pela região. Por exemplo, somente em Caxiuanã - Pará (Amazônia Oriental), foram descobertos 28 sítios arqueológicos com terra preta (<http://www.museu-goeldi.br>).

Recentemente, pesquisadores que investigam as TPAs reuniram um tratado em um livro (Lehmann et al. 2003), descrevendo desde a origem, a formação e conservação desses solos. As TPAs ocorrem somente em sítios arqueológicos na região amazônica, tem origem antrópica e foram enriquecidos com nutrientes, ao passar dos séculos, provavelmente pelo manejo de restos orgânicos e do fogo pelas populações pré-colombianas. É estimado um tempo de 10 anos para que se forme apenas 1 cm de TPA. As TPAs mostram tipicamente uma cor escura, elevados teores de fósforo, cálcio e alguns micronutrientes, como o manganês e o zinco (Sombroek, 1966; Kern & Kämpf 1989). Apresentam também teores de matéria orgânica estável superiores aos solos adjacentes (Smith, 1980; McCann et al., 2001; Glaser et al., 2001). É questionável se essa estabilidade é o resultado das características mineralógicas desses solos orgânicos, ou é devida à existência de carbono orgânico, já que a quantidade de carvão vegetal é o maior diferencial entre a TPA e os solos

adjacentes a TPA, onde ocorre a rápida decomposição da matéria orgânica, devido às altas temperaturas, elevados índices de precipitações e deficiência em minerais estáveis (Glaser et al., 2001). A TPA possui também maior atividade biológica do que em solos adjacentes originais, onde não houve modificação por povos pré-colombianos (Kern & Kämpf 1989). Os microrganismos do solo também são fundamentais para a fertilidade do solo e em TPA esta fertilidade tem altíssimos níveis, uma vez que a biodiversidade e atividade biológica estão relacionadas a funções e características essenciais para a manutenção da capacidade produtiva dos solos.

Material orgânico estável encontrado e a grande atividade biológica nas TPAs podem indicar um tipo de solo com alta diversidade de microrganismos, o que constitui em uma fonte de germoplasma microbiano. Entretanto, ainda não se tem conhecimento da microbiota e sobretudo da diversidade das comunidades e estrutura microbiana presentes em TPA. O conhecimento desta biodiversidade poderá melhorar o entendimento das funções destas comunidades microbianas, além de se conhecer as interações com outros componentes desta diversidade biológica. E isso proporcionará benefícios econômicos e estratégicos, como a descoberta de microrganismos potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos.

A elaboração de uma prospecção da microbiota e as funções dos microrganismos nos solos de TPA é de grande importância para o conhecimento da extensão da diversidade destes sítios com biomas exclusivos. Com base nisso, esta pesquisa tem o objetivo de identificar a comunidade de actinobactérias presentes na TPA, do município de Rio Preto da Eva - AM, por uma combinação de técnicas moleculares, de cultura e quantificação da atividade microbiana. A região estudada tem sido considerada de preservação permanente quanto à exploração econômica dos recursos naturais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Terra Preta Antropogênica

Terra Preta Antropogênica (TPA), Terra Preta de Índio ou Terra Preta são solos com coloração escura e com a presença de material arqueológico (fragmentos cerâmicos, carvão e artefatos líticos). Esses solos são ricos em cálcio, carbono, magnésio, manganês, fósforo e zinco, o que os caracterizam como solos bastante férteis (Kern & Kampf, 1989).

Por sua fertilidade, são procurados pelas populações ribeirinhas para o cultivo da agricultura de subsistência como mandioca, banana, milho, mamão, etc.

As áreas com TPAs são encontradas na região amazônica, sobre os mais diversos tipos de solos tais como: Latossolo, Podzol, Podzólico, Terra Roxa Estruturada e Plintossolos Pétricos (Smith, 1980; Kern, 1988).

O horizonte A antrópico, que corresponde à camada de TPA, possui em média 40 a 50 cm e excepcionalmente pode atingir até 2 m de profundidade (Hartt, 1885). Estes solos ocorrem em manchas redondas isoladas (Falesi, 1972) de diferentes dimensões. As áreas de Terra Preta são consideradas pequenas, com cerca de 2 a 3 hectares (Smith, 1980), mas são encontradas ocasionalmente em áreas maiores, como no caso da Estação Científica Ferreira Penna, Floresta Nacional de Caxiuanã

(PA), onde se pode encontrar terras pretas numa extensão com mais de 100 ha. Apesar da grande quantidade de sítios arqueológicos já conhecidos, não se tem um mapeamento de todas as ocorrências de TPA na Amazônia. A estimativa é que ocorram centenas de sítios espalhados pela região, podendo cobrir aproximadamente 10% da bacia Amazônica (<http://www.museu-goeldi.com.br>).

Existem várias hipóteses quanto à formação das TPAs. Uma delas é que atribui a origem aos eventos geológicos, como cinzas vulcânicas, decomposição de rochas vulcânicas ou a partir de sedimentos depositados em fundos de lagos extintos (Falesi, 1972); uma outra hipótese refere-se à formação das TPAs em função da incorporação intencional de nutrientes ao solo (*plaggen epipedon*) através de práticas de manejo como queimadas. Entretanto, a hipótese mais aceita relata que as TPAs teriam sido formadas não intencionalmente pelo homem pré-histórico (Woods & McCann, 2001). Segundo Smith (1980) a existência de TPAs em grande número na bacia Amazônica fornece forte evidência que as populações indígenas (Ameríndios), antes da colonização européia, eram grandes e assentadas, particularmente ao longo dos rios. Alguns estudos estimaram o número de índios no final do século XV, da ordem de 6,8 milhões (Denevan, 1976) ou mais (Smith, 1980). Nestes assentamentos acumularam-se resíduos de origem vegetal (folhas e talos de palmeiras diversas, cascas de mandioca e sementes) e de origem animal (ossos, sangue, gordura, fezes, carapaças de quelônios e conchas), além de uma grande quantidade de cinzas e resíduos de fogueiras (carvão vegetal). Como resultado dos resíduos orgânicos acumulados nestes assentamentos formou-se um material orgânico estável com microecossistemas próprios, que se auto-sustentam e não conseguem se decompor, por isso não se exaurem facilmente.

A camada de TPA possui em média 40 a 60 cm, alcançando ocasionalmente até 2 m de profundidade (Smith, 1980). Estes solos apresentam coloração escura, altos teores de substâncias húmicas, e visível distribuição de fragmentos de cerâmica e artefatos líticos (Hiraoka et al., 2003). São encontradas sobre os mais diferentes tipos de solos, como latossolos, podzóis, podzólicos e terra roxa estruturada (Smith, 1980; Kern, 1988; Kern & Kampf, 1989).

As TPAs apresentam alta fertilidade no horizonte A antrópico (Au), especialmente quando comparadas aos solos circunvizinhos altamente intemperizados e de baixa fertilidade. Os solos com TPA possuem teores significativamente mais elevados de cálcio, magnésio, fósforo assimilável, zinco, manganês, cobre, bem como capacidade de troca catiônica, saturação de bases (Valor S), em relação às áreas adjacentes que não possuem o horizonte A antrópico. A saturação por alumínio (Al^{3+}) e ferro (Fe^0) é baixa e o pH do solo é mais favorável do que em solos adjacentes (Kern & Kampf, 1989). No horizonte B, embora o nível de nutrientes seja inferior em relação ao horizonte A antrópico, é superior aos solos dominantes na região Amazônica (Hiraoka et al., 2003). A concentração do carbono orgânico nos horizontes superficiais, e em alguns casos em maiores profundidades, nas TPAs é em geral, maior do que em solos circunvizinhos.

2.2 Biodiversidade do Solo

A biodiversidade e a atividade biológica estão relacionadas a funções e características essenciais para a manutenção da capacidade produtiva dos solos. Os microrganismos são responsáveis por diversas atividades essenciais para o funcionamento dos ecossistemas, como a fragmentação e decomposição da matéria orgânica, a disponibilização de nutrientes do solo, a agregação das partículas do solo, entre outras (Moreira & Siqueira, 2002).

A floresta tropical amazônica é caracterizada pela elevada diversidade biológica sob regime de precipitação e temperatura elevadas e, sustenta mais de 230 espécies lenhosas por hectare, além das epífitas e outras espécies de porte pequeno. Esta diversidade vegetal se traduz em uma grande diversidade animal, principalmente insetos (Erwin, 1997), devido ao grande número de nichos existentes. Também é de se esperar que a diversidade de organismos do solo seja afetada por esta alta diversidade vegetal. Bactérias e Archaeas do solo são particularmente importantes no entendimento adequado de sua ampla capacidade degradativa e vasta diversidade metabólica (Thies & Suzuki, 2003).

Os solos de TPA podem exibir considerável heterogeneidade espacial e temporal na distribuição de populações microbianas (Thies & Suzuki, 2003). Nos ecossistemas amazônicos, durante a época seca, os microrganismos (principalmente fungos e bactérias) atuam em grande número na liteira em decomposição sobre o solo a fim de garantir a incorporação dos elementos minerais no perfil do solo. Rizóbios, fungos micorrízicos e solubilizadores de fosfato são outros microrganismos do solo que têm indicado sua importância nos ecossistemas de terra firme, inclusive com aumentos significativos no desenvolvimento das plantas (Farias & Oliveira, 1994).

Tsai et al. (2003) avaliaram a diversidade bacteriana em TPA com base no seqüenciamento do gene 16S rRNA. Além de uma alta diversidade bacteriana, os autores encontraram alta ocorrência de clones homólogos a bactérias não cultivadas. Esta constatação sinaliza a necessidade de estudos nesses ambientes, que podem ser pontos ricos de diversidade microbiana pouco conhecido.

A presença de material orgânico estável, proveniente de resíduos de alimentos, e a grande atividade biológica em TPA indicam que este tipo de solo pode ser um sítio de alta diversidade microbiana, constituindo-se numa fonte de germoplasma microbiano (Tsai et al., 2003). Ainda não há informação detalhada e organizada sobre esta biodiversidade, assim como estudos sobre o efeito de manejo de TPAs na sua biodiversidade e, que caracterize a função específica da biodiversidade de TPAs no desenvolvimento da sua fertilidade sustentável. As estruturas biológicas e suas funções são afetadas pelas alterações e perturbações ambientais, que induzem de um modo geral, a mudanças nas propriedades do solo (Ovreas et al., 1998; Di Giovanni et al., 1999).

A caracterização biológica de um solo do tipo TPA através da determinação da estrutura populacional das suas comunidades microbianas contribuirá para a elucidação da origem e formação da TPA, e para a compreensão do impacto sofrido nas populações desses solos, das alterações ao longo dos anos e da sustentabilidade dos sistemas produtivos nesses ambientes. Determinações da biomassa microbiana (Parkinson & Paul, 1982), taxas de respiração do solo

(Heinemeier et al., 1989) e taxas de transformação de nutrientes (Harrison et al., 1990) são usadas para obter informações mais detalhadas nas atividades microbianas envolvidas nos processos ecológicos fundamentais no solo.

2.3 Actinobactérias

Entre as bactérias, a ordem *Actinomycetales* é a única fonte de compostos bioativos comercialmente importante. Nas últimas décadas, mais de 6.000 antibióticos foram descobertos, e destes, 65% são produzidos pelo gênero *Streptomyces*. Além dos antibióticos de uso clínico, veterinário e agroquímico, outros metabólitos secundários – enzimas, imunomoduladores, inibidores de enzimas – são produzidos também por *Streptomyces*. A busca de outros metabólitos bioativos requer a descoberta de novos microrganismos, abundantes nos diversos ecossistemas provindos da exploração de diferentes nichos ecológicos por meio de condições seletivas de isolamento.

As actinobactérias compreendem um grupo heterogêneo de bactérias filamentosas, que filogeneticamente pertencem ao ramo das bactérias Gram-positivas com alto teor de G+C. Neste grupo estão incluídos gêneros com diferentes características morfológicas, como: *Micrococcus*, *Arthrobacter* e *Corynebacterium*, que podem se reproduzir por fissão binária; *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, denominadas actinobactérias nocardioformes, apresentam micélio substratal rudimentar seguido de fragmentação. No outro extremo, está o grupo esporoactinomicetos, que engloba *Streptomyces*, *Actinoplanes*, *Microbispora*, e exibe uma rede de micélio aéreo bem desenvolvida, diferenciada em estruturas especializadas como artrosporos em cadeia observados em *Streptomyces*, esporos em vesículas como em *Actinoplanes* e *Streptosporangium* e endósporos em *Thermoactinomyces* (Chater & Hopwood, 1993; Cross, 1989; Lechevalier & Lechevalier, 1981).

Em geral, as actinobactérias desenvolvem-se lentamente, o que torna difícil seu isolamento; em relação aos seus competidores. A sua velocidade de

crescimento radial sobre meio sólido inferior ao de fungos, e sua velocidade de produção de células geralmente é mais lenta do que a das demais bactérias. Um ciclo de divisão celular em actinobactérias pode levar de 2 a 3 dias para se completar, enquanto que em *Escherichia coli* é de 20 minutos (Lechevalier & Lechevalier, 1981). Por causa deste crescimento lento, as actinobactérias foram negligenciados, mas atualmente os esporaactinomicetos e nocardioformes têm atraído a atenção de biotecnologistas e ecologistas por serem, reconhecidamente, os principais produtores de compostos bioativos de alto valor comercial, bem como devido ao seu importante papel na reciclagem de nutrientes do solo.

2.3.1 Ocorrência de Actinobactérias

As actinobactérias saprofíticas colonizam substratos sólidos e podem se espalhar na atmosfera por meio de esporos hidrofóbicos ou de esporângios resistentes à dessecação, ocorrendo principalmente em condições estritamente aeróbias, em pH neutro a alcalino. Muitas actinobactérias do solo comportam-se como neutrófilos em cultivo de laboratório, podendo crescer em pH de 5,0 a 9,0. Em solos ácidos, o pH é um fator que limita a distribuição e a atividade das actinobactérias. Esporaactinomicetos acidófilos crescem bem em pH 3,5 a 5,5, sendo observada sua ocorrência em solos ácidos (Khan & William, 1975; Hagedorn, 1976; Coelho & Drozdowicz, 1978). Um dos problemas para o estudo de microrganismos acidófilos é o uso de meio com ágar que não permanece sólido em condições de baixa acidez (Iwai & Takahashi, 1992), mas o uso de tampão fosfato ácido ao meio contorna esta dificuldade (Williams et al., 1971). A ocorrência de actinobactérias saprofíticas nos diferentes ecossistemas decorre da sua diversidade metabólica e da evolução de mecanismos específicos de dispersão. Esta diversidade metabólica mostra a grande adaptabilidade destes microrganismos em colonizar ambientes extremos, salinos e ácidos e de elevada temperatura.

O gênero *Streptomyces* é amplamente distribuído na natureza, e seu nicho primário é o solo. Porém, ele pode também ocorrer em diferentes ambientes aquáticos, como pântanos e folhagens em decomposição. No solo, a população de

Streptomyces usualmente atinge 10^4 a 10^7 UFC/g de solo seco, ocorrendo principalmente na forma de esporos, mas também pode ser encontrada na forma de hifa vegetativa. Segundo Iwai & Takahashi (1992), 80 % das actinobactérias do solo ocorrem na camada mais superficial do solo (0-10 cm), diminuindo progressivamente com a profundidade. Estas bactérias filamentosas ocupam um importante papel na biodegradação de polímeros como lignina, quitina e amido (Crawford, 1988; Nolan & Cross, 1988), além de produzirem importantes metabólitos secundários de interesse comercial (Lancini & Lorenzetti, 1993).

Embora este dado seja questionado, inúmeras investigações mostram que os esporoactinomicetos e actinobactérias nocardioformes podem ser isolados de ambientes aquáticos como mar, rios, lagos, pântanos (Okami & Okazaki, 1972; Al Diwany et al., 1978; Barcina et al., 1987; Takizawa et al., 1993; Jiang & Xu, 1996; Hatano, 1997). O gênero *Micromonospora* tem sido isolado muito freqüentemente de solos úmidos na proporção de 10^4 a 10^5 UFC/g de solo, mas também pode ocorrer em lagos e água corrente. O estudo da população de actinobactérias em amostras de água de 15 lagos da região de Wisconsin revelou que 10 a 20% da população bacteriana total isolada pertencia ao gênero *Micromonospora* (Cross, 1989). Entretanto, o fato de as actinobactérias serem muito adaptados para o crescimento em substratos sólidos, porém com ocorrência em ambientes aquáticos, revelaria a situação de "lavagem" do solo, uma vez que a diversidade taxonômica de actinobactérias do solo é a mesma do meio aquático. Vários estudos mostram que, em ambientes aquáticos marinhos de maior profundidade, o grupo *Actinoplanes* predomina e requer água do mar para seu isolamento, indicando que estas actinobactérias fazem parte da comunidade microbiana autóctone marinha (Jensen et al., 1991). Actinobactérias nocardioformes também ocorrem em ambientes aquáticos, como o *Rhodococcus marinonascens*, descrito como uma espécie nova por Helmke & Weyland (1984), mostrando a grande diversidade microbiológica desse ecossistema.

Outro nocardioforme conhecido como coprofílico, que ocorre em esterco animal, é o *Rhodococcus coprophilus*. A presença desta actinobactéria em rios e lagos é utilizada como indicador da contaminação fecal por animais herbívoros

(Rowbotham & Cross, 1977; Mara & Oragui, 1981). Estudos ecológicos mostram que esta actinobactéria sobrevive à passagem através do rúmen e intestinos de ruminantes atingindo as fezes, onde ocorre o crescimento. A proporção de *R. coprophilus* para actinobactérias totais em fezes de bovinos, carneiros e patos é bem maior do que nas fezes de suínos e eqüinos (Mara & Oragui, 1981).

As condições ideais de pH, umidade e aerobiose da compostagem, forragem animal (grãos de cereais, feno) e do bagaço de cana, associados ao alto conteúdo de nutriente orgânico e de auto-aquecimento, favorecem a predominância de actinobactérias termofílicas. Neste habitat com temperatura elevada (50-55°C), a diversidade microbiana é baixa, predominando os gêneros *Saccharomonospora* no bagaço de cana e *Thermomonospora* em compostagem do cultivo comercial de cogumelos (McCarty & Cross, 1981; Amner et al., 1989). As actinobactérias termofílicas destacam-se como degradadoras primárias da biomassa vegetal, que é a principal fonte de carbono no ambiente terrestre, composta principalmente de lignina e celulose (McCarthy & Williams, 1992).

A grande diversidade microbiana, e em particular a população de actinobactérias que ocorre em habitats naturais, muitas vezes pode ser alterada pela atividade do homem que, inadvertidamente, introduz no solo substâncias químicas (fungicidas, inseticidas, herbicidas) ou não (lodo ativado) que podem ocasionar a predominância de determinados grupos de actinobactérias no solo, como *Nocardiosis* sp., isolado de solo tratado com clordane ou a predominância de *Nocardia* e *Micromonospora* em solo enriquecido com lodo ativado (Orchard, 1980; Percich & Loockwood, 1978).

Em ambientes poluídos por petróleo é comum o isolamento de *Nocardia* sp. e *Rodhococcus* sp., mostrando que este grupo tem um importante papel na degradação de hidrocarbonetos (Goodfelloow & Williams, 1983; Sorkhoh et al., 1966).

Neste amplo grupo de bactérias filamentosas existem algumas formas patogênicas ao homem, como *Mycobacterium leprae* e *Corynebacterium*

diphytheriae, *Nocardia* sp., *Actinomyces* sp., ou fitopatogênicas à batata, como *Streptomyces scabies* (Lechevalier, 1988).

As actinobactérias podem ocorrer também na rizosfera e no rizoplane de muitas plantas, sendo o gênero *Frankia* a primeira actinobactéria endofítica simbiótica isolada de plantas não-leguminosas como *Alnus*, *Casuarina* e *Myrica*. Essa associação, conhecida como actinorrízica, ocorre em 24 gêneros e 194 espécies de plantas de regiões do trópico e sub-trópico, onde o clima comumente é muito frio. A simbiose dessa actinobactéria com plantas não-leguminosas é de grande importância no balanço mundial do nitrogênio. A presença de *Frankia* como fixador de nitrogênio nos nódulos das raízes dessas plantas foi acompanhada durante muito tempo por microscopia e, apenas em 1978, Callaham e colaboradores conseguiram isolar esta actinobactéria, utilizando diferentes meios seletivos de isolamento, temperatura de cultivo de 25-37°C e longo tempo de incubação (4 a 8 semanas) (Quispel et al., 1983; Callaham et al., 1978).

A ocorrência de microrganismos endofíticos em tecidos vegetais de plantas sem sintomas de doenças vem sendo constatada pela utilização de técnicas comumente utilizadas na fitopatologia e que não são utilizadas na ecologia microbiana. A literatura sobre fungos e bactérias endofíticas é bem ampla, enquanto que para actinobactérias endofíticas não-simbióticas existem poucas investigações.

Sardi et al. (1992) foram os primeiros a relatarem o isolamento, na Itália, de 499 actinobactérias endofíticas de raízes de 28 diferentes espécies vegetais. As actinobactérias foram isoladas de raízes esterilizadas e pertencem, em sua maioria, ao gênero *Streptomyces*, seguido de *Streptosporangium*, *Nocardia* e *Micromonospora*.

Em 1996, na China, Liu & Tang isolaram 17 *Streptomyces* endofíticos de raízes esterilizadas de algodão (*Gossypium* spp.), dos quais 58% apresentavam atividade antagonística para *Rhizoctonia solani*.

2.3.2 Actinobactérias Endofíticas

Microrganismos endofíticos referem-se a microrganismos que colonizam o interior da planta em algum tempo do seu ciclo de vida (Reiter et al., 2002). A comunidade endofítica é constituída principalmente por bactérias ou fungos, e ao contrário dos patogênicos, não causam danos aos seus hospedeiros (Azevedo, 1998).

A entrada de microrganismos endofíticos na planta pode ocorrer pelos estômatos, hidatódios, ferimentos, áreas de emergência laterais das raízes e por produção de enzimas hidrolíticas capazes de degradar a parede celular dos vegetais. Após sua entrada na planta, estes microrganismos podem atingir diversos órgãos e tecidos (Shishido et al., 1999; Azevedo, 1998) e esta penetração pode ser influenciada por interações com outros microrganismos associados à planta (Hirano & Hupper, 2000).

As bactérias endofíticas têm sido isoladas de raiz, caule, folhas e frutos de uma grande variedade de plantas, sendo algumas de interesse agrícola como: cana-de-açúcar (Cavalcante & Döbereiner, 1988), milho (McInroy & Kloepper, 1995), batata (Reiter et al., 2002) citros (Araújo et al., 2001), trigo e sorgo (Zinniel et al., 2002).

Estudos realizados com microrganismos endofíticos têm evidenciado que estes possuem a capacidade de modificar fisiologicamente o hospedeiro protegendo-o assim contra ataque de insetos patógenos, atuando no aumento de resistência sistêmica adquirida – SAR (van Wees et al., 1999), na produção de sideróforos, como quelantes de ferro e outros metais que contribuem para a supressão da doença (Leong, 1986) e na produção de antibióticos, que são importantes nos mecanismos de controle dos fitopatógenos (Blumer & Hass, 2002).

Ecologicamente, actinobactérias e, particularmente, *Streptomyces* ssp. são geralmente saprofíticos, presentes no solo e passam a maior parte de seu ciclo de vida na forma de esporos. As actinobactérias também demonstraram ser importantes na rizosfera e seu antagonismo a fungos fitopatógenos, já foi relatado.

Algumas bactérias também são conhecidas por habitar tecidos de plantas sadias. Por técnicas, independentes de cultivo, baseadas no gene 16S rDNA, foram encontradas actinobactérias em raízes de cevada e pedúnculos de batatas. As actinobactérias encontrados em tecidos vegetais sadios, sem causar sintomas de doenças foram definidos como actinobactérias endofíticas (Benson & Silvester, 1993; Cao et al., 2005). O primeiro microrganismo estudado foi o do gênero *Frankia*, isolado de plantas não leguminosas. Outras actinobactérias endofíticas como, *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Microbispora* e *Streptosporangium*, foram isolados de raízes com a superfície esterilizada de diferentes espécies de plantas na Itália e de milho no Brasil (Araújo et al., 2001). O uso de actinobactérias endofíticas como agentes de controle biológico, no combate de doenças nas raízes, é de interesse por sua habilidade de colonizar tecidos de plantas sadias e produzir antibióticos "in situ". Na verdade, as actinobactérias isoladas de raízes de trigo têm mostrado ser hábeis em reduzir o impacto da doença "take all" no trigo, na ordem de 70% em trigo cultivado em estufas, utilizando-se solos naturalmente infestados.

2.3.3 Aplicação Biotecnológica das Actinobactérias

A frequência de infecções fúngicas tem crescido de forma dramática nas últimas duas décadas, incluindo o aumento do número de pacientes imunodepressivos, tal como pessoas sofrendo de câncer, infectadas com o vírus da imunodeficiência (HIV) ou tendo sofrido uma cirurgia de transplante de órgãos. No mais, formas de procedimentos muito invasivos, como a quimioterapia e a diálise do sangue e o uso excessivo de antibióticos de amplo espectro constituem em um outro fator que predispõe o desenvolvimento de uma micose profunda. A emergência de novos agentes patógenos aos fungos e o desenvolvimento de resistência são fatores igualmente importantes (Boudemagh et al., 2005). A situação é similar na terapia animal e na agricultura e está aumentando onde doenças fúngicas estão devastando plantações e rebanhos, particularmente em países em desenvolvimento, onde não existem antifúngicos eficientes e fungicidas

não tóxicos, não poluentes e se possível biodegradáveis. Hoje em dia há uma grande necessidade em se obter compostos ativos contra fungos e de baixa toxicidade para os humanos e animais para serem utilizados nas indústrias alimentícias, têxteis, de madeira e de couro. Apesar da descoberta de numerosas substâncias antifúngicas sintéticas, como a Caspofungina e Terbinafina, que são eficientes, mas também de alto valor, todos os melhores agentes de antifúngicos são produtos de fermentação.

As actinobactérias representam a maior fonte de metabólitos secundários com atividade anticelular. O gênero *Streptomyces* constitui em 50% da população de actinobactérias do solo e produz 75% das moléculas com atividade antibiótica. Esta actinobactéria constitui em uma fonte importante, e pouco explorada, de novos metabólitos secundários com atividades antibacterianas e antifúngicas e o seu isolamento seletivo pode levar ao descobrimento de novas substâncias. As actinobactérias fazem parte de um importante grupo da microflora do solo. São os maiores decompositores de polímeros complexos como a lignocelulose e a quitina, e podem inibir o crescimento ou ocasionar a lise de fungos do solo. As actinobactérias têm vários graus de atividade inibitória contra fungos específicos e geralmente reduzem as populações fúngicas do solo. Muitos estudos têm focado as actinobactérias do solo em geral, mas o gênero *Streptomyces* é o mais freqüentemente isolado. Muitos destes mostraram ser hábeis em provocar a lise ou inibir o desenvolvimento de fungos no solo. Esta habilidade pode estar relacionada a produção de quitanase que quando excretada de um *Streptomyces* mostrou ser capaz de provocar a lise de hifas de alguns patógenos de plantas (Zaitlin et al., 2004).

As actinobactérias podem também ter papel na colonização e formação de micorrizas e algumas actinobactérias parecem ser hiperparasitas de fungos, esporos de fungos e esclerosa fúngica (Crawford et al., 1993). Algumas actinobactérias também mostraram ser hábeis em produzir compostos com atividade herbicida e inseticida (De Frank & Putnam, 1985; Hayashi et al., 1991).

As actinobactérias são úteis especialmente para a indústria farmacêutica por uma aparente capacidade ilimitada de produzir metabólitos secundários com diversas estruturas químicas e atividades biológicas. Dezenas de milhares de tais compostos são isolados e caracterizados e muitos dos quais são utilizados como drogas contra uma vasta gama de doenças humanas. A busca de novas actinobactérias consiste em um componente essencial na descoberta de novos medicamentos (Wang et al., 1999).

As actinobactérias estão amplamente distribuídos no solo, água e outros habitats naturais, entretanto, a população e os tipos de actinobactérias em um ecossistema são determinados por numerosos fatores físicos, químicos e biológicos. A identificação de novos sistemas ecológicos é crucial para a descoberta de novas actinobactérias. A região Amazônica é bem reconhecida por sua floresta tropical rica em espécies o que representa "hot spots" com alta biodiversidade.

2.4 Avaliação da Diversidade Microbiana

A falta de conhecimento sobre a diversidade microbiana em amostras ambientais deve-se em grande parte aos métodos tradicionalmente utilizados para o isolamento e cultivo de microrganismos em laboratório (Ranjard et al., 2000), uma vez que apenas uma pequena fração dos organismos na natureza (ao redor de 0,1% ou no máximo 10% do total da população), é cultivável pelo uso de técnicas microbiológicas de rotina (Torsvik et al., 1990; Amann et al., 1995).

Métodos mais detalhados desenvolvidos recentemente (como por exemplo, análises de DNA, perfis de ácidos graxos fosfolipídicos, uso de BIOLOG) têm permitido uma investigação mais detalhada dos parâmetros biológicos do solo (Tiedje et al., 1999; Tiedje, 2000; Widmer et al., 2001). Contudo, populações detectadas por métodos moleculares como bibliotecas de clones e fingerprinting de DNA podem não corresponder às populações responsáveis por importantes processos biogeoquímicos "in situ", especialmente quando estas populações constituem menos que 1% da comunidade total. As populações de microrganismos

do solo responsáveis pela oxidação do carbono pirogênico fazem parte deste grupo, muito embora o uso de primers de PCR específicos possa facilitar sua detecção. Métodos polifásicos, que empreguem uma combinação de técnicas moleculares, de cultura e quantificação da atividade microbiana, provavelmente produzam uma maior compreensão do entendimento da função da biologia do solo na geração e manutenção da TPA (Thies & Suzuki, 2003).

Florestas nativas, com específicas comunidades de vegetais também selecionam específicos microrganismos com específicos requisitos ambientais. Diferentes tipos de florestas nativas seriam então associadas a comunidades microbianas características daquele solo. As informações sobre a composição da comunidade microbiana em solos de florestas nativas não degradadas poderiam então ser utilizadas para facilitar a interpretação dos dados da comunidade, derivados de medidas de manejo ou florestas degradadas e/ou devastadas (Hackl et al., 2005).

2.5 Métodos para o estudo da diversidade microbiana

Os microrganismos apresentam grande diversidade genética e desempenham funções cruciais na manutenção de ecossistemas (Myers, 1996). Apesar de sua grande importância apenas uma pequena fração da diversidade é conhecida (Pace, 1997).

A variação genética é requisito para a evolução biológica, e essa diversidade é mantida através da interação entre uma variedade de fatores ecológicos (competição) e fatores genéticos (mutação e recombinação) (Spiers et al., 2000).

Mapas de diversidade genética fornecem uma ferramenta importante para a compreensão da taxonomia, estrutura populacional e dinâmica das bactérias, sendo importantes na resolução de métodos rápidos, específicos e sensíveis.

Na natureza apenas uma pequena fração dos microrganismos é cultivável por meio do emprego de métodos microbiológicos convencionais (Amann et al., 1995).

Com a evolução das metodologias da biologia molecular, métodos baseados na análise das proteínas e principalmente dos ácidos nucleicos têm sido utilizados para a caracterização bacteriana (Palleroni, 1993). Estas técnicas possuem diferentes níveis de resolução para detectar a variabilidade entre as linhagens (Figura 1).

Em meados da década de 80, Kary Mullis (1990) descobriu a técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR) e desde sua concepção esta técnica causou uma verdadeira revolução na biologia tanto na pesquisa visando o entendimento de processos biológicos fundamentais; como nas áreas aplicadas envolvendo diagnósticos e melhoramento genético de plantas (Mullis & Fallona, 1987; Ferreira & Grattapaglia, 1995).

A técnica de PCR é fácil, rápida e versátil, que envolve a síntese enzimática “in vitro” de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase (Mullis, 1990).

Dentre as técnicas baseadas em ácidos nucleicos mais utilizadas estão: a) seqüências das subunidades do rRNA; b) RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA); c) ARDRA (Amplified Ribossomal DNA Restriction Analysis); d) DGGE (Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis); e) AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).

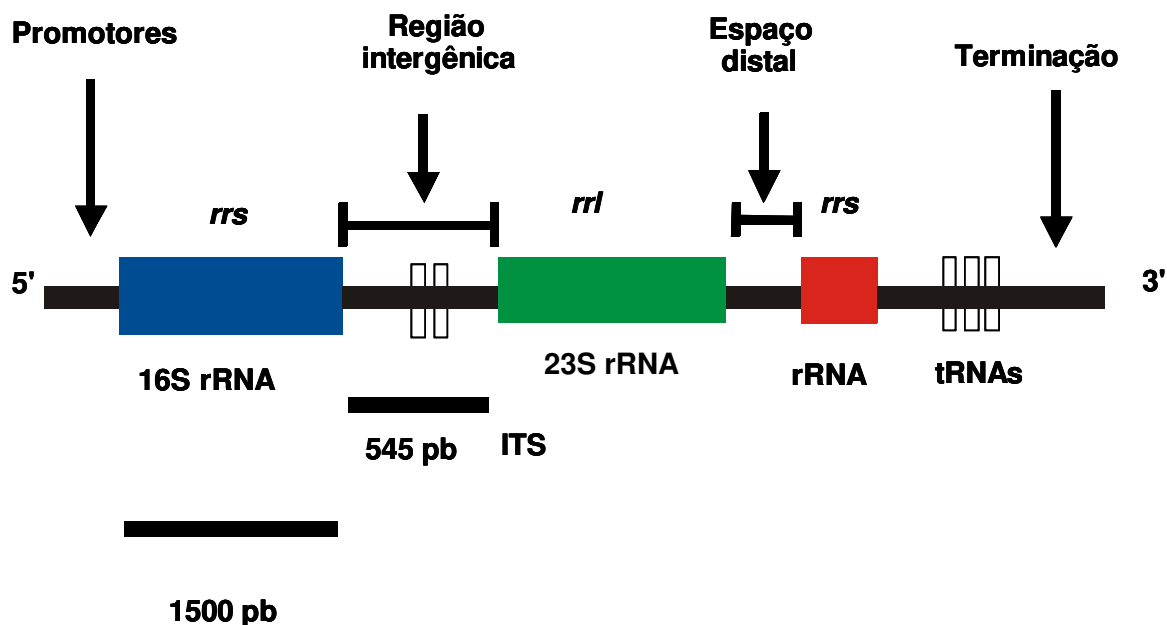


Figura 1. Organização do Operon do rRNA Ribossômico. (Weisburg et al., 1991).

Muitos estudos das relações filogenéticas das bactérias são baseados na análise dos genes 16S rRNA e esses estudos têm permitido uma maior compreensão dos mecanismos do organismo, sua evolução (Woese, 1987). Os genes *rrs*, *rri* e *rrf* codificam para os RNAs ribossomais 16S, 23S (Figura 1) e 35S respectivamente. Os RNAs ribossômicos (rRNA) são componentes essenciais dos ribossomos envolvidos na tradução do RNA mensageiro (mRNA) para a síntese de proteínas.

A sequência do gene 16S rRNA tem sido amplamente utilizada como marcador pelas seguintes razões: a) está presente em todos organismos; b) a sequência de aproximadamente 1500 bases apresenta um grau de conservação elevado e pode acumular variabilidades em diferentes regiões da molécula (Lane et al., 1985); c) por ser um marcador amplamente utilizado várias informações estão depositadas em banco de dados. A capacidade discriminatória deste método varia ao nível do gênero a espécie (Figura 2).

Outra estratégia, por exemplo, o ARDRA (em inglês: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) pode oferecer uma maior especificidade. O ARDRA explora o uso de oligonucleotídeos iniciadores universais para amplificar as sequências do rRNA de bactérias, seguidas pela digestão com enzimas de corte frequente para se determinar a diversidade e para identificar/classificar os isolados ao nível de gênero e algumas vezes ao nível de espécie (Louws et al., 1999). As variações nos nucleotídeos do DNA devidas a mutação, deleção, inserção ou inversão podem ser detectadas se ocorrem num dos sítios de corte das enzimas de restrição.

Recentemente, a metodologia de ARDRA tem sido aplicada para o estudo da diversidade microbiana associada a vegetais ou a diferentes solos (Chelius & Triplett, 2001), análise da diversidade de organismos como *Clostridium* (Gurtler et al., 1991), *Streptococcus* (Jayaro et al., 1991), *Mycobacterium* (Hughes et al., 1993), *Xanthomonas* e *Stenotrophomonas* (Nesme et al., 1995), *Acinetobacter* (Vanechoutte et al., 1995) e *Rhizobia* (Laguerre et al., 1994).

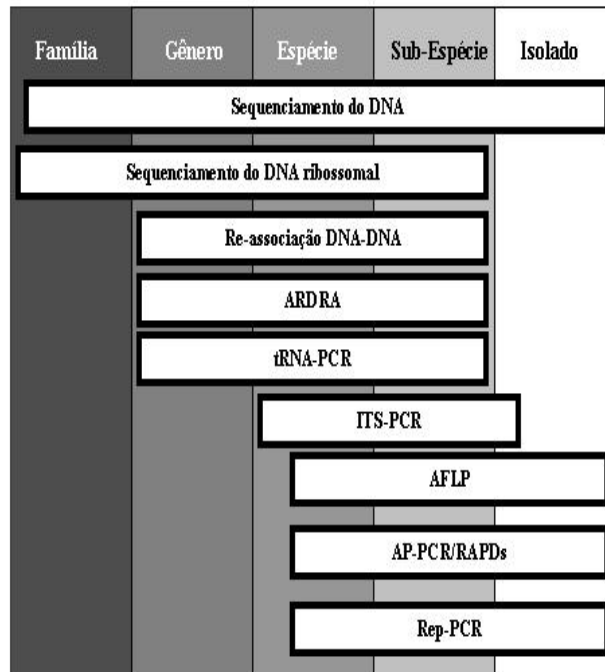


Figura 2. Capacidade dos métodos baseados em DNA para diferenciar níveis taxonômicos (Adaptado de Louws et al., 1999).

3 OBJETIVOS

Investigar a comunidade de actinobactérias presentes em TPA (Terra Preta Antropogênica), por métodos de isolamento, cultivo, análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) e seqüenciamento do gene 16S rRNA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho constitui-se parte de projeto em desenvolvimento intitulado "Terra Preta Nova: Sistemas Indígenas de Manejo do Solo como Base para Desenvolvimento de Manejo Sustentável da Fertilidade de Solos da Amazônia", apoiado pelo INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e EMBRAPA - RJ (Solos). A equipe do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP, tem como atividade principal o estudo da biodiversidade da Terra Preta Antropogênica (TPA) usando técnicas bioquímicas e moleculares para identificação de microrganismos presentes nos perfis dos solos, assim como a sua contribuição à fertilidade da TPA.

4.1 Área de estudo: Localidade

O clima da Amazônia é quente e úmido com temperatura média entre 25° C e 35° C. A vegetação é formada pela Floresta Tropical e há grande predominância de terras acidentadas. O solo apresenta-se arenoso nas áreas mais altas e argiloso nas áreas mais baixas. A área de TPA é classificada como Latossolo Amarelo Antrópico. A região estudada tem sido considerada de preservação permanente quanto à exploração econômica dos recursos naturais.



Figura 3. Localização do município de Rio Preto da Eva – AM



Figura 4. Vista geral do sítio D. Francisca localizado em Rio Preto da Eva – AM.



Figura 5. Vista geral do sítio D. Francisca localizado em Rio Preto da Eva – AM.

4.2 Amostragem

Foram coletadas amostras de solo de quatro pontos (em TPA e solo adjacente a TPA) e em três profundidades de cada ponto (0-10, 10-20 e 20-40 cm). Após a coleta as amostras foram acondicionadas, armazenadas sob baixa temperatura (4°C) e enviadas imediatamente para o Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, em Piracicaba, SP.



Figura 6. Coleta de amostras de solo TPA no Rio Urubu – município Rio Preto da Eva.



Figura 7. Ponto de coleta das amostras de TPA, no município de Rio Preto da Eva.



Figura 8. Ponto de coleta das amostras de TPA, no município de Rio Preto da Eva.

4.3 Quantificação de Actinobactérias

Para avaliar a população microbiana presente nas amostras, foram utilizadas as etapas de contagem, isolamento e identificação. A determinação da população microbiana foi realizada utilizando-se a técnica de plaqueamento por espalhamento de contagem em placas de Petri. Após a contagem das colônias, as actinobactérias foram isoladas por purificação de colônias (pescagem), para então serem identificadas.

4.4 Isolamento das Actinobactérias

Para o isolamento de actinobactérias do solo foi utilizado o Actinomycete Isolation Agar (Difco 212168) como meio de cultivo: caseinato de sódio, 2,0 g/L;

asparagina, 0,1 g/L; propionato de sódio, 4,0 g/L; K_2HPO_4 , 0,5 g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 g/L; $FeO_4S \cdot 7H_2O$, 0,001g/L; glicerol, 5,0 g/L; Agar, 15,0 g/L.

Foi feita uma diluição em série das amostras de solo e então inoculado 0,1 mL do solo diluído sobre o meio de cultivo previamente solidificado, as placas foram incubadas a 28°C e então realizada a contagem das UFC. Após a contagem procedeu-se o isolamento das culturas. Para tal foi utilizado o mesmo meio de cultivo, porém sem a adição de Ágar. Após o crescimento das culturas foi realizada a extração de DNA.

4.5 Isolamento de DNA Genômico

O isolamento do DNA genômico dos isolados foi feito a partir de culturas líquidas (5 mL) sendo as células posteriormente coletadas por centrifugação. O DNA foi isolado de acordo com Doyle & Doyle (1990). Brevemente: 700 μ L do tampão de extração (NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM pH 8,0, EDTA 20 mM pH 8,0, PVP-40 1%, CTAB 2%, proteinase K 100 μ g ml^{-1} , e β -mercaptoetanol 0,2%) foram adicionados às células, seguido de re-suspensão e incubação a 65°C por 30 min. A suspensão foi extraída com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) por 3 vezes, precipitada com isopropanol, seca ao ar e ressuspendida em TE pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1mM). O DNA total foi quantificado através do fluorímetro DyNA Quant2000 (Amersham Pharmacia Biotech UK, Ltd., Buckinghamshire, United Kingdom). Cinco microlitros do DNA foram analisados em gel de agarose 1%, utilizando como padrão de tamanho de DNA o marcador molecular 1 kb Plus DNA LadderTM (Invitrogen Life Technologies, Sao Paulo, Brasil). Os géis foram documentados utilizando-se o programa "Multi Analyst" do "Fluor-STM Multimager" (BioRad, Hercules, Califórnia, E.U.A), bem como em espectrofotometria a 260/280 nm.

4.6 Amplificação do Gene que Codifica para o 16S rRNA

O gene 16S rRNA foi amplificado por PCR com os seguintes oligonucleotídeos iniciadores para o domínio *Eubacteria* fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg et al., 1991). Amplificações do gene 16S rRNA por PCR foram feitas em volume de 50 μ L contendo 5 pmols de oligonucleotídeos iniciadores, 200 μ M de cada dNTP, 1 X tampão *Taq*, 1,5 mM de $MgCl_2$, 2 U Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil) e 50 ng de DNA.

A PCR foi iniciada com 3 minutos de desnaturação a 94°C, seguido de 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 seg, e extensão final a 72°C por 10 minutos. Uma alíquota de 5 μ L do produto da PCR foi analisada em gel de agarose 1%, utilizando como padrão de tamanho de DNA o marcador molecular 100 pb (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil). Os géis foram documentados através do programa "Multi Analyst" do "Fluor-STM Multimager" (BioRad, Hercules, Califórnia, E.U.A).

4.7 Purificação do DNA

A purificação do DNA foi efetuada da seguinte forma: Todo o volume do produto de PCR (45 μ L) foi transferido para tubos Eppendorf de 500 μ L e adicionados 135 μ L de isopropanol 100% e 45 μ L de água ultrapura (Ex: milli-Q) autoclavada. A mistura foi homogeneizada (vórtex) por alguns segundos. Deixar em repouso por 2 h a -20° C; em seguida foi centrifugada a 20.800 G, por 25 min, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado totalmente com micropipeta (P 200) e adicionado 250 μ L de etanol 70% (diluído em água ultrapura imediatamente antes de usar). Homogeneizou-se (vórtex) por alguns segundos e centrifugou-se a 20.800 G, por 5 min, a temperatura ambiente; o sobrenadante foi descartado totalmente com micropipeta (P 200 e P 10); o precipitado foi seco no Concentrador de DNA por 10 min e ressuspendido em 50 μ L de água ultrapura autoclavada, agitou-se em vórtex seguido de um pulso na microcentrífuga; o

material foi colocado (5 μ L) em gel de agarose 1% e o restante foi guardado em freezer -20° C até a próxima etapa (digestão com enzimas de restrição).

4.8 Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA)

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

A seguir, encontram-se descritas as enzimas de restrição (endonucleases) utilizadas neste estudo, com suas respectivas seqüências de corte:

- *Msp* I: 5' – C ↓ CG G – 3'
 3' – G GC ↑ C – 5'

- *Taq* I: 5' – T ↓ CG A – 3'
 3' – A GC ↑ T – 5'

4.9 Seqüenciamento do Gene 16S rRNA

A PCR de seqüenciamento dos fragmentos foi feita em um volume final de 10 μ L onde foram utilizados 200 ng dos fragmentos de interesse; 5 pmoles de oligonucleotídeos iniciadores; 1,0 μ L de tampão 2,5 X; 3,0 μ L de Big Dye Terminator

Cycle Sequencing v.3 (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram: rD1 e fD1, além dos conjuntos de oligonucleotídeos internos descritos na Tabela 1, visando o fechamento da seqüência do gene 16S rRNA. As condições de amplificação para o iniciador T7 foram: 2 min de desnaturação a 96°C, seguidos de 25 ciclos com desnaturação a 96°C por 45 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos, extensão a 60°C por 4 minutos, enquanto que para os demais iniciadores tais condições encontram-se a seguir: 4 min de desnaturação a 94°C; seguidos de 25 ciclos com desnaturação a 94°C, por 1 min, anelamento a 55°C por 30 seg e extensão a 60°C por 4 min.

Tabela 1: Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores internos para amplificação do gene 16S rRNA.

Seqüência (5'-3')	Posição de alinhamento na seqüência de <i>E. coli</i>
CCT ACG GGA GGC AGC AG	341-357F
CTG CTG CCT CCC GTA GG	357R
GTA G(GC)G GTG AAA T(GC)C GTA GA	685-704F
TCT ACG SAT TTC ACC (GC) CT AC	704R
GCA ACG AGC GCA ACC C	1099-1114F
GGG TTG CGC TCG TTG C	1114R

Após a amplificação dos fragmentos de interesse, procedeu-se a precipitação para a eliminação dos ddNTPs que não foram incorporados. Foram adicionados 10 µL de isopropanol a 60 % (recém preparado). Após a homogeneização por agitação, as microplacas foram deixadas em repouso a temperatura ambiente por 20 min e então centrifugadas a 1.700 G por 45 min. O sobrenadante foi descartado e 250 µL de etanol 70% foram adicionados. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 1.700 G, o sobrenadante descartado, e o precipitado incubado por 5 minutos a 40°C para secagem. Em seguida o precipitado foi ressuspenso em 10 µL de formamida (HiDi formamida – Applied Biosystems). A

microplaca foi colocada em um termociclador para a desnaturação do DNA a 96°C durante 5 min e imediatamente colocada no gelo por 2 min.

A leitura das bases marcadas foi realizada no Seqüenciador Automático ABI Prism 3100 Genetic Analyser do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – CENA/USP.

4.9.1 Análise Filogenética das Seqüências

As seqüências geradas foram editadas removendo as bases de baixa qualidade (<20) através dos programas Phred/Phrap/Consed em sistema operacional Linux (Ewing & Green, 1998; Ewing et al., 1998; Gordon et al., 1998). As seqüências foram analisadas pelo BLASTn contra a base de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information), website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As seqüências foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal W 1.8 (<http://www.ebi.ac.uk/index.html>) (Thompson et al., 1994). Posteriormente, o ajuste das extremidades das seqüências de DNA, de forma que todas elas tivessem o mesmo número de bases e estivessem completamente alinhadas, foi realizado com o auxílio do programa BioEdit (Hall, 2001). Para o cálculo da significância estatística da similaridade entre as seqüências foi utilizada uma re-amostragem para 1000 replicações (Swofford et al. 1996).

O método de distância ("Neighbour Joining") (Saitou & Nei, 1987) foi utilizado para a construção da árvore filogenética com auxílio do programa TREECON (van de Peer & De Wachter, 1994).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolados de Bactérias

Foram isoladas 25 colônias de bactérias de cada amostra de solo, totalizando um número de 300 colônias para cada solo estudado. Foi extraído o DNA genômico de todos os isolados que foram quantificados por gel de agarose 1% e por espectrofotometria. Em seguida, os DNAs foram diluídos para padronização e amplificados por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores do gene ribossomal 16S para o Domínio *Eubactéria* fD1 e rD1. O produto de PCR de todos os isolados passaram por purificação por precipitação por isopropanol e então resuspendidos em água ultra pura esterilizada.

Posteriormente estes produtos de PCR foram submetidos à técnica de restrição de seqüências amplificadas do gene 16S rRNA (ARDRA) com o propósito de detectar a variabilidade genética entre os 25 isolados de bactérias de cada amostra de solo.

De acordo com o padrão de clivagem obtido, foi possível observar de 2 a 4 fragmentos por enzima de restrição. Fragmentos com tamanho acima de 100 pb foram considerados na presente análise. De acordo com o padrão de clivagem utilizado destas enzimas, foi possível observar polimorfismos entre os isolados neste estudo.

A microbiota do solo reflete o equilíbrio biológico resultante da ação de todas as propriedades físicas e químicas do solo e do ambiente. Nesse sentido, as pesquisas na Embrapa Agrobiologia estão centradas na caracterização da natureza e funcionalidade da biota do solo (bactérias fixadoras de nitrogênio, fungos micorrízicos arbusculares, actinobactérias, rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, grupos de invertebrados, saprófagos e outros), visando determinar grupos-chave associados aos processos de ciclagem de nutrientes e decomposição da matéria orgânica, que sirvam como indicadores biológicos que permitam descrever com segurança o grau de estabilidade/degradação dos solos, para auxiliar nas recomendações de manejo para a sustentabilidade agrícola.

Nesta presente investigação, a partir da pouca informação sobre a população microbiana nas TPAs, foram identificados os gêneros de actinobactérias neste solo. Estes gêneros foram determinados utilizando-se o método ARDRA para obter a diversidade e para identificar/classificar os isolados ao nível de gênero e algumas vezes ao nível de espécie (Louws et al., 1999).

Recentemente, a metodologia de ARDRA tem sido aplicada para o estudo da diversidade microbiana associada a vegetais ou a diferentes solos (Chelius & Triplett, 2001), análise da diversidade de organismos como *Clostridium* (Gurtler et al., 1991), *Streptococcus* (Jayaro et al., 1991), *Mycobacterium* (Hughes et al., 1993), *Xanthomonas* e *Stenotrophomonas* (Nesme et al., 1995), *Acinetobacter* (Vaneechoutte et al., 1995) e rhizobia (Laguerre et al., 1994).

5.2 População Microbiana em TPA

A identificação de diferentes isolados foi feita a partir dos 25 isolados de cada amostra de solo, resultando assim 79 isolados que posteriormente foram seqüenciados.

5.2.1 Profundidade de 0-10cm

Os 25 isolados de cada amostra de solo, que apresentaram perfis diferentes, foram submetidos a PCR de seqüenciamento dos fragmentos de interesse; oligonucleotídeos iniciadores rD1, fD1, além dos conjuntos de oligonucleotídeos internos descritos na Tabela 1, visando o fechamento da seqüência do gene 16S rRNA. Na Tabela 2, está apresentado a análise de polimorfismo entre os isolados de bactérias das amostras de TPA na profundidade de 0-10cm como mostram as Figuras 9 e 10. O seqüenciamento foi realizado em um isolado de cada grupo de homólogos.

Tabela 2. Análise de polimorfismo do DNA genômico, através de enzimas de restrição, nos isolados de bactérias de TPA na profundidade de 0-10cm.

Amostra	Isolados homólogos
P01	1; 2 e 3
	4 e 5
	6
	7; 11; 15; 19 e 23
	8; 12; 13; 14; 16; 17 e 18
	9
	10
	20; 21 e 22
	24 e 25
P01MT01	26
	27
	28
	29
	30 e 31
	32; 33; 34; 35; 36; 37; 41; 42; 44; 45; 46; 47; 48 e 50
	34
	38; 39; 40 e 43
	49
P01MT02	51; 53 e 54
	52; 55; 56; 59; 23; 74 e 75
	57
	58
	60; 61; 62; 63; 64; 65; 66; 67; 68; 69; 70 e 71
	72 e 73
P01MT03	76
	77
	78 e 79
	80; 81; 82; 83; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 97; 98 e 99
	95 e 96
	100

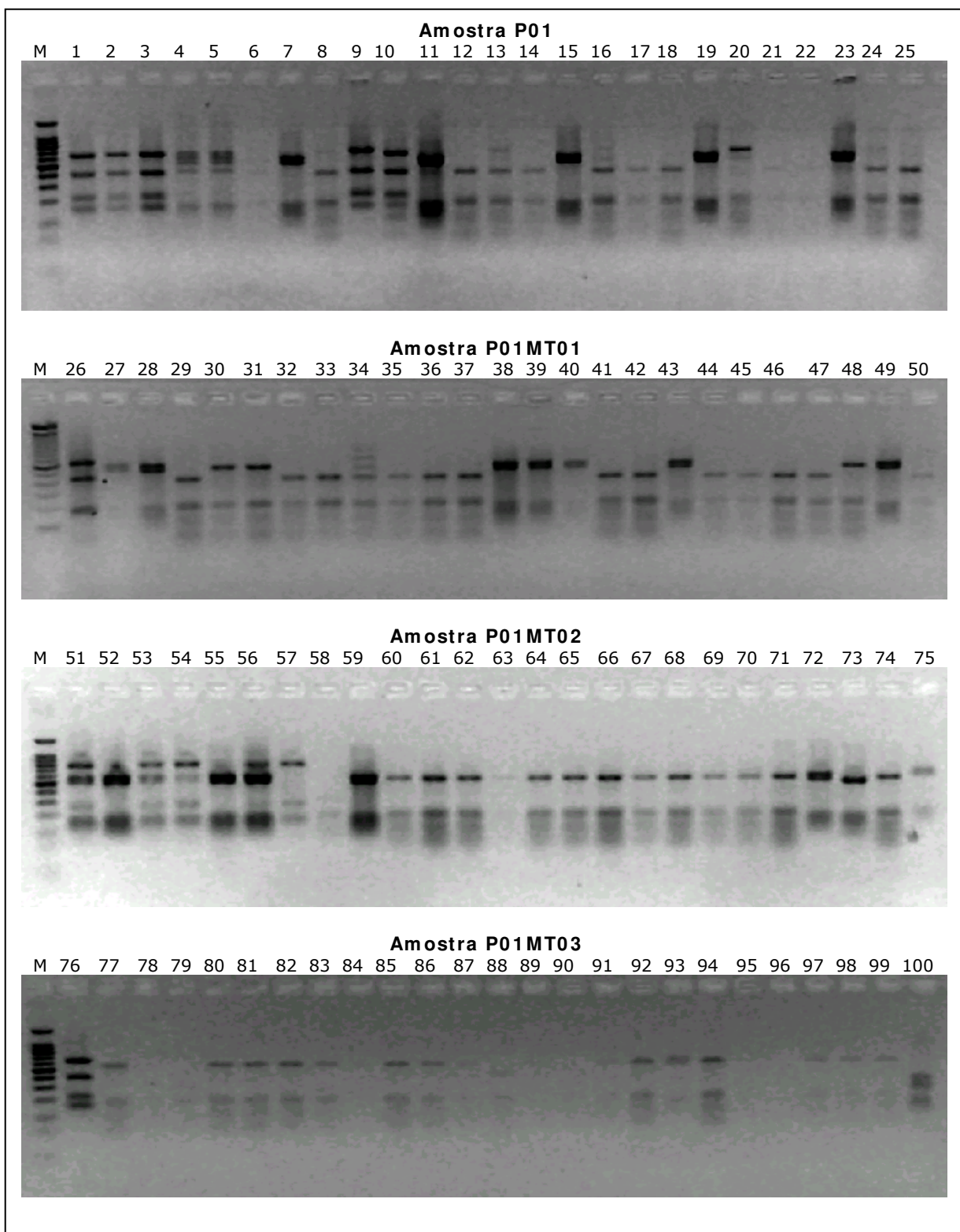


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease *Msp* I após a amplificação do gene 16S rRNA. M – marcador molecular 1Kb Ladder. Os números acima das canaletas correspondem aos isolados das amostras de TPA na profundidade de 0-10cm.

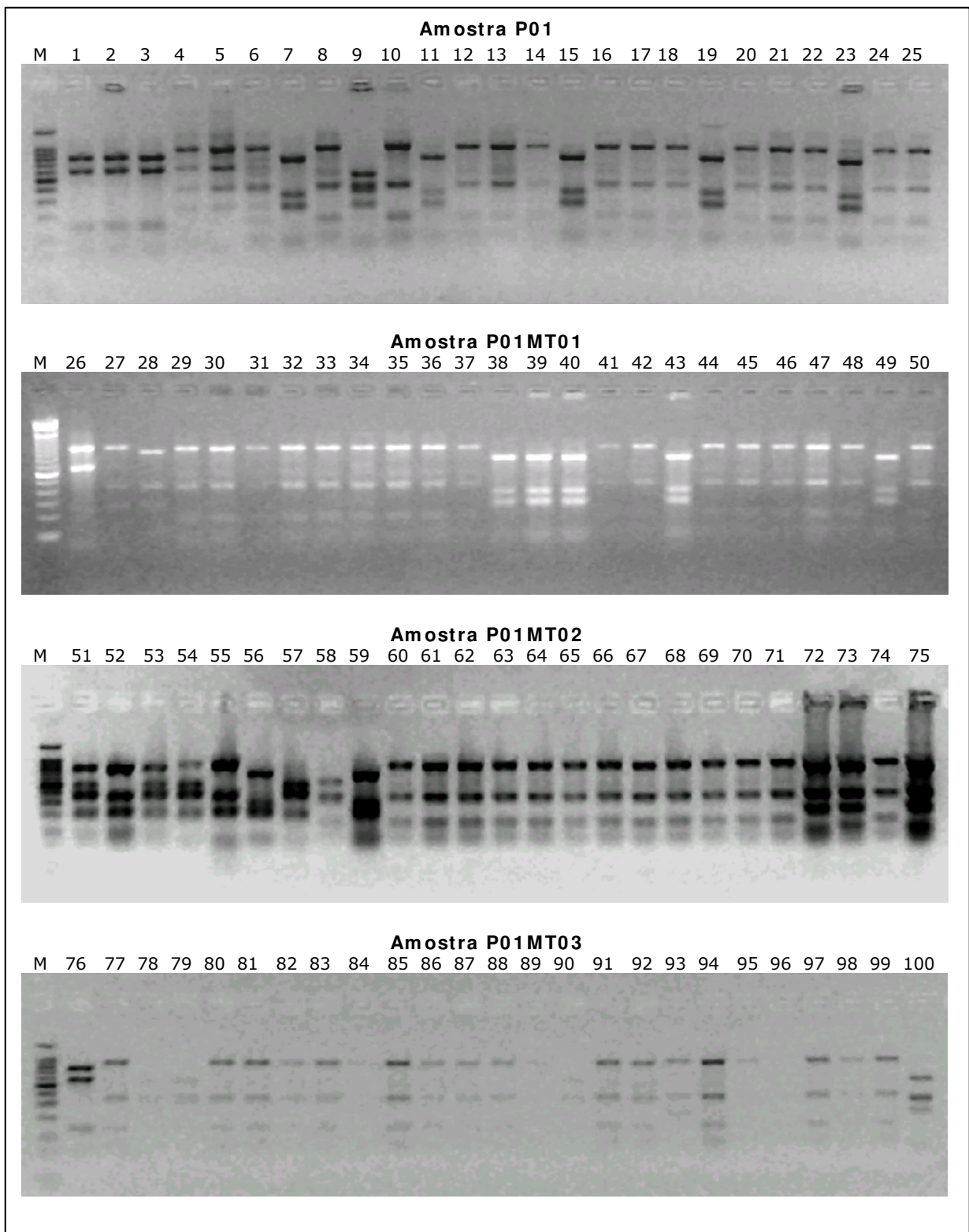


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease *Taq* I, após a amplificação do gene 16S rRNA. M – marcador molecular 1Kb Ladder. Os números acima das canaletas correspondem aos isolados das amostras de TPA na profundidade de 0-10cm.

Após o seqüenciamento as seqüências geradas foram editadas removendo as bases de baixa qualidade (<20) através dos programas Phred/Phrap/Consed em sistema operacional Linux e então analisadas pelo BLASTn contra a base de dados do NCBI.

A tabela 2 foi confeccionada analisando-se as Figuras 9 e 10, apresentadas em seguida.

Tabela 3a. População de actinobactérias encontradas em TPA na profundidade de 0-10cm.

Amostra 0-10cm	Isolado	Microrganismo	% de identidade pelo NCBI
P01	6	<i>Arthrobacter</i> sp	95
	8; 12; 13; 14; 16; 17 e 18	<i>Arthrobacter</i> sp	98
	24 e 25	<i>Arthrobacter nitroguaiacolicus</i>	98
P01MT01	29	<i>Arthrobacter</i> sp	96
	30 e 31	<i>Arthrobacter</i> sp	98
	32; 33 ; 34; 35; 36; 37; 41; 42; 44; 45; 46; 47; 48 e 50	<i>Arthrobacter histidinolorans</i>	92
P01MT02	58	<i>Streptomyces purpureus</i>	97
	60; 61; 62; 63; 64; 65; 66; 67; 68; 99; 70 e 71	<i>Arthrobacter</i> sp	98
P01Mt03	77	<i>Arthrobacter</i> sp	99
	78 e 79	<i>Streptomyces purpeofuscus</i>	98
	80; 81; 82; 83; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 97; 98 e 99	<i>Arthrobacter</i> sp	95

Tabela 3b. População de bactérias encontradas em TPA na profundidade de 0-10cm.

Amostra 0-10cm	Isolado	Microrganismo	% de identidade pelo NCBI
P01	1; 2 e 3	<i>Bacillus cereus</i>	99
	4; e 5	<i>Pseudomonas</i> sp	89
	7; 11; 15; 19 e 23	<i>Variovorax</i> sp	99
	9	<i>Rhizobium rhizogenes</i>	99
	10	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100
	20; 21 e 22	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	98
P01MT01	26	<i>Bacillus fusiformis</i>	98
	27	<i>Bacillus cereus</i>	99
	28	<i>Pseudomonas putida</i>	99
	38; 39; 40 e 43	<i>Variovorax paradoxus</i>	98
	49	<i>Variovorax</i> sp	96
P01MT02	51; 53 e 54	<i>Brevibacillus limnophilus</i>	92
	52; 55; 56; 59; 73; 74 e 75	<i>Pseudomonas</i> sp	98
	57	<i>Brevibacillus brevis</i>	98
	72	<i>Pseudomonas</i> sp	98
P01MT03	76	<i>Bacillus cereus</i>	99
	81	<i>Mesorhizobium loti</i>	99
	95 e 96	<i>Bacillus</i> sp.	94
	100	<i>Pseudomonas</i> sp	97

Os resultados apresentados nas Tabelas 3a foram obtidos por seqüenciamento após a seleção dos isolados pelo método ARDRA, que foram identificados como actinobactérias e na Tabela 3b os microrganismos identificados como não actinobactérias.

Alguns isolados não apresentaram identidade ($\geq 98\%$) frente ao banco de dados do NCBI, que supostamente podem ser seqüências de microrganismos ainda nunca depositados, visto a microbiota hoje conhecida está em torno de 0,1 a 1%.

Dentre as actinobactérias isoladas, o gênero *Arthrobacter* foi o que teve maior ocorrência. As bactérias deste gênero são hábeis em remover cromo (VI) e cádmio (II) de soluções aquosas por biofilme bacteriano em suportes de carbono ativo granular (Quintelas & Tavares, 2001). A remoção que ocorre por acúmulo de

metais pesados, por mecanismos independentes do metabolismo celular, se dá por meio de interações físico-químicas entre o metal e constituintes da parede celular, de exopolissacarídeos e outros materiais associados a face externa da membrana celular. A independência do metabolismo, ocorre pelo fato de não ser necessário que haja gasto energético por parte da célula microbiana, para que haja captação dos íons metálicos. A remoção neste caso pode ocorrer tanto em células vivas quanto em células mortas (Gadd, 1988).

Segundo Centurion (1990), a antibiose é uma importante forma de atuação de alta eficiência da bactéria *Arthrobacter* sp no controle de *Uromyces phaseoli* (ferrugem do feijão), podendo ser utilizada no controle biológico desta fitopatologia.

As bactérias do gênero *Arthrobacter* também produzem enzimas líticas β -1,3 glucanases e proteases capazes de lisar células de leveduras (Fleuri & Sato, 2005). As enzimas que lisam a parede celular de leveduras têm aplicações biotecnológicas na preparação de protoplastos para melhoramento genético de leveduras e no aproveitamento de massa celular de levedura para extração de proteínas, enzimas e pigmentos. A lise enzimática de células de microrganismos também tem potencial de aplicação no tratamento de massa celular de levedura residual de indústrias de fermentação para preparação de ração animal, na obtenção de carboidratos funcionais da parede celular (glucana e manana) e no pré-tratamento para ruptura mecânica de células aumentando a eficiência e reduzindo o requerimento de energia. As enzimas líticas têm sido utilizadas também como ferramenta para determinação da composição da parede celular de leveduras e no estudo do mecanismo da síntese da parede celular para controle de leveduras patogênicas. As enzimas líticas são capazes de lisar a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* sp. e outros gêneros de leveduras, o que amplia o campo de utilização dessas enzimas.

Outro gênero encontrado foi o *Streptomyces*, que tem grande importância biotecnológica, pois são conhecidos produtores de antibióticos e ocupam um importante papel na biodegradação de polímeros como lignina, quitina e amido

(Crawford, 1988; Nolan & Cross, 1988), além de oxidar hidrocarbonetos poliaromáticos como o naftaleno (Mesquita, 2004).

O uso de actinobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas vem sendo estudado desde 1914. Embora os trabalhos existentes sejam em número reduzido, os resultados são promissores, como aqueles em que o uso de *Streptomyces sp.* controlou, em nível satisfatório, a murcha incitada por *Ralstonia solanacearum* em batata-doce (Gao et al., 1983), em banana (El-Abyad et al., 1993b) e em tomate (El-Abyad et al., 1993a). Porém a literatura é farta em se tratando de trabalhos de controle de fungos por actinobactérias. Como exemplo, o tratamento de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) com *Streptomyces sp.* apresentou o melhor controle de *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* (Neweigy et al., 1982).

Como mencionado anteriormente, foi utilizado um meio de cultivo específico para isolamento de actinobactérias (Actinomycete Isolation Agar); entretanto, este meio de cultivo não é seletivo, uma vez que foi notada a presença de outros gêneros de bactérias em todas as amostras de solo, que também foram selecionados pelo método ARDRA e identificados por seqüenciamento como apresentado abaixo.

A Tabela 3b apresenta os resultados obtidos no seqüenciamento de bactérias que foram isoladas, analisados pelo método ARDRA e posteriormente identificadas por seqüenciamento que mostraram não ser actinobactérias, entretanto, algumas têm importância, tal como as actinobactérias, na ecologia microbiana do solo.

A bactéria *Bacillus cereus* é patogênica ao homem, porém este microrganismo tem grande influência na co-nodulação de raízes de plantas como foi observado na pesquisa de Halverson & Handelsman (1991), que obtiveram um incremento na nodulação de soja entre 30 a 133% por *Bradyrhizobium japonicum* nativo, quando trataram as sementes somente com *B. cereus*.

Outro microrganismo encontrado nas amostras solos investigados foi a bactéria do gênero *Pseudomonas*, que, apesar de ser a responsável pela maioria dos casos de doença infecciosa no homem, é um microrganismo oportunista, isto é,

causa doença somente em condições especiais, quando o organismo humano está debilitado por algum motivo, como por exemplo, processos cirúrgicos e queimaduras. Nesses casos, esse microrganismo pode causar bacteremias bem severas. Além disso, *Pseudomonas aeruginosa*, bem como outras espécies de *Pseudomonas*, apresentam grande importância para a indústria de alimentos, pois são microrganismos causadores de deterioração. Segundo Kloepper (1993), pertencem ao grupo fluorescente de *Pseudomonas* sp., muitos isolados de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, sendo muito freqüente o uso de isolados desse grupo em seleções de bactérias com vistas em promover o crescimento vegetal (Freitas & Pizzinatto, 1991; Chen et al., 2000; Chanway et al., 2000; Berggren et al., 2001; Cattelan, 2001; Ramamoorthy et al., 2001).

O gênero *Alcaligenes*, hoje reclassificado como *Variovorax*, uma conhecida bactéria que é hábil em degradar herbicidas, também foi encontrada nas amostras de TPAs, esta degrada a molécula 2,4-diclorofenoxiacético, utilizando-a como fonte de carbono (Nogueira, 2001). Bastos et al., (2000) isolaram e identificaram, por meio de observação morfológica e testes bioquímicos, perfis de ácidos graxos e sequenciamento do gene 16S, a bactéria *Alcaligenes faecalis* em solos da Amazônia Ocidental (Rondônia), e esta bactéria se mostrou hábil na degradação de fenóis.

Segundo Anderson & Moore (1979), a bactéria *Agrobacterium rhizogenes*, hoje reclassificada como *Rhizobium rhizogenes* foi isolada de raízes de tomateiros com doenças infecciosas, mas não foi encontrada uma patogenicidade específica (De Cleene & De Ley, 1981).

A associação de plantas com bactérias do grupo dos rizóbios, capazes de fixar o nitrogênio atmosférico e fornecê-lo à cultura, é uma tecnologia capaz de substituir, pelo menos parcialmente, a adubação nitrogenada resultando em benefícios ao pequeno produtor. Apesar do conceito geral de que algumas culturas (como por exemplo, o feijoeiro) apresentam baixa capacidade fixadora, os resultados de pesquisas pela EMBRAPA obtidos em condições de campo, ((http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/artigos/fbni_inocula_feijoeiro.html) indicam que é possível que a planta se beneficie da inoculação com o rizóbio,

atingindo níveis de produtividade entre 1500 e 2000 kg/ha. Segundo Tsai¹ a produção do feijoeiro atinge cerca de 800 kg/ha sem a inoculação de rizóbio.

Os rizóbios são bactérias benéficas presentes no solo, as quais são atraídas para as raízes das plantas leguminosas. Estas bactérias, uma vez em contato com as raízes do feijoeiro, por exemplo, induzem a formação de nódulos que, em seu interior ocorre o processo de fixação do nitrogênio do atmosférico por estas bactérias. Este processo permite que o agricultor economize na adubação nitrogenada. O nitrogênio é um dos nutrientes essenciais para o desenvolvimento das plantas e, normalmente, é fornecido para as culturas através da adubação com uréia, sulfato de amônia, esterco ou outras formulações do tipo NPK. No entanto, na atmosfera contém quase 80% de nitrogênio, na forma de gás, e este pode ser aproveitado pelas plantas através do trabalho dos rizóbios, que absorvem este elemento do ar, transformando-o em aminoácidos ou outros compostos que podem ser utilizados na nutrição nitrogenada do vegetal.

Esta associação do rizóbio com as raízes das leguminosas é chamada de "simbiose", termo que define um tipo de relação benéfica entre os parceiros, neste caso a planta e a bactéria. O rizóbio utiliza os carboidratos provenientes da fotossíntese da planta hospedeira para gerar a energia necessária para promover o processo de fixação biológica de nitrogênio. Por outro lado, a planta beneficia-se do nitrogênio fixado pela bactéria na síntese de suas proteínas (Franco et al., 1996).

O termo rizóbio é utilizado para, indistintamente, referir-se a um grupo bastante heterogêneo de bactérias que, atualmente, envolve 28 espécies distintas pertencentes a 6 gêneros, quais sejam: *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Alorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium*. Estas bactérias produzem nódulos nas mais diversas espécies de leguminosas (Franco et al., 1996).

Carneiro e colaboradores (2004) citam a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* como sendo um microrganismo endofítico que afeta negativamente a produtividade da cana-de-açúcar, causando: deficiência hídrica, cultivo de variedades ultrapassadas e ocorrência de pragas e de doenças. Das doenças, destaca-se o

¹ TSAI, S.M. Centro de Energia Nuclear na Agricultura.

raquitismo-da-soqueira da cana-de-açúcar (do inglês: Ratoon Stunting Disease - RSD) causado por esta bactéria. Esta doença foi constatada no Brasil pela primeira vez no município de Campos dos Goytacazes, RJ, em 1956. Em ensaios realizados em solos de tabuleiro na região de Macaé-RJ, os danos causados por RSD foram estimados em 21% (em toneladas de cana por hectare). *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* encontra-se classificada no grupo corineforme, sendo gram-positiva, aeróbica, pleomórfica e fastidiosa. Após 14 dias de cultivo em meio SC – Soybean Corn produz “in vitro” colônias minúsculas e translúcidas. A falta de sintomas característicos e específicos em plantas foi o principal motivo para a disseminação desta bactéria em todas as regiões canavieiras do mundo.

A bactéria *Bacillus fusiformis* já foi anteriormente isolada de solos contaminados por óleo diesel em Long Beach na Califórnia e está relacionada a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo (Bento et al., 2003).

Atualmente a bactéria *Brevibacillus limnophilus* foi reclassificada de uma linhagem de *Brevibacillus brevis* e é indicada como antagonista ao *Botrytis cinerea* encontrada em folhas de repolho chinês, tal como a gramicidina S (Edwards & Seddon, 2001).

Tabela 4. Bactérias isoladas nas amostras de TPA na profundidade de 0-10cm com os números de isolados encontrados.

TPA 0-10cm	Microrganismo	No. de isolados
Actinobactérias	<i>Arthrobacter sp.</i>	42
	<i>Arthrobacter nitroguaiacolicus</i>	2
	<i>Arthrobacter histidinovorans</i>	14
	<i>Streptomyces purpureus</i>	1
	<i>Streptomyces purpeofuscus</i>	2
Outras bactérias	<i>Bacillus cereus</i>	5
	<i>Pseudomonas sp.</i>	10
	<i>Variovorax sp.</i>	6
	<i>Rhizobium rhizogenes</i>	1
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>Xyli</i>	3
	<i>Bacillus fusiformis</i>	1
	<i>Pseudomonas putida</i>	1
	<i>Variovorax paradoxus</i>	4
	<i>Brevibacillus limnophilus</i>	3
	<i>Brevibacillus brevis</i>	1
	<i>Mesorhizobium loti</i>	1
	<i>Bacillus sp.</i>	2

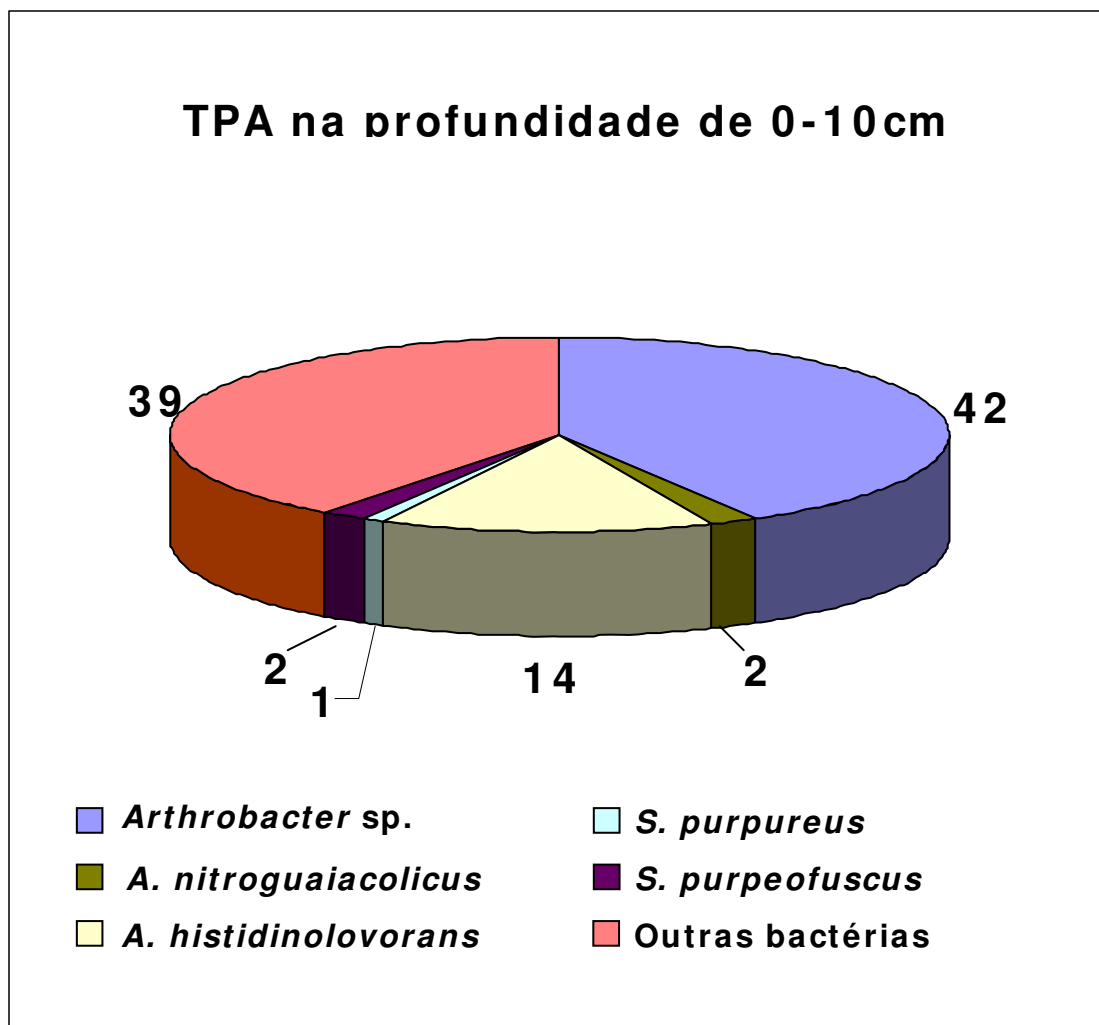


Figura 11. Número de actinobactérias encontradas em amostras de TPA na profundidade de 0-10cm incluindo as bactérias não pertencentes à ordem das *Actinomycetales*.

Na Tabela 4 e Figura 11 observa-se o número total de microorganismos encontrados nas amostras de TPA na profundidade de 0-10cm, que mostra a grande população de bactérias do gênero *Arthrobacter*.

5.2.2 Profundidade de 10-20cm

A Tabela 5 mostra a análise de polimorfismo, entre os isolados de bactérias das amostras de TPA na profundidade de 10-20cm, obtida pelo método ARDRA apresentado nas Figuras 12 e 13. O seqüenciamento foi realizado em um isolado de cada grupo de homólogos.

Após o seqüenciamento as seqüências geradas foram editadas removendo as bases de baixa qualidade (<20) através dos programas Phred/Phrap/Consed em sistema operacional Linux e então analisadas pelo BLASTn contra a base de dados do NCBI.

As Tabela 6a e 6b apresentam os resultados obtidos no seqüenciamento de actinobactérias que foram isoladas, analisadas pelo método ARDRA e posteriormente identificadas por seqüenciamento.

Tabela 5. Análise de polimorfismo do DNA genômico, através de enzimas de restrição, nos isolados de bactérias de TPA na profundidade de 10-20cm.

Amostra	Isolados homólogos
P01	101; 102 e 105
	103; 104; 106; 107; 108; 109; 110; 111; 112; 113; 114; 115; 116; 117; 118; 119; 120; 121; 122 e 123
	124
	125
P01MT01	126 e 127
	128
	129; 130; 131; 132; 133; 134; 136; 138; 139; 140; 141; 142; 143; 144; 145; 146; 147; 148; 149 e 150
	135
	137
P01MT02	151; 153; 159; 160; 161; 162; 163; 164; 165; 167; 168; 169; 170; 171; 172; 173; 174 e 175
	152
	154
	155
	156
	157
	158
	166
P01MT03	176; 180; 182; 183; 184; 186; 187; 188; 189; 190; 191; 192; 193; 194; 195; 196; 197; 198; 199 e 200
	177
	178 e 179
	181
	185

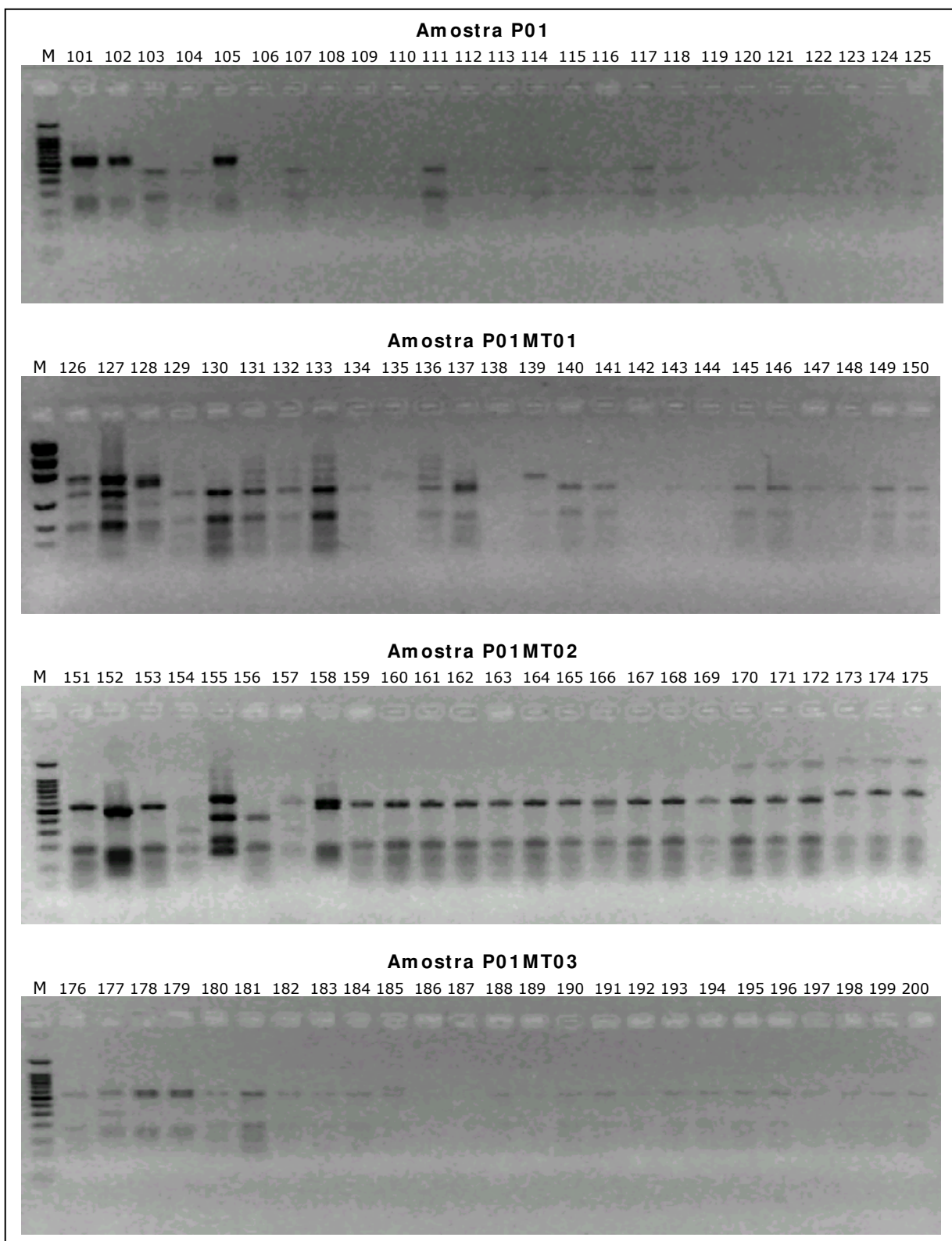


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease *Msp* I após a amplificação do gene 16S rRNA. M – marcador molecular 1Kb Ladder. Os números acima das canaletas correspondem aos isolados das amostras de TPA na profundidade de 10-20cm.

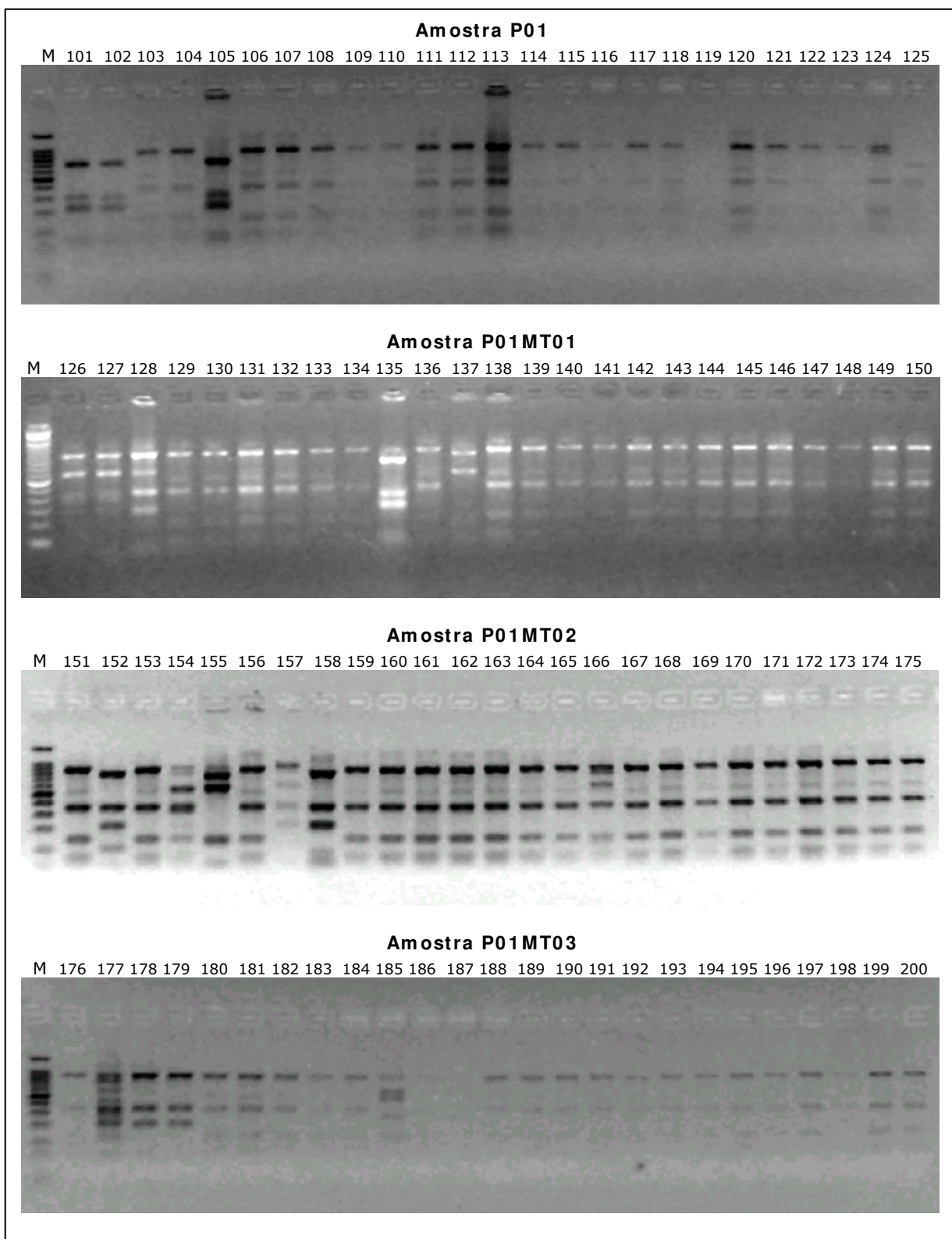


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease *Taq* I após a amplificação do gene 16S rRNA. M – marcador molecular 1Kb Ladder. Os números acima das canaletas correspondem aos isolados das amostras.

Tabela 6a. População de actinobactérias encontradas em TPA na profundidade de 10-20cm.

Amostra 10-20cm	I solado	Microrganismo	% de identidade pelo NCBI
P01	103; 104; 106; 107; 108; 109; 110; 111; 112; 113; 114; 115; 116; 117; 118; 119; 120; 121; 122 e 123	<i>Arthrobacter</i> sp	97
P01MT01	129; 130; 131; 132; 133; 134; 136; 138; 139; 140; 141; 142; 143; 144; 145; 146; 147; 148; 149 e 150	<i>Arthrobacter</i> sp	94
P01MT02	151; 153; 159; 160; 161; 162; 163; 164; 165; 167; 168; 169; 170; 171; 172; 173; 174 e 175	<i>Arthrobacter</i> sp	99
	154	<i>Streptomyces</i> sp	97
	156	<i>Arthrobacter</i> sp	97
P01MT03	176; 180; 182; 183; 184; 186; 187; 188; 189; 190; 191; 192; 193; 194; 195; 196; 197; 198; 199 e 200	<i>Arthrobacter</i> sp	98
	181	<i>Streptomyces purpeofuscus</i>	98

Tabela 6b. População de bactérias encontradas em TPA na profundidade de 10-20cm.

Amostra 10-20cm	Isolado	Microrganismo	% de identidade pelo NCBI
P01	101; 102 e 105	<i>Variovorax</i> sp.	99
	124 e 125	<i>Pseudomonas</i> sp.	97
P01MT01	126 e 127	<i>Bacillus fusiformis</i>	98
	128	<i>Pseudomonas veronii</i>	98
	135	<i>Variovorax</i> sp	99
	137	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i>	96
P01MT02	152	<i>Dyella japonica</i>	99
	155	<i>Bacillus cereus</i>	99
	157	<i>Burkholderia</i> sp	92
	158	<i>Pseudomonas</i> sp	98
	166	<i>Pseudomonas</i> sp	95
P01MT03	177	<i>Burkholderia</i> sp	95
	178 e 179	<i>Pseudomonas</i> sp	99
	185	<i>Paenibacillus</i> sp	87

A população de actinobactérias encontrada nas amostras de solo de TPA não deferiu entre as camadas estudadas como mostra as Tabelas 4a, 5a e 6a, porém foi encontrado uma população um pouco maior na camada intermediária do que na camada mais superficial.

Na Tabela 6b estão relacionados os microrganismos não *Actinomycetales* que foram isolados das amostras de TPA na profundidade de 10-20cm.

Nestas amostras de solos foram encontradas praticamente as mesmas bactérias encontradas nas amostras mais superficiais de solo, porém também foram encontradas as bactérias *Paenibacillus xylanilyticus* e *Dyella japonica*.

O xilano, a mais abundante hemicelulose, uma cadeia de D-xilopirranose com ligações β 1,4, utilizado na produção de papel, é degradado pela bactéria *Paenibacillus xylanilyticus* também encontrado nas TPAs indicando que sua exploração para a área de biotecnologia é vasta (Rivas et al., 2005).

A enzima β -glicosidase também produzida pela bactéria *Dyella japonica* encontrada no solo (Xie & Yokota, 2005), tem grande aplicação biotecnológica pois, esta enzima hidrolisa os isoflavonóides glicosídeos desenvolvendo agliconas, compostos com ação anticancerígena, que também são relacionados com a adstringência observada no sabor da soja (Carrão-Panizzi & Bordingnon, 2000).

Na Tabela 7 e Figura 14 observa-se o número total de microrganismos encontrados nas amostras de TPA na profundidade de 10-20cm, que mostra a grande população de bactérias do gênero *Arthrobacter*, todavia nestas amostras a presença deste gênero de bactérias é bem superior ao encontrado nas amostras de profundidade mais superficial.

Tabela 7. Bactérias isoladas nas amostras de TPA na profundidade de 10-20cm com os números de isolados encontrados.

TPA 10-20cm	Microrganismo	No. de isolados
Actinobactérias	<i>Arthrobacter</i> sp.	79
	<i>Streptomyces</i> sp.	1
	<i>Streptomyces purpeofuscus</i>	1
Outras bactérias	<i>Variovorax</i> sp.	4
	<i>Pseudomonas</i> sp.	6
	<i>Bacillus fusiformis</i>	2
	<i>Pseudomonas veronii</i>	1
	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i>	1
	<i>Dyella japonica</i>	1
	<i>Bacillus cereus</i>	1
	<i>Burkholderia</i> sp.	2
	<i>Paenibacillus</i> sp.	1

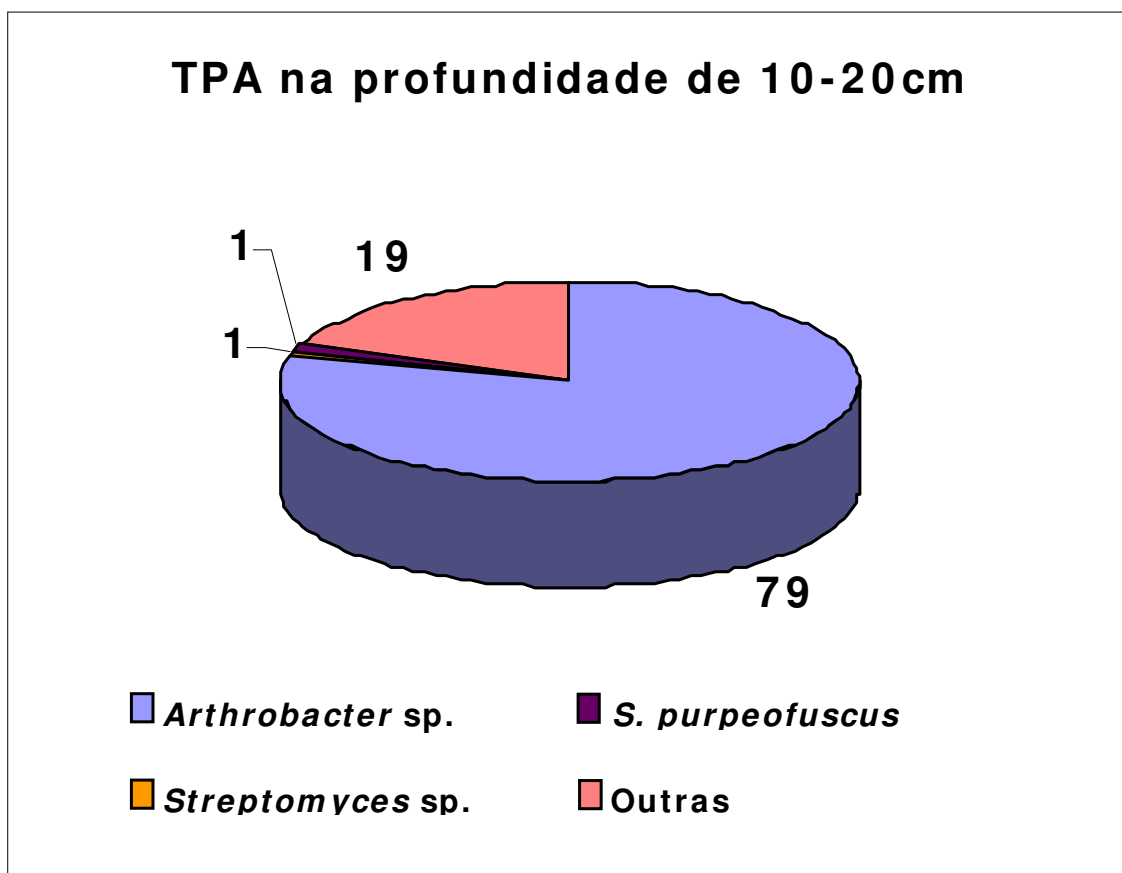


Figura 14. Número de actinobactérias encontradas em amostras de TPA na profundidade de 0-10cm incluindo as bactérias não pertencentes à ordem das *Actinomycetales*.

5.2.3 Profundidade de 20-40cm

Os resultados da investigação de actinobactérias em TPA na profundidade de 20-40cm estão descritos a seguir.

A Tabela 8 representa a análise morfológica entre os isolados de bactérias em TPA na profundidade de 20-40cm, obtida pelo método ARDRA apresentado nas Figuras 15 e 16. O seqüenciamento foi realizado em um isolado de cada grupo de homólogos.

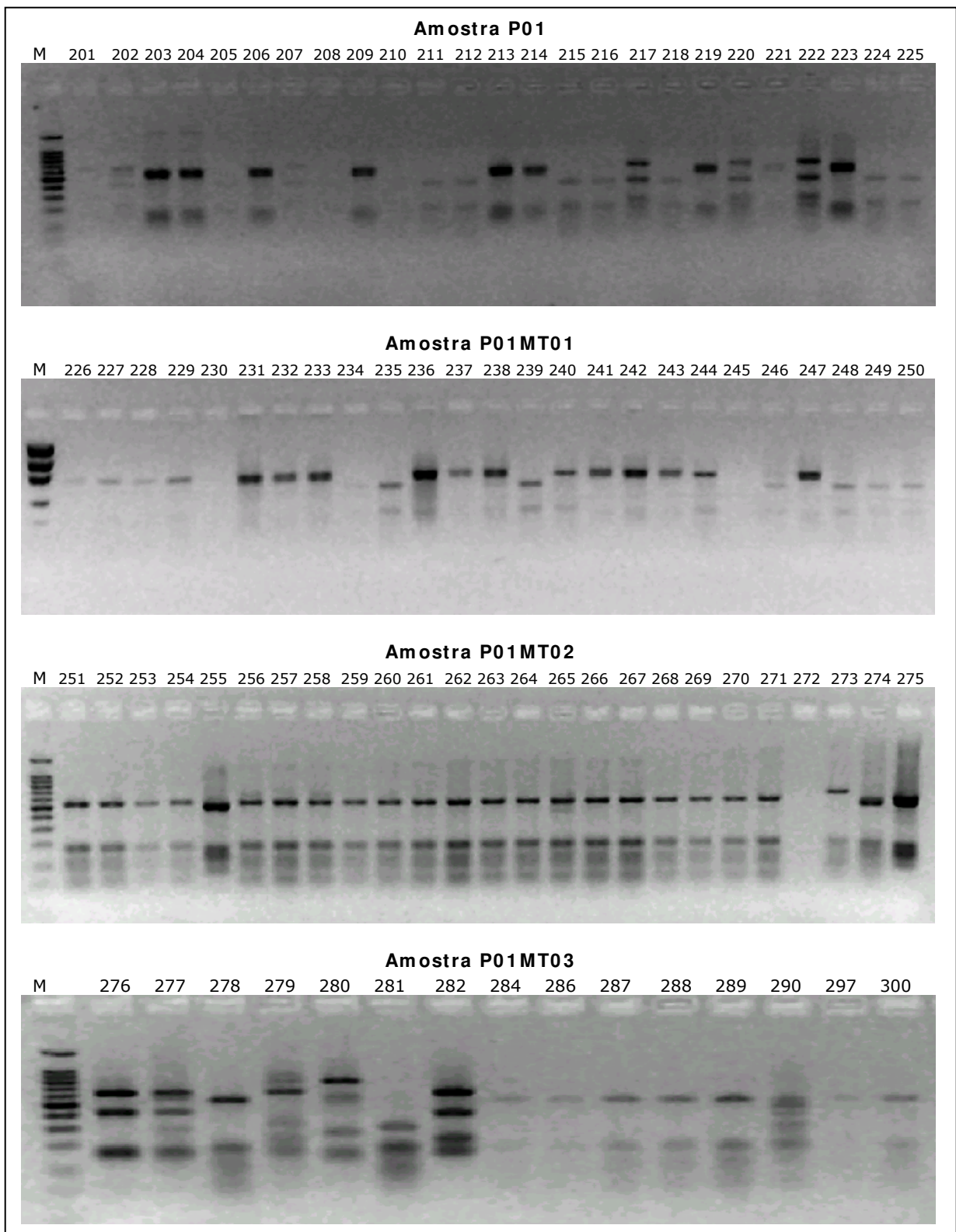


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease *Msp* I após a amplificação do gene 16S rRNA. M – marcador molecular 1Kb Ladder. Os números acima das canaletas correspondem aos isolados das amostras de TPA na profundidade de 20-40cm.

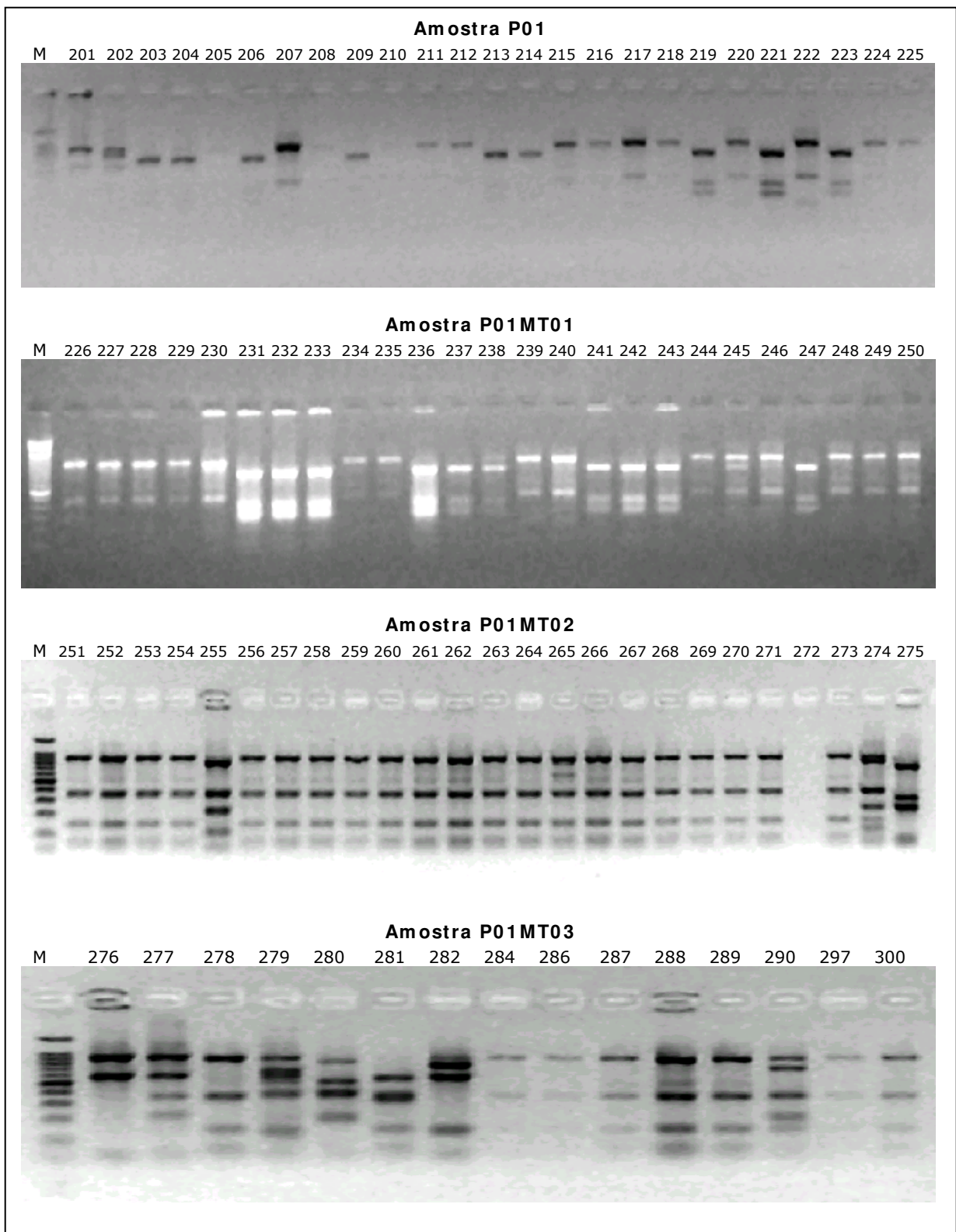


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease *Taq* I após a amplificação do gene 16S rRNA. M – marcador molecular 1Kb Ladder. Os números acima das canaletas correspondem aos isolados das amostras de TPA na profundidade de 20-40cm.

Tabela 8. Análise de polimorfismo do DNA genômico, através de enzimas de restrição, nos isolados de bactérias de TPA na profundidade de 20-40cm.

Amostra	Isolados homólogos
P01	201
	202
	203 e 204
	205; 211; 212; 215 e 216
	206; 209; 213 e 214
	207; 217; 218; 220 e 222
	219; 221 e 223
	220 e 222
	224 e 225
P01MT01	226; 227; 228; 229; 230; 239 e 240
	231; 232; 233; 236; 237; 238; 241; 242; 243 e 247
	234; 235; 244; 248; 249 e 250
	245 e 246
P01MT02	251; 252; 253; 254; 256; 257; 258; 259; 260; 261; 262; 263; 264; 265; 266; 267; 268; 269; 270; 271 e 273
	255
	274
	275
P01Mt03	276
	277
	278; 284; 286; 287; 288; 289; 297 e 300
	279
	280
	281
	282
	290

Após o seqüenciamento as seqüências geradas foram editadas removendo as bases de baixa qualidade (<20) através dos programas Phred/Phrap/Consed em sistema operacional Linux e então analisadas pelo BLASTn contra a base de dados do NCBI.

A população de actinobactérias encontrada nas amostras de solo de TPA não foi diferente entre as camadas estudadas como mostram as Tabelas 3a, 6a e 9a, porém foi encontrado uma população um pouco maior na camada intermediária do que na camada mais superficial e um decréscimo desta população na camada inferior estudada, comprovando que estes microrganismos são altamente aeróbios.

Tabela 9a. População de actinobactérias encontradas em TPA na profundidade de 20-40cm.

Amostra 20-40cm	Isolado	Microorganismo	% de identidade pelo NCBI
P01	205; 211; 212; 215 e 216	<i>Arthrobacter</i> sp	96
P01MT01	234; 235; 244; 248; 249 e 250	<i>Arthrobacter</i> sp	96
P01MT02	251; 252; 253; 254; 256; 257; 258; 259; 260; 261; 262; 263; 264; 265; 266; 267; 268; 269; 270; 271 e 273	<i>Arthrobacter</i> sp	98
P01Mt03	278; 284; 286; 287; 288; 289; 297 e 300	<i>Arthrobacter</i> sp	98
	281	<i>Streptomyces purpeofuscus</i>	98

Tabela 9b. População de bactérias encontradas em TPA na profundidade de 20-40cm.

Amostra 20-40cm	Isolado	Microrganismo	% de identidade pelo NCBI
P01	201	<i>Bacillus</i> sp	98
	202	<i>Bacillus cereus</i>	99
	203 e 204	<i>Variovorax</i> sp	99
	206; 209; 213 e 214	<i>Variovorax</i> sp	99
	207; 217; 218; 220 e 222	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99
	219; 221 e 223	<i>Variovorax</i> sp	99
	224 e 225	<i>Staphylococcus</i> sp	91
P01MT01	226; 227; 228; 229; 230; 239 e 240	<i>Pseudomonas veronii</i>	99
	231; 232; 233; 236; 237; 238; 241; 242; 243 e 247	<i>Variovorax</i> sp	99
	245 e 246	<i>Variovorax</i> sp	95
P01MT02	255	<i>Dyella japonica</i>	99
	274	<i>Dyella japonica</i>	96
	275	<i>Janthinobacterium</i> sp	99
P01MT03	276	<i>Bacillus fusiformis</i>	98
	277	<i>Bacillus sphaericus</i>	98
	279	<i>Paenibacillus</i> sp	92
	280	<i>Brevibacillus brevis</i>	99
	282	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99
	290	<i>Janthinobacterium</i> sp	96

A presença de *Staphylococcus epidermidis*, uma bactéria patogênica normalmente encontrada na microflora da faringe de serpentes, que é responsável por infecções nosocomiais (Echeverrigaray et al., 2005), em TPA além de indicar a presença de répteis nos sítios de TPAs, esta bactéria também produz enzimas proteolíticas, que hidrolisa proteínas e contribui para a fertilidade do solo.

Na Tabela 10 e Figura 17 observa-se o número total de microorganismos encontrados nas amostras de TPA na profundidade de 20-40cm, que mostra a

grande população de bactérias do gênero *Arthrobacter*, porém um pouco menor que a população de bactérias não pertencentes à ordem das *Actinomycetales*.

Tabela 10. Bactérias isoladas nas amostras de TPA na profundidade de 20-40cm com os números de isolados encontrados.

TPA 20-40cm	Microrganismo	No. de isolados
Actinobactérias	<i>Arthrobacter</i> sp.	40
	<i>Streptomyces purpeofuscus</i>	1
Outras bactérias	<i>Bacillus</i> sp.	1
	<i>Bacillus cereus</i>	1
	<i>Variovorax</i> sp	21
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5
	<i>Staphylococcus</i> sp.	2
	<i>Pseudomonas veronii</i>	7
	<i>Dyella japonica</i>	2
	<i>Janthinobacterium</i> sp.	2
	<i>Bacillus fusiformis</i>	1
	<i>Bacillus sphaericus</i>	1
	<i>Paenibacillus</i> sp.	1
	<i>Brevibacillus brevis</i>	1
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1

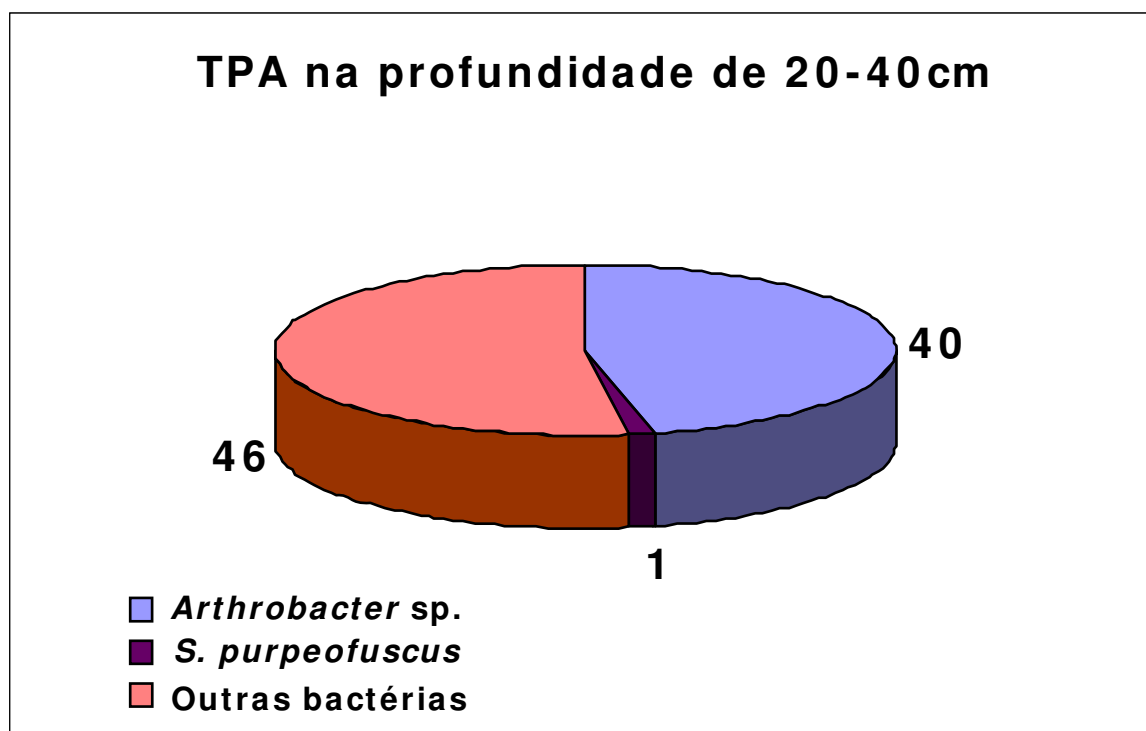


Figura 17. Número de actinobactérias encontradas em amostras de TPA na profundidade de 20-40cm incluindo-se as bactérias não pertencentes à ordem das *Actinomycetales*.

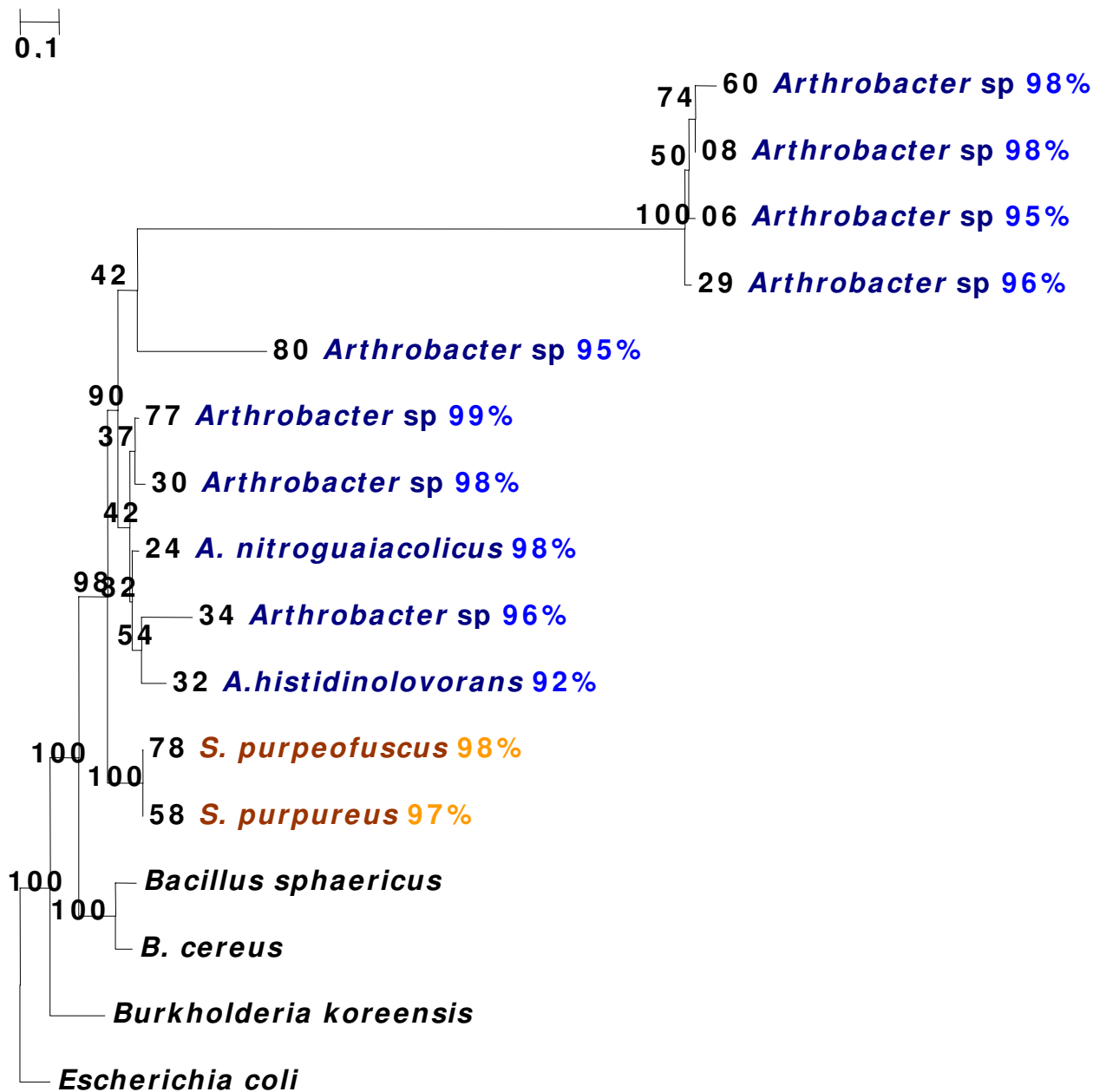


Figura 18a. Árvore filogenética baseada na sequência do gene 16S rRNA de isolados de actinobactérias (com suas respectivas porcentagens de homologia pelo NCBI), *Bacillus* e *Burkholderia* encontrados em TPA na profundidade de 0-10cm, construída pelo método "Neighbour Joining". A árvore foi enraizada utilizando-se o gene 16S rRNA de *E. coli* como um grupo externo. Os valores acima das linhas são valores de bootstrap obtidos com 100 replicações.

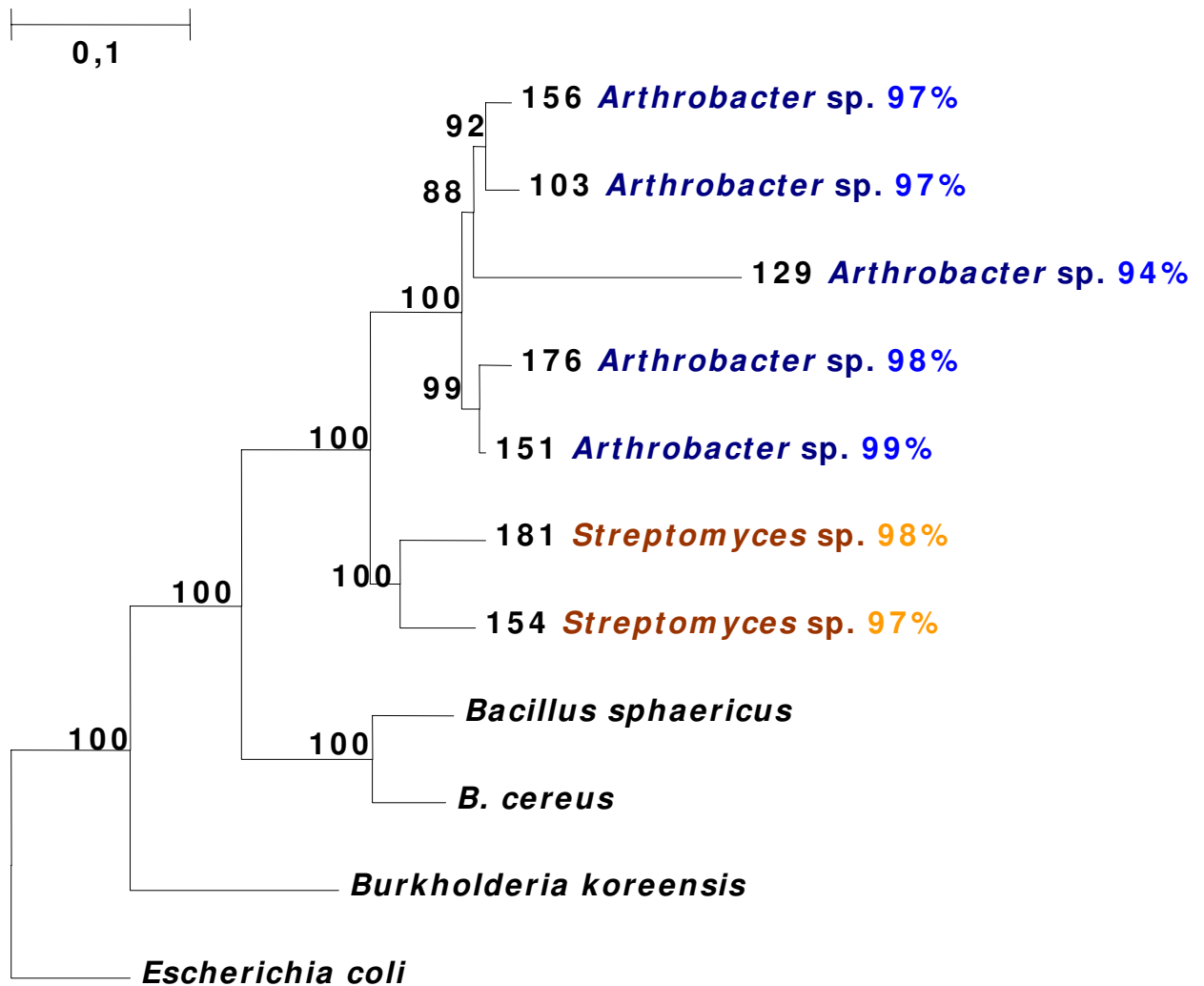


Figura 18b. Árvore filogenética baseada na sequência do gene 16S rRNA de isolados de actinobactérias (com suas respectivas porcentagens de homologia pelo NCBI), *Bacillus* e *Burkholderia* encontrados em TPA na profundidade de 10-20cm, construída pelo método "Neighbour Joining". A árvore foi enraizada utilizando-se o gene 16S rRNA de *E. coli* como um grupo externo. Os valores acima das linhas são valores de bootstrap obtidos com 100 replicações.

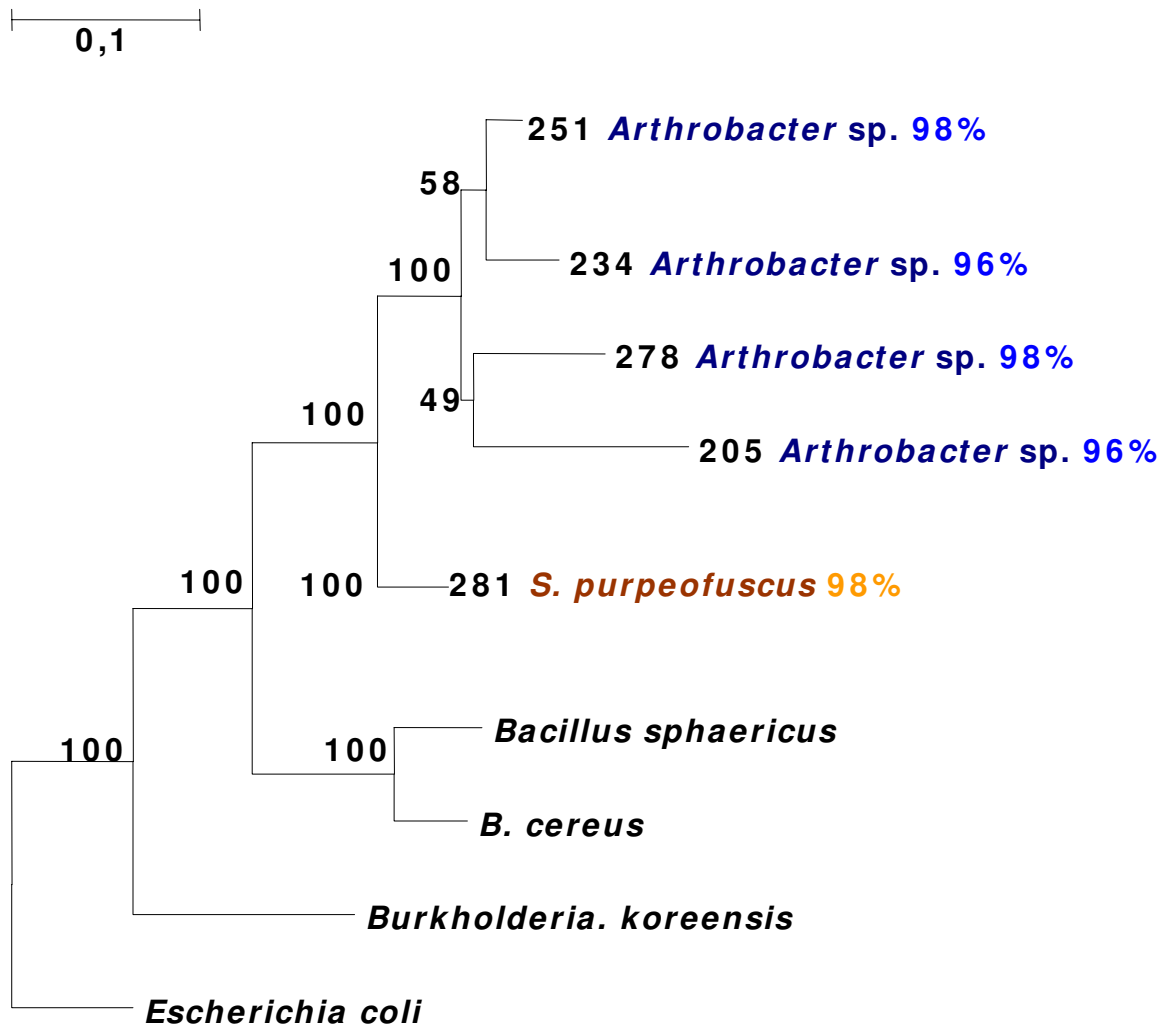


Figura 18c. Árvore filogenética baseada na seqüência do gene 16S rRNA de isolados de actinobactérias (com suas respectivas porcentagens de homologia pelo NCBI), *Bacillus* e *Burkholderia* encontrados em TPA na profundidade de 20-40cm, construída pelo método "Neighbour Joining". A árvore foi enraizada utilizando-se o gene 16S rRNA de *E. coli* como um grupo externo. Os valores acima das linhas são valores de bootstrap obtidos com 100 replicações.

Nas árvores filogenéticas dos isolados de actinobactérias das amostras de TPA, (Figuras 18a; 18b e 18c), todos os gêneros de bactérias apresentados

agruparam-se, porém na Figura 18a pode-se observar uma grande distância entre os isolados e que um grupo de bactérias do genero *Arthrobacter* (isolados 60, 08, 06 e 29) distanciou-se das demais bactérias de mesmo gênero, sugerindo espécies relativamente diferentes das demais, além da grande distância entre os isolados.

5.3 População bacteriana em solo adjacente a TPA

Nas amostras de solo adjacente a TPA também foi notada a presença de actinobactérias, todavia, em menor quantidade da encontrada nas amostras de TPA, como mostram os resultados a seguir:

A identificação de diferentes isolados foi feita a partir dos 25 isolados de cada amostra de solo, resultando assim, em 75 isolados que posteriormente foram seqüenciados.

Alguns isolados não apresentaram forte identidade frente ao banco de dados do NCBI, que supostamente podem ser microrganismos ainda nunca catalogados, visto que apenas 1% de toda a microbiota é conhecida.

Diferentemente da TPA, o solo adjacente mostrou ter uma população de actinobactérias maior em camadas inferiores a superficial, como mostram as Tabelas 12a, 15a e 18a, mas apesar de ter a população maior em camadas inferiores, ainda é menor do que as encontradas nas TPAs.

A microbiota do solo adjacente a TPA é bem semelhante, porém com uma população maior de bactérias não *Actinomycetales*, visto que a ocorrência de actinobactérias em solos TPA é maior. A população de bactérias não identificadas como actinobactérias em solo adjacente estão descritas nas Tabelas 12b, 15b e 18b.

5.3.1 Profundidade de 0-10cm

O solo adjacente investigado mostrou a presença de actinobactérias, todavia, em menor ocorrência da encontrada nas amostras de TPA, como mostram os resultados a seguir.

Tabela 11. Análise de polimorfismo do DNA genômico, através de enzimas de restrição, nos isolados de bactérias de solo adjacente a TPA na profundidade de 0-10cm.

Amostra	Isolados homólogos
P02	301; 302; 303; 304; 305; 306; 307; 308 e 309
	310; 311; 312; 313; 314; 315; 316; 317; 318; 320; 321; 322; 323; 324 e 325
	319
P02MT01	326
	327
	328
	329
	330; 336 e 350
	331 e 337
	332; 333; 334; 338; 339; 340; 341; 342; 344; 345; 247 e 348
	335 e 343
	246
	349
P02MT02	351
	352
	353
	354
	355
	356
	357
	358; 359; 360; 361; 362; 363; 364; 367; 368; 369; 370; 371; 374 e 375
	365; 366; 372 e 373
P02MT03	376
	377; 378 e 380
	379; 392; 393 e 394
	381; 382 e 383
	384
	385
	386; 387 e 388
	389; 390; 391; 398; 399 e 400
	395; 396 e 397

A tabela 11 foi confeccionada analisando-se as Figuras 19 e 20, apresentadas em seguida.

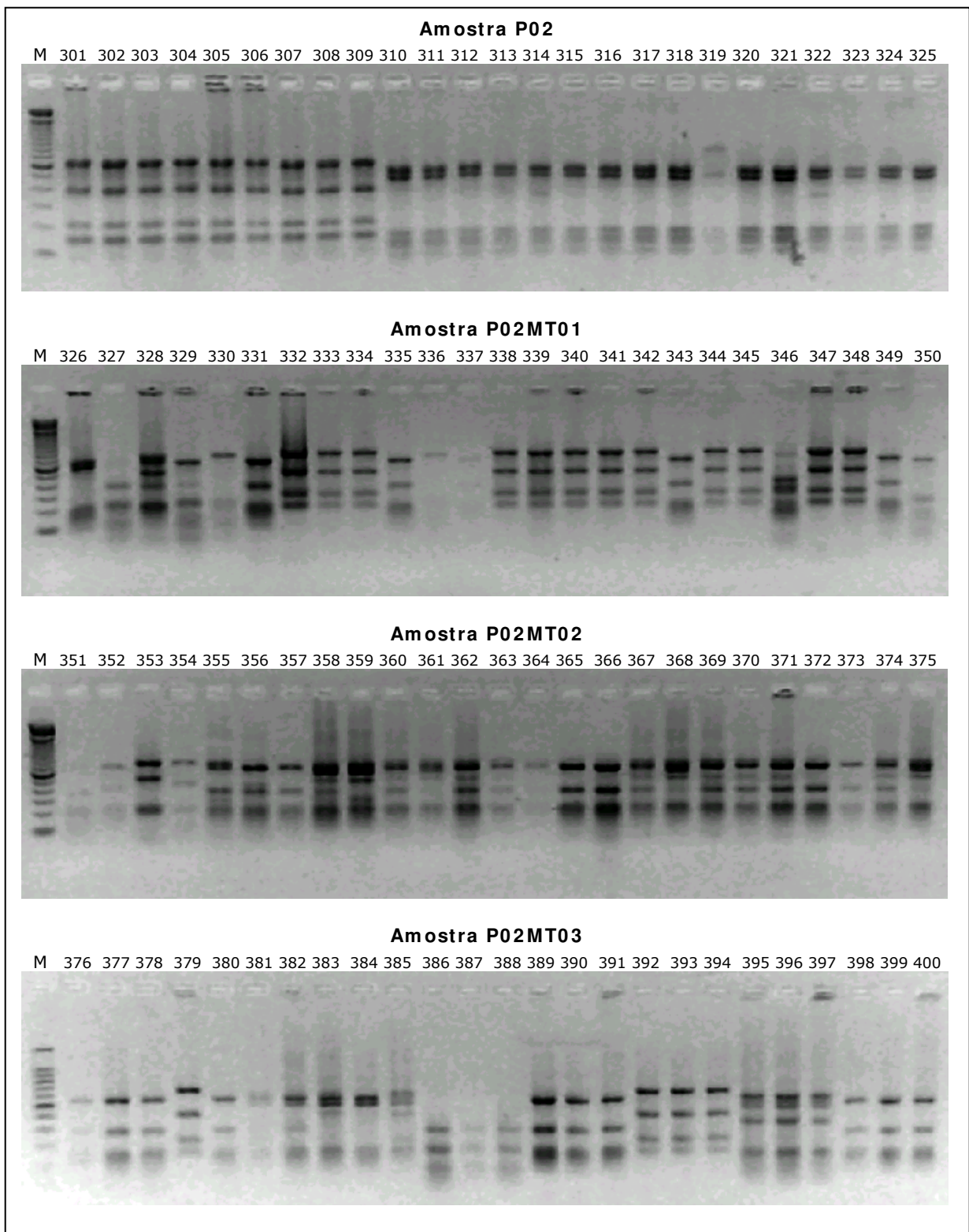


Figura 19. Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease *Msp* I após a amplificação do gene 16S rRNA. M – marcador molecular 1Kb Ladder. Os números acima das canaletas correspondem aos isolados das amostras de solo adjacente a TPA na profundidade de 0-10cm.

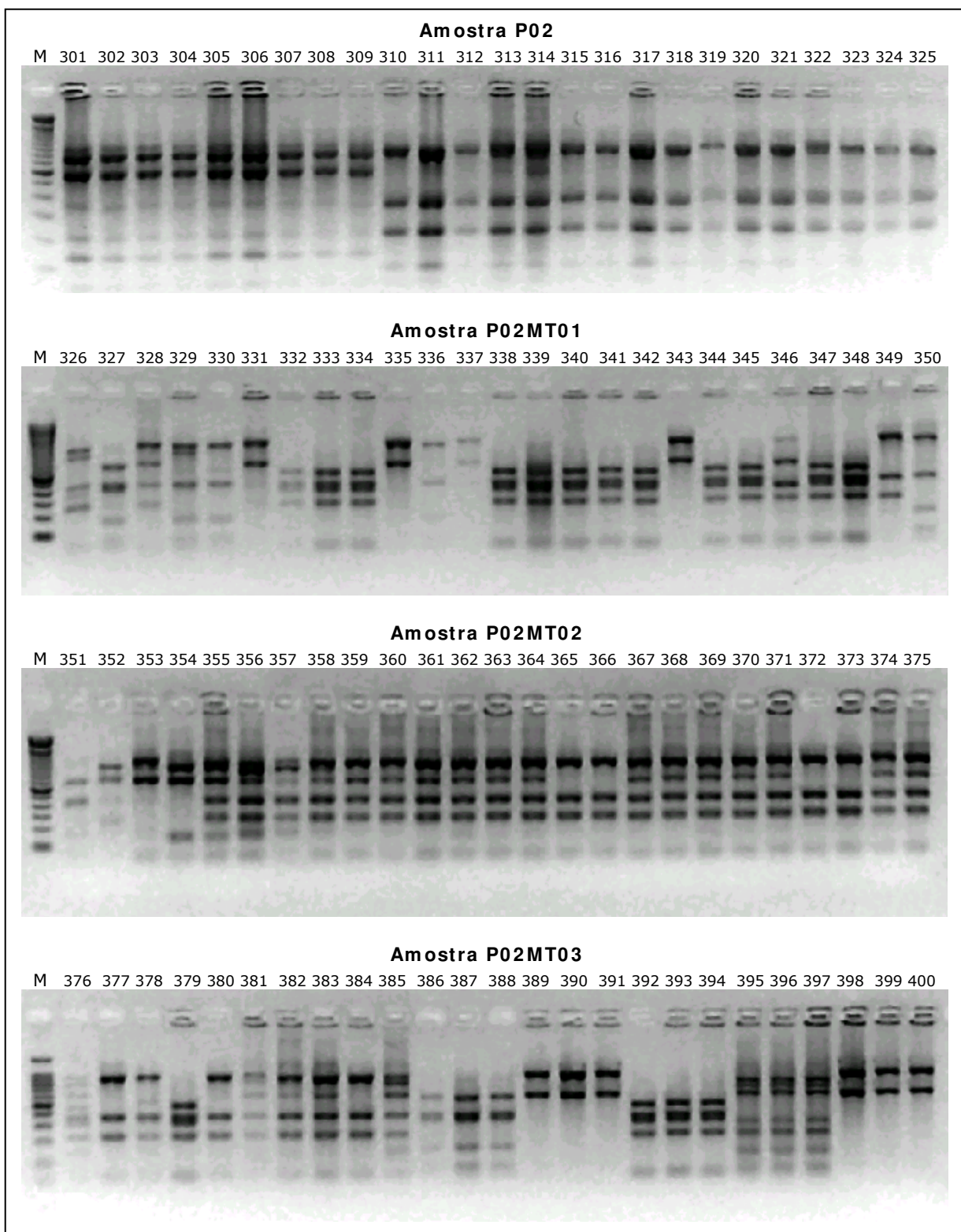


Figura 20. Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease *Taq* I após a amplificação do gene 16S rRNA. M – marcador molecular 1Kb Ladder. Os números acima das canaletas correspondem aos isolados das amostras de solo adjacente a TPA na profundidade de 0-10cm.

Assim como nas amostras de TPA foram investigados 3 profundidades de solo obtendo-se 100 isolados de bactérias em cada amostra, as condições utilizadas foram as mesmas que no isolamento de bactérias nas TPAs: meio de cultivo, tipo de plaqueamento, temperatura e tempo de incubação. Nestes solos a ocorrência de actinobactérias foi da ordem de 6% na camada mais superficial estudada. Das 24 amostras analisadas apenas 3, na profundidade de 0-10cm indicaram a presença de actinobactérias como apresentado a Tabela 12b.

A ocorrência dos gêneros de actinobactérias foi semelhante às encontradas em TPA. Foi também notada a ocorrência da bactéria *Streptomyces aureofaciens* que é conhecida produtora de tetraciclina. As tetraciclinas são derivadas de hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, compostos por um núcleo tetracíclico linear (anéis A, B, C e D) aos quais uma variedade de grupos funcionais está ligada. As primeiras tetraciclinas descobertas foram a clorotetraciclina e a oxitetraciclina, em 1948, a partir de culturas do *Streptomyces aureofaciens* e *S. rimosus*, respectivamente. Alguns anos mais tarde, outras tetraciclinas foram identificadas, sendo estas obtidas naturalmente de microrganismos ou como produtos de processos semi-sintéticos. A tetraciclina pode ser obtida por fermentação de *Streptomyces aureofaciens*, *S. rimosus* e *S. viridofaciens*, ou por processo semi-sintético a partir da clorotetraciclina, que também é produzida por esta bactéria, que também é conhecida por produzir aureofacina, uma substância antifúngica (<http://www.helicobacter.com.br>).

Tabela 12a. População de actinobactérias encontradas em solo adjacente TPA na profundidade de 0-10cm.

Amostra 0-10cm	Isolado	Microrganismo	% de identidade pelo NCBI
P02MT01	327	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	99
	329	<i>Arthrobacter</i> sp	99
P02MT02	351	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	97
P02Mt03	386; 387 e 388	<i>Streptomyces</i> sp	98

Tabela 12b. População de bactérias encontradas em solo adjacente a TPA na profundidade de 0-10cm.

Amostra 0-10cm	Isolado	Microrganismo	% de identidade pelo NCBI
P02	301; 302; 303; 304; 305; 306; 307; 308 e 309	<i>Bacillus cereus</i>	99
	310; 311; 312; 313; 314; 315; 316; 317; 318; 319; 320; 321; 322; 323; 324 e 325	<i>Pseudomonas putida</i>	99
P02MT01	326	<i>Pseudomonas sp</i>	96
	328	<i>Bacillus sphaericus</i>	94
	330; 336 e 350	<i>Leifsonia xyli</i>	99
	331 e 337	<i>Burkholderia sp</i>	96
	332; 333; 334; 338; 339; 340; 341; 342; 344; 345; 247 e 348	<i>Rhizobium rhizogenes</i>	99
	335 e 343	<i>Burkholderia sp</i>	98
	346	<i>Burkholderia sp</i>	97
	349	<i>Burkholderia sp</i>	99
P02MT02	352	<i>Streptococcus mitis</i>	99
	353	<i>Bacillus sphaericus</i>	99
	354	<i>Paenibacillus kribbensis</i>	99
	355	<i>Paenibacillus chibensis</i>	93
	356	<i>Burkholderia sp</i>	97
	357	<i>Burkholderia sp</i>	97
	358; 359; 360; 361; 362; 363; 364; 367; 368; 369; 370; 371; 374 e 375	<i>Pseudomonas veronii</i>	98
	365; 366; 372 e 373	<i>Burkholderia koreensis</i>	99
P02MT03	376	<i>Burkholderia sp</i>	96
	377; 378 e 380	<i>Burkholderia sp</i>	97
	379; 392; 393 e 394	<i>Rhizobium rhizogenes</i>	99
	381; 382 e 383	<i>Pseudomonas sp</i>	90
	384	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	99
	385	<i>Bacillus cereus</i>	89
	389; 390; 391; 398; 399 e 400	<i>Burkholderia sp</i>	97
	395; 396 e 397	<i>Paenibacillus kribbensis</i>	93

A bactéria Gram negativa *Burkholderia* é conhecida por causar doenças respiratórias como a broncopneumonia com sepse que é uma infecção com as reações da SSRI (Síndrome Sistêmica De Resposta Inflamatória) de evolução fulminante podendo apresentar uma pneumonia de características agudas com infiltrado neutrofílico formando abscessos nos pulmões, fígado e baço, além de formas crônicas onde se desenvolvem granulomas que simulam os caseosos, de modo localizado, em ossos, linfonodos (granulomas estrelados) e pulmões (Braga & Almeida, 2005). Esta bactéria, estudada por pesquisadores do IPT (Instituto de Pesquisas Tecnológicas), também é conhecida por sua habilidade em produzir altas concentrações de um polímero que serve de matéria-prima para plástico biodegradável, o PH3B (<http://www.ipt.br/inovacao/exemplos/plastico/>).

O gênero *Burkholderia* também é conhecido por ser diazotrófico, ou seja, utiliza o nitrogênio como fonte de seu metabolismo. Com o início da chamada "Revolução Verde" começaram os estudos com estas bactérias ligadas ao solo e mais recentemente com as oriundas das partes aéreas das plantas, tendo sido comprovado que 60% do nitrogênio fixado pela cana-de-açúcar é resultado do metabolismo das bactérias endofíticas da parte aérea (Baldani, 1996). Em solos muito pobres como o da Amazônia, a presença de bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio ajuda a entender tamanha exuberância e riqueza da flora e, conseqüentemente, da fauna (Pavan & Moreira-Filho, 1998).

É sabido que a agricultura nos trópicos é mais dependente de fertilizantes com nitrogênio do que nas regiões de clima temperado, isto porque o alto índice de precipitações e a rápida decomposição de matéria orgânica levam a lixiviação e rápidas perdas do nitrogênio nos fertilizantes aplicados. Desde que os fertilizantes de nitrogênio não são subsidiados no Brasil, muitos genótipos e subseqüentemente variedades comerciais de cereais têm sido selecionados para altas produções agrícolas com índices abaixo de seu requerimento real. Isto favoreceu inconscientemente variedades que obtêm parte do nitrogênio de associações com diazotróficos. Inicialmente isto era atribuído a bactérias da rizosfera, mas parece difícil explicar que de 20 a 40% do nitrogênio utilizado pela planta vem desta associação (Döbereiner, 1997). Durante a década de 80, isto se tornou claro, pois

tais genótipos são colonizados endofiticamente por vários diazotróficos (Döbereiner, 1992), como a bactéria do gênero *Burkholderia* que é hábil em colonizar raízes, polpa e folhas de milho.

Segundo Sobral (2003) a bactéria *Burkholderia gladioli*, está associada a degradação do herbicida glifosato.

Recentemente Chen e colaboradores (2005a) relataram a simbiose da bactéria *Burkholderia* com leguminosas, promovendo nodulação em suas raízes antes relatada quase que exclusivamente por bactérias da família *Rhizobiaceae*.

Em outro trabalho Chen e colaboradores (2005b) relatam a ocorrência de 96% de bactérias do gênero *Burkholderia* em isolados bacterianos de nódulos de raízes de *Mimosa pigra* sugerindo que este gênero de bactéria promove simbiose na planta.

O solo adjacente também investigado mostrou a presença de actinobactérias, todavia, em menor ocorrência da encontrada nas amostras de TPA, como mostram os resultados a seguir.

Tabela 13. Bactérias isoladas nas amostras de solos adjacentes a TPA na profundidade de 0-10cm com os números de isolados encontrados.

ADJ 0-10 cm	Microrganismo	No. de isolados
Actinobactérias	<i>Arthrobacter</i> sp.	1
	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	2
	<i>Streptomyces</i> sp.	3
Outras Bactérias	<i>Bacillus cereus</i>	10
	<i>Pseudomonas putida</i>	16
	<i>Pseudomonas</i> sp.	4
	<i>Bacillus sphaericus</i>	2
	<i>Leifsonia xyli</i>	3
	<i>Burkholderia</i> sp.	18
	<i>Rhizobium rhizogenes</i>	16
	<i>Streptococcus mitis</i>	1
	<i>Paenibacillus kribbensis</i>	4
	<i>Paenibacillus chibensis</i>	1
	<i>Pseudomonas veronii</i>	14
	<i>Burkholderia koreensis</i>	4
	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	1

Na Tabela 13 e Figura 21 observa-se o número total de microrganismos encontrados nas amostras de solo adjacente a TPA na profundidade de 0-10cm, que mostra a grande população de bactérias não pertencentes à ordem das *Actinomycetales*, indicando pouca presença destes microrganismos.

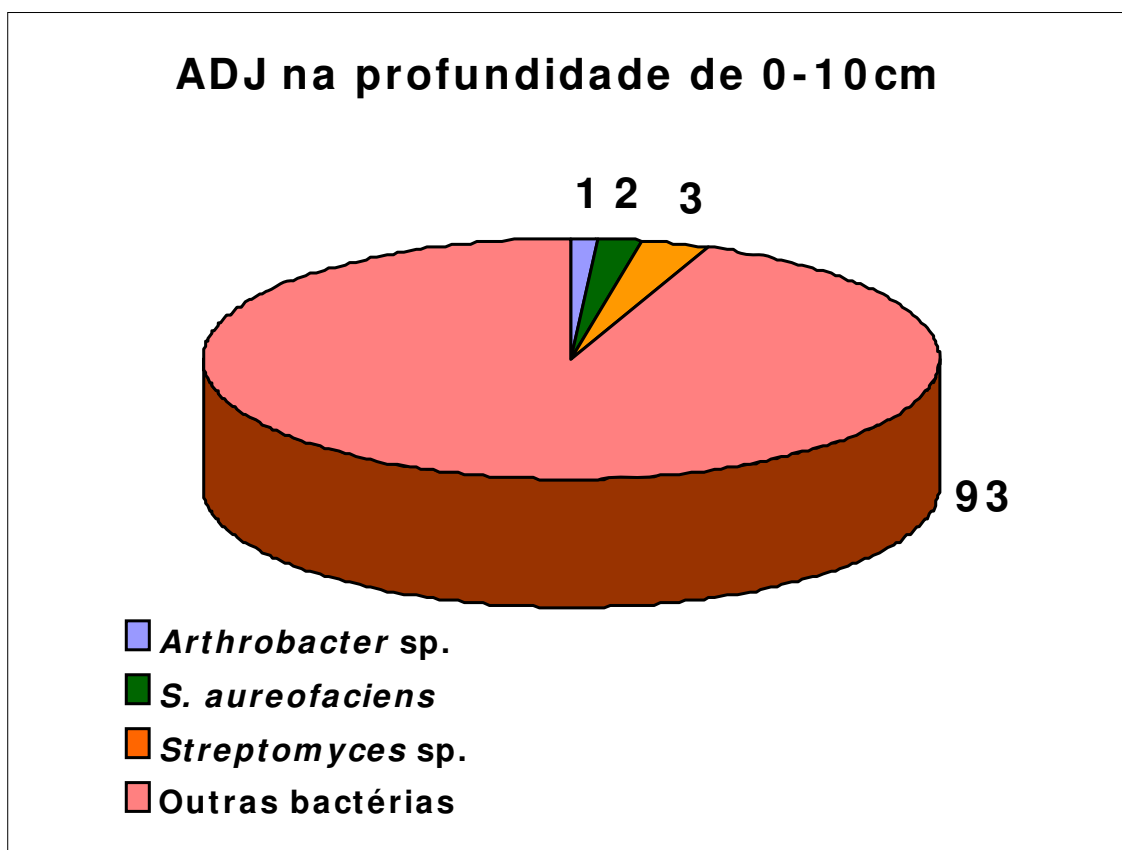


Figura 21. Número de actinobactérias encontradas em amostras de solos adjacentes a TPA na profundidade de 0-10cm incluindo as bactérias não pertencentes à ordem das *Actinomycetales*.

5.3.2 Profundidade de 10-20cm

Tabela 14. Análise de polimorfismo do DNA genômico, através de enzimas de restrição, nos isolados de bactérias de solo adjacente a TPA na profundidade de 10-20cm.

Amostra	Isolados homólogos
P02	401 e 403
	402
	404; 405; 407; 408; 410; 411; 412; 414; 416; 417 e 420
	406
	409
	413
	415
	418; 419; 423; 424 e 425
	421; 422
P02MT01	426; 427; 428; 429; 430; 431; 432; 433; 434; 435; 438; 439; 440; 441; 442 e 447
	436; 437; 443; 444; 445; 446; 448; 449 e 450
P02MT02	451 e 454
	452
	453
	455; 456; 457; 458; 459; 460; 461; 462; 463; 465; 467; 469; 471 e 473
	464; 466; 468; 470; 472 e 474
	475
P02MT03	476
	477; 478; 480; 481; 482; 483 e 484
	479
	485; 486; 487; 489 e 490
	491; 492; 493; 494; 495 e 496
	497; 498; 499 e 500

Após o seqüenciamento as seqüências geradas foram editadas removendo as bases de baixa qualidade (<20) através dos programas Phred/Phrap/Consed em sistema operacional Linux e então analisadas pelo BLASTn contra a base de dados do NCBI.

A tabela 14 foi confeccionada analisando-se as Figuras 22 e 23, apresentadas em seguida.

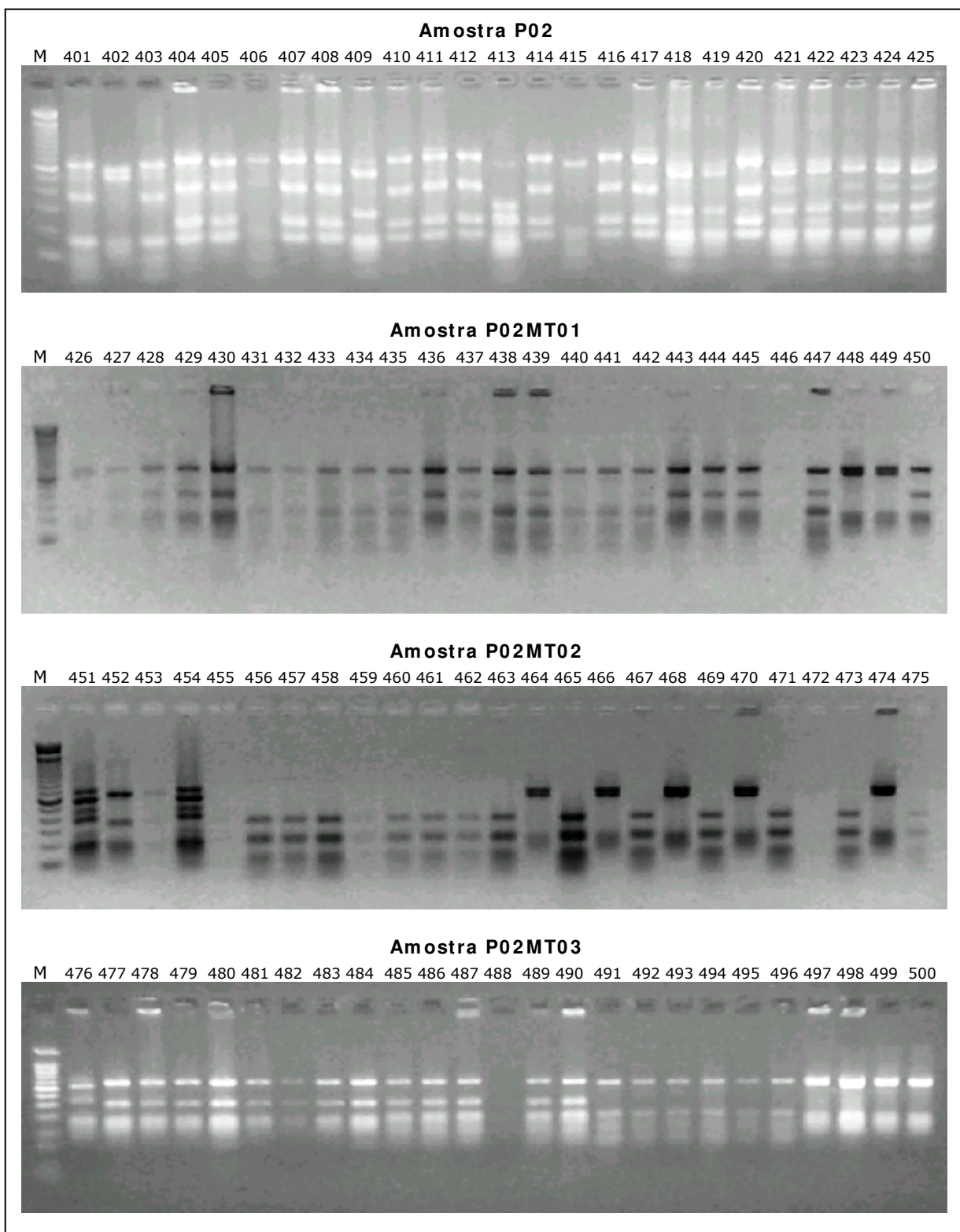


Figura 22. Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease *Msp* I após a amplificação do gene 16S rRNA. M – marcador molecular 1Kb Ladder. Os números acima das canaletas correspondem aos isolados das amostras de solo adjacente a TPA na profundidade de 10-20cm.

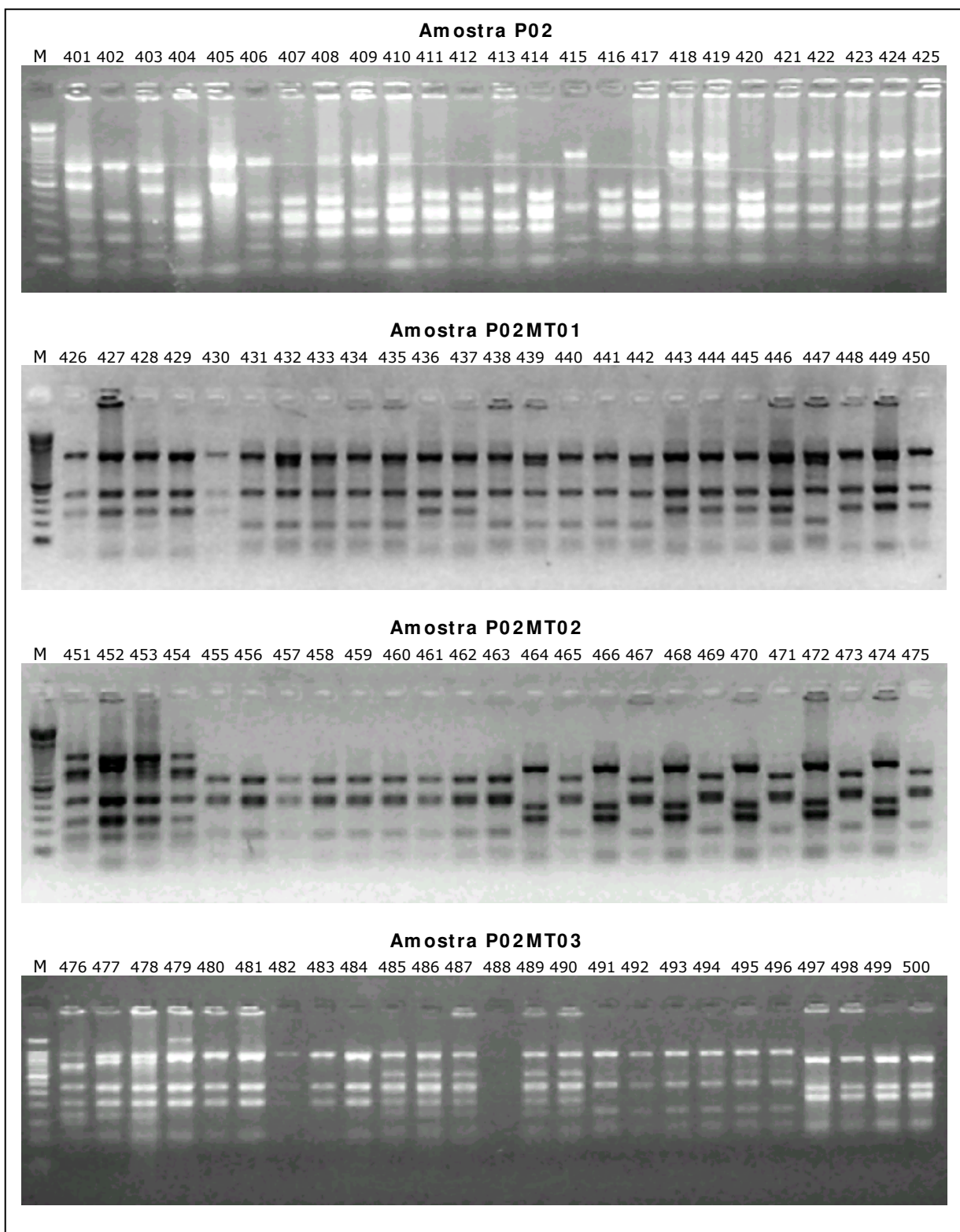


Figura 23. Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease *Taq* I após a amplificação do gene 16S rRNA. M – marcador molecular 1Kb Ladder. Os números acima das canaletas correspondem aos isolados das amostras de solo adjacente a TPA na profundidade de 10-20cm.

Tabela 15a. População de actinobactérias encontradas em solo adjacente a TPA na profundidade de 10-20cm.

Amostra 10-20cm	Isolado	Microrganismo	% de identidade pelo NCBI
P02	406	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	98
P02MT02	455; 456; 457; 458; 459; 460; 461; 462; 463; 465; 467; 469; 471 e 473	<i>Streptomyces</i> sp	96
	475	<i>Corynebacterium xyli</i>	97
P02Mt03	491; 492; 493; 494; 495 e 496	<i>Arthrobacter</i> sp	99

Nestas amostras de solo foi notada a presença de actinobactérias do gênero *Corynebacterium* (Tabela 15a), que é constituído de células pleomórficas, Gram-positivas, imóveis e não esporuladas. As corinebactérias podem se apresentar individualmente, em pares ou paliçadas e sob as formas cocóides, bacilares, e filamentosas. Algumas espécies possuem grânulos metacromáticos que são reservas de fosfatos de elevada energia (Biberstein & Zee, 1994). As bactérias do gênero *Corynebacterium* são utilizadas na produção do ácido glutâmico, substância utilizada em temperos para acentuar o sabor dos alimentos e sintetizam gorduras (Borzani et al., 2001).

Tabela 15b. População de bactérias encontradas em solo adjacente a TPA na profundidade de 10-20cm.

Amostra 10-20cm	Isolado	Microrganismo	% de identidade pelo NCBI
P02	401 e 403	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	98
	402	<i>Pseudomonas</i> sp	99
	404; 405; 407; 408; 410; 411; 412; 414; 416; 417 e 420	<i>Rhizobium rhizogenes</i>	99
	409	<i>Burkholderia koreensis</i>	98
	413	<i>Burkholderia</i> sp	97
	415	<i>Burkholderia</i> sp	94
	418; 419; 423; 424 e 425	<i>Burkholderia</i> sp	95
	421; e 422	<i>Burkholderia</i> sp	96
P02MT01	426; 427; 428; 429; 430; 431; 432; 433; 434; 435; 438; 439; 440; 441; 442 e 447	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	99
	436; 437; 443; 444; 445; 446; 448; 449 e 450	<i>Burkholderia</i> sp	98
P02MT02	451 e 454	<i>Dyella yeojuensis</i>	96
	452	<i>Burkholderia</i> sp	97
	453	<i>Burkholderia</i> sp	95
	464; 466; 468; 470; 472 e 474	<i>Variovorax paradoxus</i>	99
	473	<i>Mesorhizobium loti</i>	99
P02MT03	476	<i>Dyella yeojuensis</i>	97
	477; 478; 479; 480; 481; 482; 483 e 484	<i>Burkholderia</i> sp	97
	485; 486; 487; 489 e 490	<i>Burkholderia phenazinium</i>	83
	497; 498; 499 e 500	<i>Burkholderia</i> sp	95

Na Tabela 16 e Figura 24 observa-se o número total de microrganismos encontrados nas amostras de solo adjacente a TPA na profundidade de 10-20cm, onde pode-se observar a presença de bactérias do gênero *Arthrobacter*, *Streptomyces* e *Corynebacterium* com ocorrência menor de actinobactérias a

encontrada nas amostras de TPA na mesma profundidade, porém um pouco maior que a população actinobactérias encontradas nas camadas de solo superiores.

Tabela 16. Bactérias isoladas nas amostras de solos adjacentes a TPA na profundidade de 10-20cm com os números de isolados encontrados.

ADJ 10-20cm	Microrganismo	No. de isolados
Atinobactérias	<i>Arthrobacter sp.</i>	6
	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	1
	<i>Corynebacterium xyl</i>	1
	<i>Streptomyces sp.</i>	14
Outras bactérias	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	2
	<i>Pseudomonas sp.</i>	1
	<i>Rhizobium rhizogenes</i>	11
	<i>Burkholderia koreensis</i>	1
	<i>Mesorhizobium loti</i>	1
	<i>Burkholderia sp.</i>	32
	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	16
	<i>Dyella yeojuensis</i>	3
	<i>Variovorax paradoxus</i>	6
	<i>Burkholderia phenazinum</i>	5

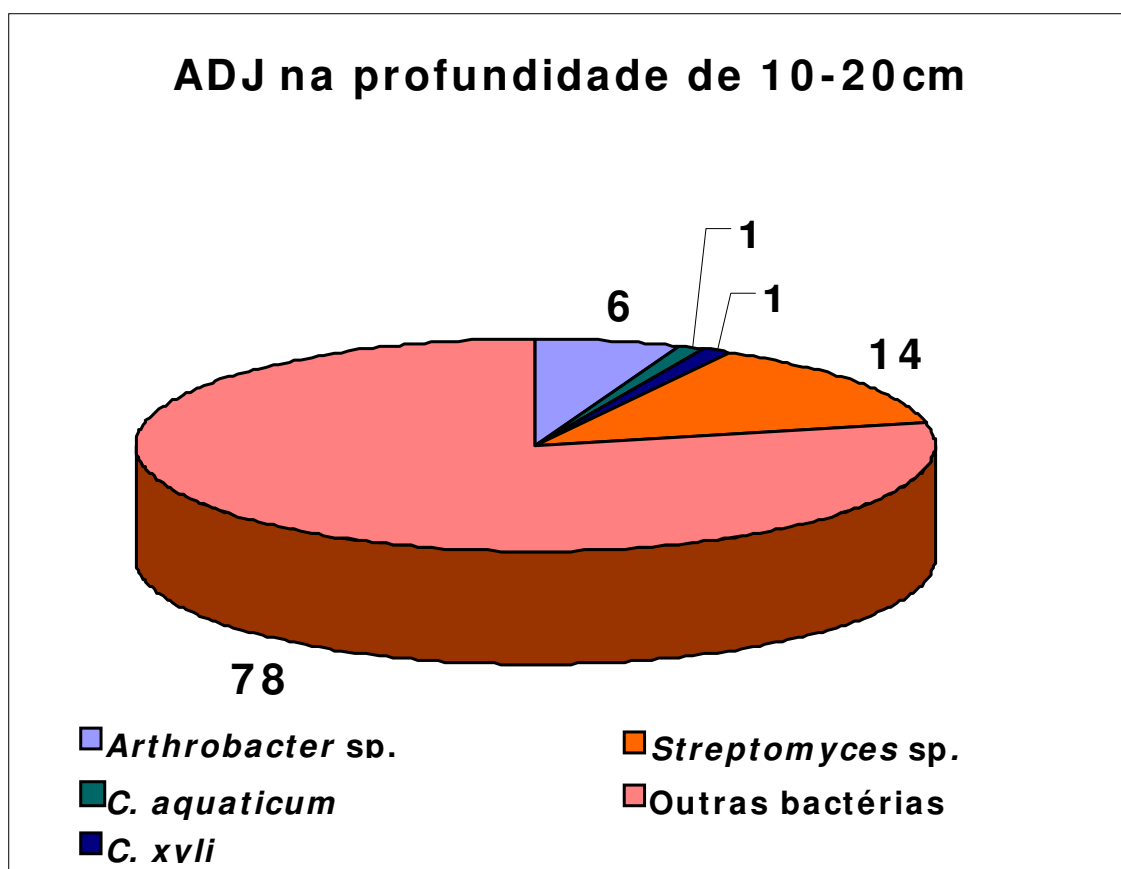


Figura 24. Número de actinobactérias encontradas em amostras de solos adjacentes a TPA na profundidade de 10-20cm incluindo as bactérias não pertencentes à ordem das *Actinomycetales*.

5.3.3 Profundidade de 20-40cm

Tabela 17. Análise de polimorfismo do DNA genômico, através de enzimas de restrição, nos isolados de bactérias de solo adjacente a TPA na profundidade de 20-40cm.

Amostra	Isolados homólogos
P02	501 e 502
	503
	504
	505; 506; 508; 509; 512; 513; 514; 515; 516; 517; 518; 519; 520; 521; 523; 524 e 525
	507
	511 e 522
P02MT01	526; 527; 530; 531; 532; 533; 534; 535; 536; 537; 538; 539; 540; 541; 542; 543; 544 e 545
	528 e 529
	546
	547; 548; 549 e 550
P02MT02	551; 554; 555; 556; 558; 561; 565; 566; 567; 571; 572 e 573
	552; 559 e 563
	553; 560 e 564
	557; 562 568; 569; 570 e 575
	574
P02MT03	577 e 578
	579; 582; 583 e 584
	580
	585; 586; 588; 592 e 600
	581; 587; 591; 594; 595; 597 e 599
	589; 590; 593; 596 e 598

Após o seqüenciamento as seqüências geradas foram editadas removendo as bases de baixa qualidade (<20) através dos programas Phred/Phrap/Consed em sistema operacional Linux e então analisadas pelo BLASTn contra a base de dados do NCBI.

A tabela 17 foi confeccionada analisando-se as Figuras 25 e 26, apresentadas em seguida.

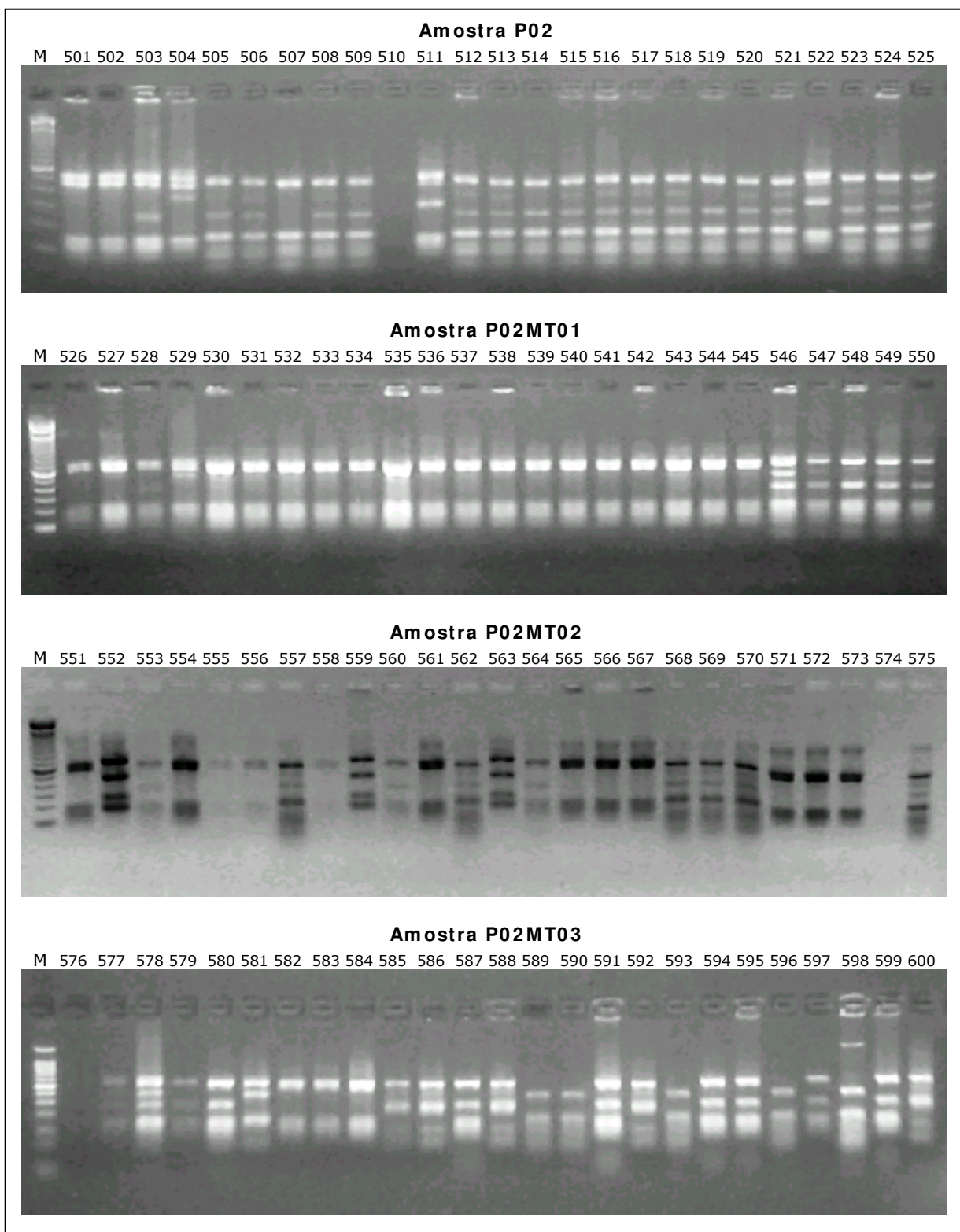


Figura 25. Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease *Msp* I após a amplificação do gene 16S rRNA. M – marcador molecular 1Kb Ladder. Os números acima das canaletas correspondem aos isolados das amostras de solo adjacente a TPA na profundidade de 20-40cm.

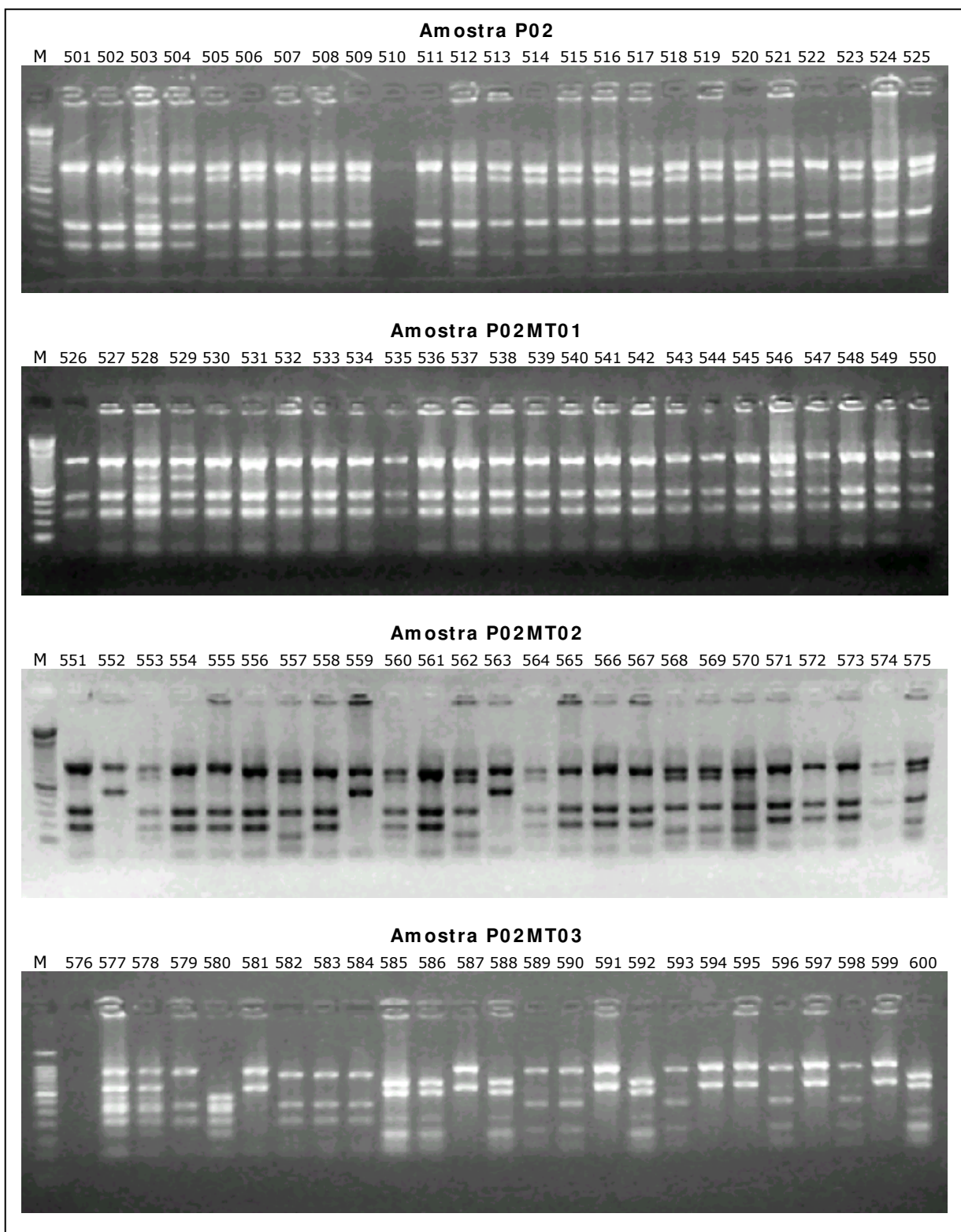


Figura 26. Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease *Taq* I após a amplificação do gene 16S rRNA. M – marcador molecular 1Kb Ladder. Os números acima das canaletas correspondem aos isolados das amostras de solo adjacente a TPA na profundidade de 20-40cm.

Tabela 18a. População de actinobactérias encontradas em solo adjacente a TPA na profundidade de 20-40cm.

Amostra 20-40cm	Isolado	Microrganismo	% de identidade pelo NCBI
P02	505; 506; 508; 509; 512; 513; 514; 515; 516; 517; 518; 519; 520; 521; 523; 524 e 525	<i>Arthrobacter globiformis</i>	93
	507	<i>Arthrobacter sp</i>	98
P02MT02	557; 562 568; 569 e 570	<i>Arthrobacter sp</i>	99
	574 e 575	<i>Arthrobacter sp</i>	98
P02Mt03	589	<i>Arthrobacter sp</i>	98

Foi também notada a presença de *Arthrobacter globiformis* em solo adjacente que é uma bactéria conhecida por degradar compostos bifenilos policlorados (PCBs) altamente poluentes, utilizando-os como fontes de carbono (Ahmed & Focht, 1973; Bedard et al., 1986; Furukawa et al., 1978; Yadav et al., 1995).

Uma outra bactéria encontrada em solo adjacente foi a *Acetonema longum* que foi descrita por Kane & Breznak (1991) como uma bactéria acetogênica.

Tabela 18b. População de bactérias encontradas em solo adjacente a TPA na profundidade de 20-40cm.

Amostra 20-40 cm	Isolado	Microrganismo	% de identidade pelo NCBI
P02	501 e 502	<i>Pseudomonas veronii</i>	99
	503	<i>Pseudomonas veronii</i>	98
	504	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	98
	511 e 522	<i>Pseudomonas lurida</i>	99
P02MT01	526; 527; 530; 531; 532; 533; 534; 535; 536; 537; 538; 539; 540; 541; 542; 543; 544 e 545	<i>Pseudomonas veronii</i>	99
	528 e 529	<i>Burkholderia</i> sp	98
	546	<i>Burkholderia</i> sp	94
	547; 548; 549 e 550	<i>Burkholderia koreensis</i>	98
P02MT02	551; 554; 555; 556; 558; 561; 565; 566; 567; 571; 572 e 573	<i>Pseudomonas veronii</i>	99
	552; 559 e 563	<i>Bacillus mycoides</i>	99
	553; 560 e 564	<i>Burkholderia</i> sp	94
P02MT03	577 e 578	<i>Burkholderia phytotirmans</i>	95
	579; 582; 583 e 584	<i>Burkholderia</i> sp	97
	580	<i>Burkholderia</i> sp	98
	585; 586; 588; 592 e 600	<i>Acetonea longum</i>	92
	581; 587; 591; 594; 595; 597 e 599	<i>Burkholderia</i> sp	97
	589; 590; 593; 596 e 598	<i>Pseudomonas</i> sp.	99

Na Tabela 19 e Figura 27 observa-se o número total de microrganismos encontrados nas amostras de solo adjacente a TPA na profundidade de 20-40cm, onde pode-se observar a presença de bactérias do gênero *Arthrobacter*, com ocorrência maior deste gênero a encontrada nas solo superiores.

Tabela 19. Bactérias isoladas nas amostras de solos adjacentes a TPA na profundidade de 20-40cm com os números de isolados encontrados.

ADJ 20-40cm	Microrganismo	No. de isolados
Actinobactérias	<i>Arthrobacter</i> sp.	9
	<i>Arthrobacter globiformis</i>	17
Outras bactérias	<i>Pseudomonas veronii</i>	33
	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	1
	<i>Pseudomonas lurida</i>	2
	<i>Burkholderia</i> sp.	18
	<i>Burkholderia koreensis</i>	4
	<i>Bacillus mycoides</i>	3
	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	2
	<i>Acetonea longum</i>	5
	<i>Pseudomonas</i> sp.	5

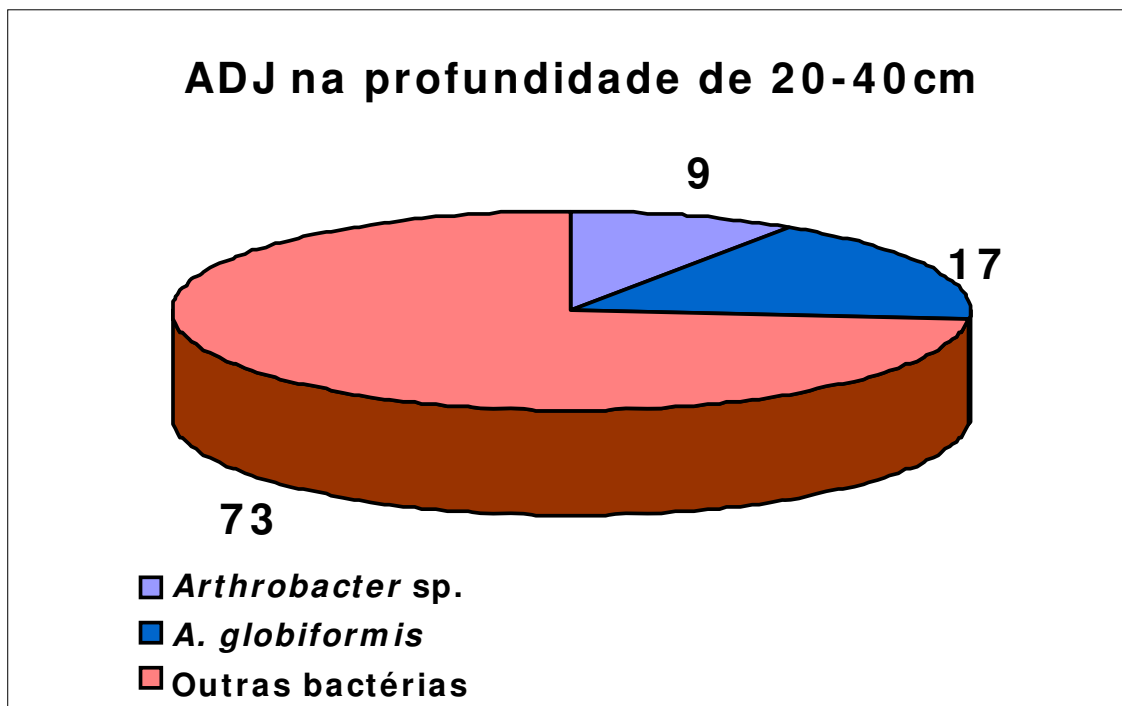


Figura 27. Número de actinobactérias encontradas em amostras de solos adjacentes a TPA na profundidade de 20-40cm incluindo as bactérias não pertencentes à ordem das *Actinomycetales*.

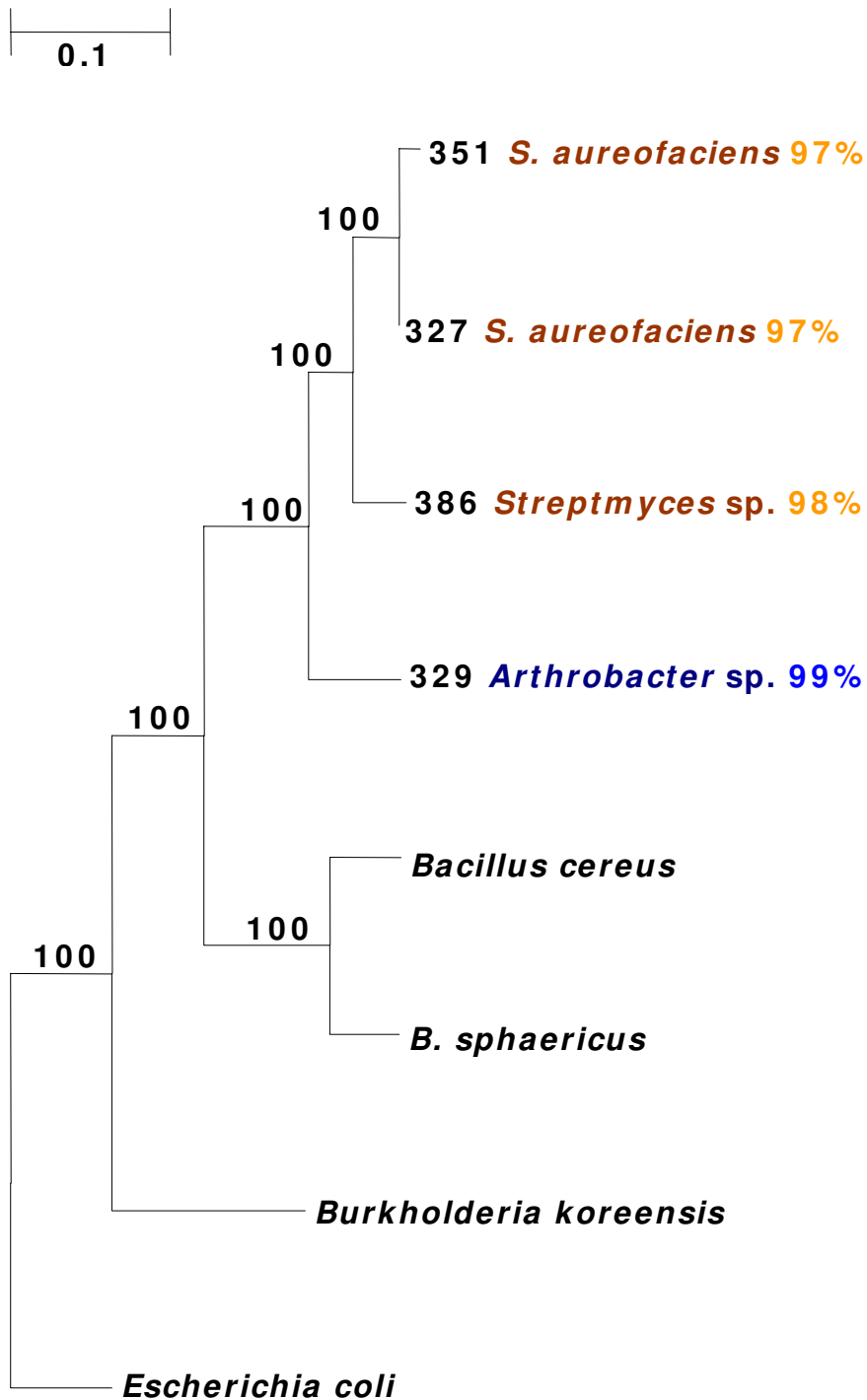


Figura 28a. Árvore filogenética baseada na sequência do gene 16S rRNA de isolados de actinobactérias (com suas respectivas porcentagens de homologia pelo NCBI), *Bacillus* e *Burkholderia* encontrados em solo adjacente na profundidade de 0-10cm, construída pelo método "Neighbour Joining". A árvore foi enraizada utilizando-se o gene 16S rRNA de *E. coli* como um grupo externo. Os valores acima das linhas são valores de bootstrap obtidos com 100 replicações.

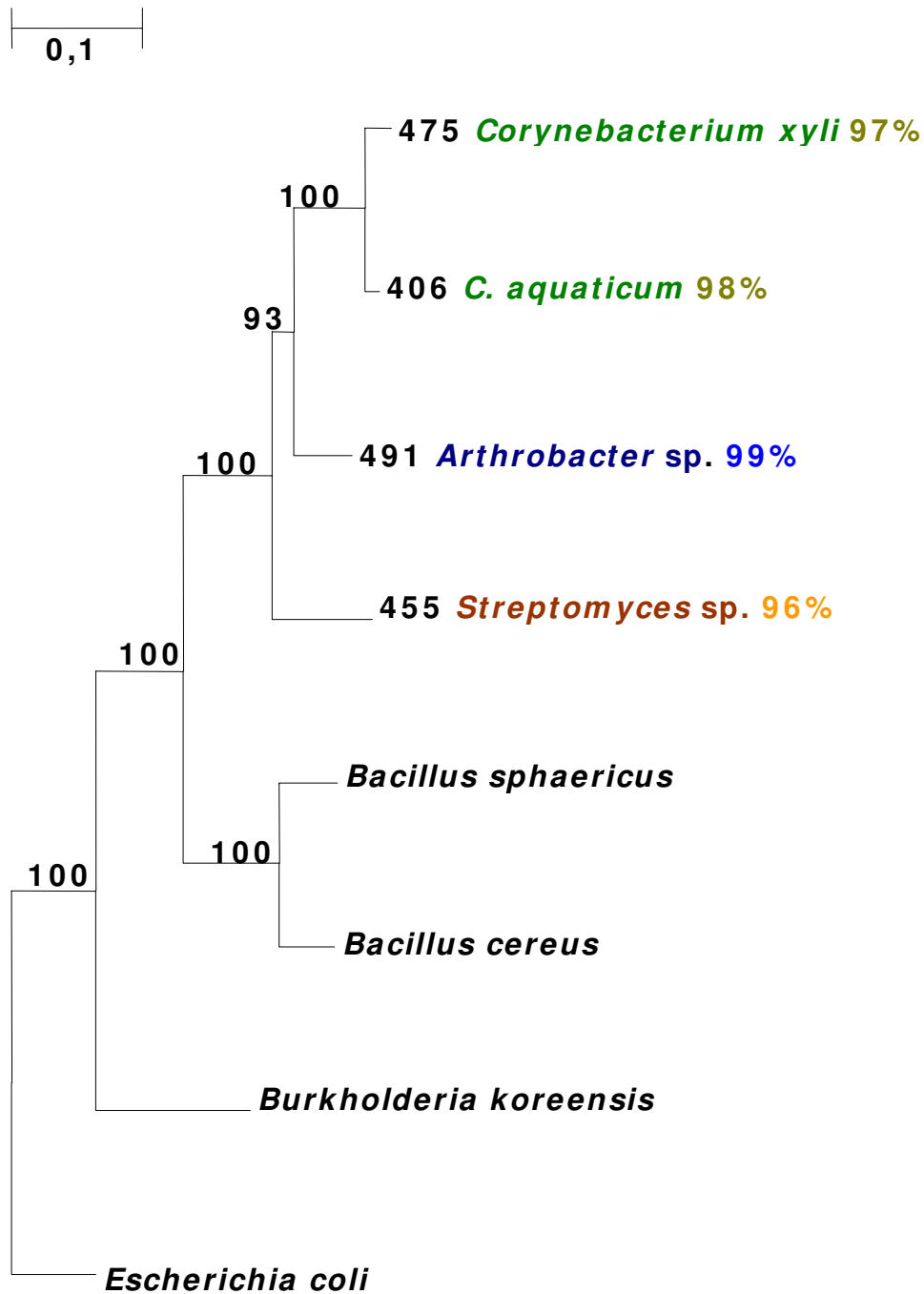


Figura 28b. Árvore filogenética baseada na sequência do gene 16S rRNA de isolados de actinobactérias (com suas respectivas porcentagens de homologia pelo NCBI), *Bacillus* e *Burkholderia* encontrados em solo adjacente na profundidade de 10-20cm, construída pelo método "Neighbour Joining". A árvore foi enraizada utilizando-se o gene 16S rRNA de *E. coli* como um grupo externo. Os valores acima das linhas são valores de bootstrap obtidos com 100 replicações.

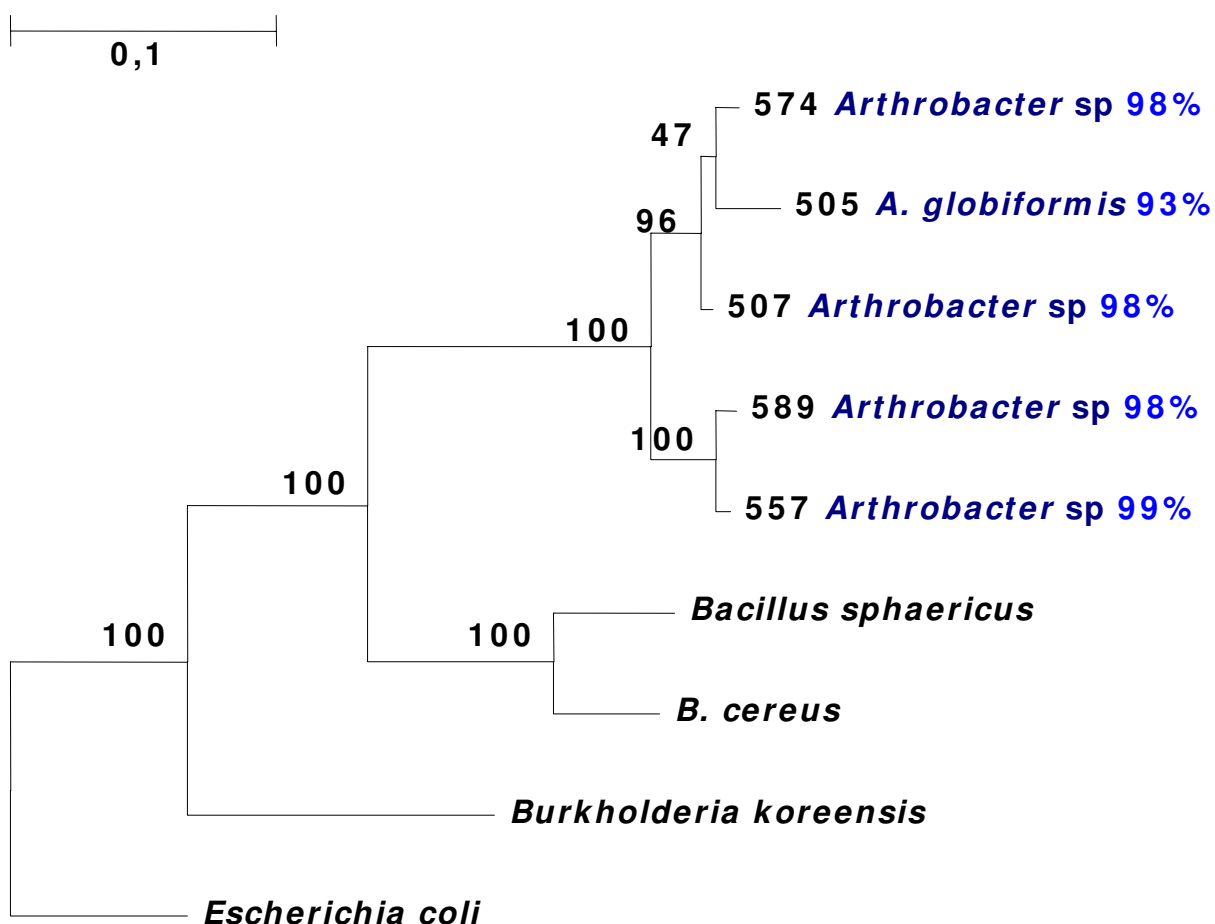


Figura 28c. Árvore filogenética baseada na sequência do gene 16S rRNA de isolados de actinobactérias (com suas respectivas porcentagens de homologia pelo NCBI), *Bacillus* e *Burkholderia* encontrados em solo adjacente na profundidade de 20-40cm, construída pelo método "Neighbour Joining". A árvore foi enraizada utilizando-se o gene 16S rRNA de *E. coli* como um grupo externo. Os valores acima das linhas são valores de bootstrap obtidos com 100 replicações.

Nas árvores filogenéticas dos isolados de actinobactérias das amostras de solo adjacente a TPA, Figuras 28a, 28b e 28c, todas as bactérias agruparam-se em seus respectivos gêneros, confirmando a identidade das mesmas.

A árvore filogenética (Figura 29) representa todos os isolados de actinobactérias das amostras de TPA e solo adjacente, nesta árvore pode-se observar o agrupamento por gêneros, mesmo aquelas bactérias que obtiveram porcentagem de identidade baixa pelo banco de dados do NCBI, sugerindo talvez novas espécies e/ou variedades.

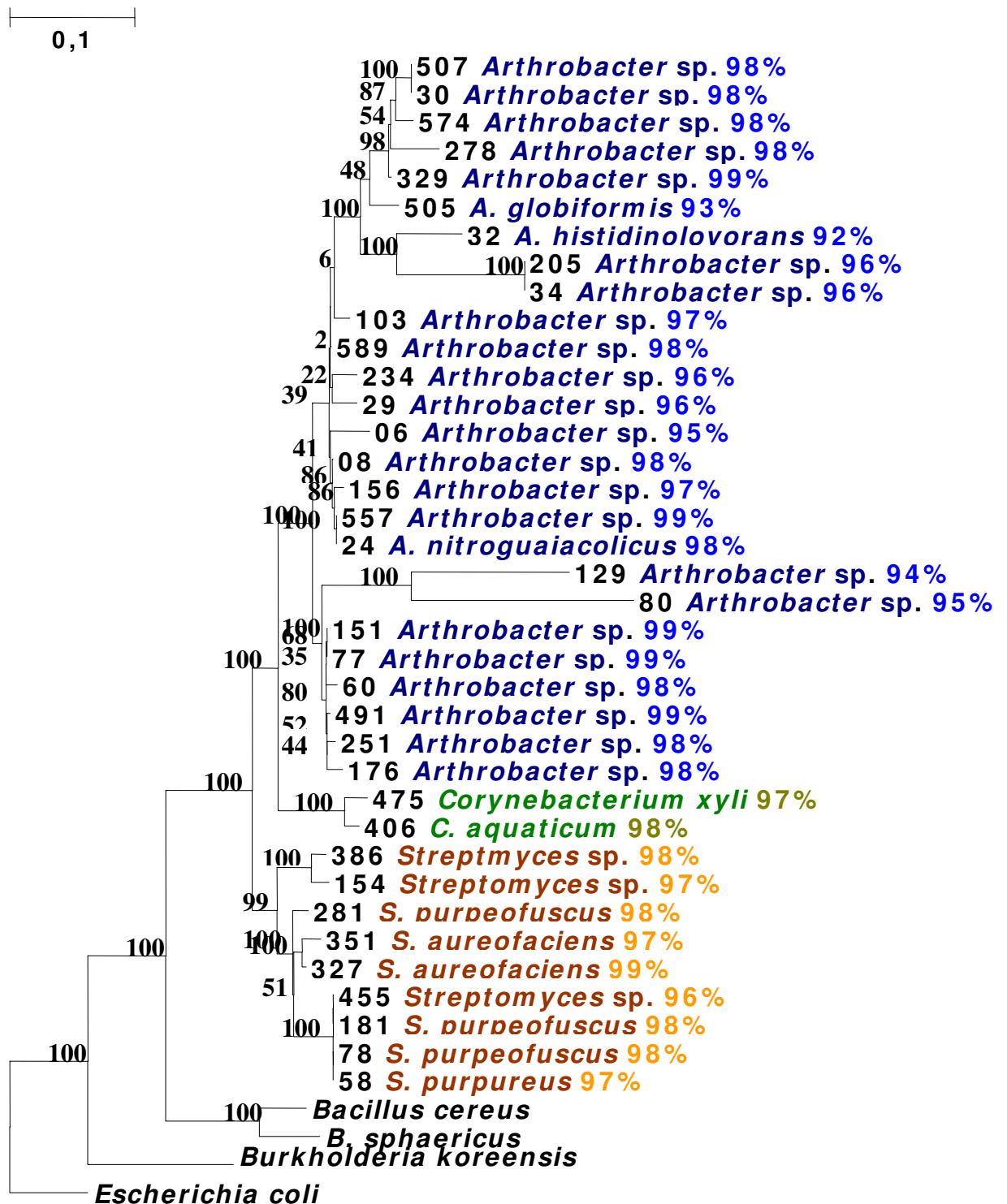


Figura 29. Árvore filogenética baseada na sequência do gene 16S rRNA de isolados de actinobactérias (com sua respectiva porcentagem de homologia pelo NCBI), *Bacillus* e *Burkholderia* encontrados em TPA e solo adjacente construída pelo método "Neighbour Joining". A árvore foi enraizada utilizando-se o gene 16S rRNA de *E. coli* como um grupo externo. Os valores acima das linhas são valores de bootstrap obtidos com 100 replicações.

6. CONCLUSÕES

1. Populações de bactérias pertencentes à ordem das *Actinomycetales* são numericamente superiores em Terra Preta Antropogênica, quando comparada a encontrada em solo adjacente;
2. As actinobactérias estão presentes principalmente nas camadas de 0-10 cm e 10-20 cm, em ambos os solos, diminuindo gradativamente com o aumento da profundidade;
3. Na análise das seqüências geradas pela da amplificação do gene 16S rRNA, ocorreu baixa identidade dos isolados em relação ao banco de dados do NCBI (abaixo de 98%), o que pode ser um indicativo de ocorrência de novas espécies de microrganismos ou variantes, já que estes solos são relativamente pouco estudados;
4. A técnica do ARDRA (Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado) possibilitou observação de polimorfismo de bactérias do mesmo gênero, porém não ao nível de espécie, pois houve variação na identificação dos isolados (%) quando se sequenciou o DNA destes, usando o gene 16S rRNA;
5. Observou-se que, apesar do uso de meio de cultivo seletivo para o isolamento de actinobactérias, este meio não foi específico, podendo haver

crescimento de outros microrganismos não pertencentes à ordem das *Actinomycetales*;

6. A maior diversidade microbiana encontrada nas amostras adjacentes aos solos TPAs pode indicar que outras fontes nutricionais estão presentes neste ambiente, enquanto que nas TPAs parece haver maior predomínio de actinobactérias, cuja razão ainda não está esclarecida.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, M. & FOCHT, D.D. Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of *Achromobacter*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 19, p. 47-52. 1973.

AL-DIWANY, L.J.; UNDSWORTH, B.A.; CROSS, T. A comparison of membrane filters for counting *Thermoactinomyces* endospores in spore suspensions and river water. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 45, p. 249-258, 1978.

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

AMNER, W.; EDWARDS, C.; MCCARTHY, A.J. Improved medium for recovery and enumeration of the farmer's lung organisms, *Saccharomonospora viridis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 2669-2674, 1989.

ANDERSON, A.R.; MOORE L.W. Host specificity in the genus *Agrobacterium*. **Phytopathology**. v. 69, p. 320-323, 1979.

ARAUJO, W.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 229-236, 2001.

AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos In: MELO, IS.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA, CNPMA, 1998.

BALDANI, V.L.D. Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. 1996 234p. Tese (Doutorado) Itaguaí, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996.

BARCINA, I.; IRIBERRI, J.; EGEA, L. Enumeration, isolation and some physiological properties of actinomycetes from sea water and sediment. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 10, p. 85-91, 1987.

BASTOS A.E.R.; ROSSI, A.; TSAI, S.M., LEE, H.; TREVORS, J.T. Salt-tolerant phenol- degrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples. **Archives of Microbiology**, v. 174, p. 346-352. 2000

BEDARD, D.L.; UNTERMAN R.; BOPP, L.H.; BRENNAN, M.J.; HABER, M.L.; JOHNSON, C. Rapid Assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyl. **Applied Environmental. Microbiology**, v. 51, p. 761-768, 1986.

BENSON, D.R. AND SILVESTER, W.B. Biology of *Frankia* strains actinomycete symbionts of actinorhizal plant. **Microbiological Reviews**. v. 57, p. 293-319, 1993

BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.; FRANKENBERGER-JÚNIOR, W.T. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34 n. 1, p. 65-68, 2003

BERGGREN, J.W.; van VUURDE, L. & MARTENSSON, A.M. Factors influencing the effect of deleterious *Pseudomonas putida* rhizobacteria on initial infection of pea roots by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*. *Applied Soil Ecology*, v. 17, p. 97-105, 2001.

BIBERSTEIN, E. L. & ZEE, Y.C. Tratado de microbiologia veterinaria. Zaragoza: Acriba, 1994. p. 157-161.

BLUMER, C.; HASS, D. Mechanism, regulation, and ecological role bacterial cyanide biosynthesis. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 173, p. 170-177, 2002.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, A. **Biotechnologia Industrial – Fundamentos**. São Paulo, Edgard Blücher LTDA. V. 1 2001.

BOUDEMAGH, A.; KITOUNI, M.; BOUGHACHICHE, F.; HAMDIKEN, H.; OULMI, L.; REGHIOUA, S.; ZERIZER, H.; COUBLE, A.; MOUNIEE, D.; BOULAHROUF, A.; BOIRON, P. Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, El_Qued and Ourgla) study of antifungal activity os isolated strains. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 15, p. 39-44, 2005.

BRAGA, M.D.M. & ALMEIDA, P.R.C. First description of an autopsied case of Melioidosis in Ceará State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 38, n. 1, p. 58-60, 2005.

BULL, A.T.; GOODFELLOW, M.; SLATER, J.H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. **Annual Review of Microbiology**, v. 46, p. 219-252, 1992.

CALLAHAM, D.; DEL-TRIDICI, P.; TORREY, J.G. Isolation and cultivation *in vitro* of the actinomycetes causing root nodulation in *Comptonia*. **Science**, v. 199, p. 899-902, 1978.

CAO, L.; QIU, Z.; Y, J.; TAN, H.; ZHOU, S. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. **FEMS Microbiology Letters**, v. 247, p. 147-152, 2005.

CARNEIRO JR, J.B.; SILVEIRA, S.F.; SOUZA FILHO, G.A.; OLIVARES, F.L.; Policlonal antiserum specificity against *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.6, p. 614-619, 2004.

CARRÃO-PANIZZI, M.C. & BORDINGNON, J.R. Activity of beta-glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 873-878, 2000.

CATTELAN, A.J. Aumento no rendimento de grãos de soja e trigo, a campo, através da inoculação com bactérias promotoras do crescimento. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 28., Londrina, 2001. Programa e Resumos. Londrina, 2001. p. 61.

CAVALCANTE, V.A.; DOBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 108, p. 23-31, 1988.

CENTURION, M.A.P.C. Seleção de microrganismos antagônicos à ferrugem (*Uromyces phaseoli* (Reben.) Wint.) do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). 1990. 116 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1990.

CHANWAY, C.P.; SHISHIDO, M.; NAIRN, J.; JUNGWIRTH, S.; MARKHAM, J.; XIAO, G.; HOLL, F.G. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **Forest Ecology and Management**, v. 133, p. 81-88, 2000.

CHATER, K.F.; HOPWOOD, D.A. *Streptomyces*. *In*: SONENSHEIN, A.L.; HOCH, J.A.; LOSICK, R., ed. *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria. s.l.: s.n., 1993. p.83-89.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. The diversity of archae and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, p. 252-263, 2001.

CHEN, C.; BÉLANGER, R.R.; BENHAMOU, N.; PAULITZ, T.C. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 56, p. 13-23, 2000.

CHEN, W.M.; FARIA, S.M.; STRALIOTTO, R.; PITARD, R.M.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; CHOU, J.H.; CHOU, Y.J.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A.R.; ELLIOTT, G.N.; SPRENT, J.I.; YOUNG, J.P.W.; JAMES, E.K. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: A study of novel *Mimosa*-Nodulating strains from South América. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 7461-7471, 2005a.

CHEN, W.M.; JAMES, E.K.; CHOU, J.H.; SHEU, S.Y.; YANG, S.Z.; SPRENT, J.I. β -Rhizobia from *Mimosa nigra*, a newly discovered invasive plant in Taiwan. **New Phytologist**, v. 168, p. 661-675, 2005b.

COELHO, R.R.R.; DROZDOWICZ, A.G. The occurrence of Actinomycetes in a cerrado soil in Brazil. **Review Ecologie et Biologie du Soil**, v. 15, p. 459-473, 1978.

CRAWFORD, D.L. Biodegradation of agricultural and urban wastes. *In*: GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T.; MORDARSKY, M. Actinomycetes in Biotechnology, s. 1. 1988. p. 433-459.

CRAWFORD, D.L.; LYNCH, J.M.; WHIPPS, J.M.; OUSLEY, M.A. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 59. p. 3899-3905, 1993.

CROSS, T. Growth and examination of actinomycetes – some guidelines. *IN*: WILLIAMS, S.T.; SHARP, M.E.; HOLT, J.G., ed. Bergeys' S Manual Of Systematic Bacteriology. 9.ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1989. v.4, p. 2340-2343.

DE CLEENE, M.; DE LEY, J. The host range of infectious hairy-root. **The Botanical Review**. v. 47, p. 147-194, 1981.

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

DE FRANK, J.; PUTNAM, A.R. Screening procedures to identify soil-borne actinomycetes that can produce herbicidal compounds. **Weed Science**, v. 33, p. 271-274, 1985.

DI GIOVANNI, G.D.; WATRUD, L.S.; SEIDLER, R.J. & WIDMER, F. Comparison of parental and transgenic alfalfa rhizosphere bacterial communities using Biolog GN metabolic fingerprinting and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-PCR (ERIC-PCR). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 37, p. 129-139, 1999.

DÖBEREINER J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: Endophytic N₂ fixing bacteria. *Ciência e Cultura* v. 44, p. 310-313, 1992.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: Social and economic contributions, *Soil Biology and Biochemistry*. v. 29, p. 771-774, 1997.

DOYLE, J.J.T.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Foccus**, Rochester, v. 12, p. 13-18, 1990.

ECHEVERRIGARAY, S.; MICHELIN, L.; LAHUDE, M.; ARAUJO, P.; GIOVANAZ, D.; MULLER, G.; DELAMARE, A.P.L.; COSTA, S.O.P. Pathogenicity factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive care units. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 17-23, 2005.

EDWARDS, S.G. & SEDDON, B. Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* in vitro. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 652-659, 2001.

EL-ABYAD, M.; EL SAYED, M.A.; ELSHANSHOURY, A.R.; EL-BATANOUNY, N.H. Inhibitory effects of UV mutants of *Streptomyces corchorusii* and *Streptomyces spiroverticillatus* on bean and banana wilt pathogens. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 71, p. 1080-1086, 1993a.

EL-ABYAD, M.; EL-SAYED, M.A.; ELSHANSHOURY, A.R.; EL-SABBAGH, S.M. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 149, p. 185-195, 1993b.

ERWIN, T.L. A copa da floresta tropical: o coração da biodiversidade biológica. In: Wilson, E. O. (Ed.). Biodiversidade. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. p. 158-165.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 175-185, 1998.

FALESI, I.C. O estado atual dos conhecimentos sobre os solos da Amazônia brasileira. In: Zoneamento agrícola da Amazônia. **Boletim Técnico do Instituto de Pesquisa Agropecuária do Norte (IPEAN)** (p. 33-64). Belém: IPEAN. (1st reprint: Embrapa CPATU in 1980), 1972.

FARIAS, N.A.F. & OLIVEIRA, L.A. Uso dos microorganismos solubilizadores de fosfatos em pupunheira num Latossolo da região amazônica. *Resumo*. Resumos do III Simpósio brasileiro sobre microbiologia do solo, Londrina, PR, junho de 1994.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1995.

FLEURI, L.F.; SATO, H.H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**. v. 28, p. 871-879, 2005.

FRANCO, A. A., CAMPELLO, E.F.C., DIAS, L. E., FARIA, S. M. de. Uso de leguminosas associadas a microrganismos na revegetação de áreas de mineração de bauxita em Porto Trombetas-Pa. Itaguaí: EMBRAPA-CNPAB; 1996. 71p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 27).

FRANCO, C.M.M. & COUTINHO, L.E.L. Detection of novel secondary metabolites. **Critical Review of Biotechnology**, v. 11, p. 193-276, 1991.

FREITAS, S.S. & PIZZINATTO, M.A. Interações de *Pseudomonas* sp. e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* na rizosfera de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). **Summa Phytopathology**, v. 17, p. 105-112, 1997.

FURUKAWA, K.; MATSUMURA, F.; TONOMURA, K. *Alcaligenes* and *Acinetobacter* strains capable of degrading polychlorinated biphenyl. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 42 p. 543-548, 1978.

GADD, G.M. Accumulation of metals by microorganisms and algae. In: REHM, H.J. (ed): *Biotechnology - A comprehensive treatise*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft. 6B. pp. 401-433, 1988.

GAO, C.X.; LIN, C.Z.; FANG., S.M. Screening of the actinomycetes str. Nongkang 321 and assessment of its inhibitory effect on potato blast. **Fujian Agricultural Science and Technology**, Fuzhou, v. 4, p.33-35, 1983.

GLASER, B.; GUGGENBERGER, G.; HAUMAIER, L.; ZECH, W. Persistence of soil organic matter in Archaeological soils (Terra Preta) of the Brazilian Amazon region. In: REES, R.M.; BALL B.C.; Campbell, C.D. & Watson, C.A. (Ed.), **Sustainable management of soil organic matter**, p.190-194, Wallingford:CABI Publishing, 2001.

GOODFELLOW M.; WILLIAMS, S.T. Ecology of actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**. v. 37, p. 189-216, 1983.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a geographical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 195-202, 1998.

GURTLER, V.; WILSON, V. A.; MAYALL, B. C. Classification of medically important clostridia using endonuclease site differences of PCR-amplified 16S rDNA. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 137, p. 2673-2679, 1991.

HACKL, E.; PFEFFER, M.; DONAT, C.; BACHMANN, G.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S. Composition of the microbial communities in the mineral soil under different types of natural forest. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p. 661-671, 2005.

HAGEDORN, C. Influence of soil acidity on *Streptomyces* population inhabiting forest soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 32, p. 368-375, 1976.

HALL, T. BioEdit – version 5.0.6 Raleigh: North Caroline State University, Department of Microbiology, 2001. 192p.

HALVERSON, L.J.; HANDELSMAN, J. Enhancement of soybean nodulation by *Bacillus cereus* VW 85 in the field and in a growth chamber. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.9, p. 2767-2770, 1991.

HARRISON, A.F.; INESON,, P. & HEAL, O.W. Nutrient Cycling in Terrestrial Ecosystems. Elsevier Applied Sciences, London, UK. 1990.

HARTT F. Contribuição para a etnologia do Vale do Amazonas. **Archivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro**, v. 6, p.10-14, 1885.

HATANO, K. Actinomycete populations in mangrove rhizospheres. **IFO Research Communications**, n. 18, p. 26-31, 1997.

HAYASHI, H.; TAKIUCHI, K.; MURAO, S.; ARAJ, M. Identification of the microorganism which produces insecticidal indole alkaloids, okaramines A and B. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, p. 2177-2178, 1991.

HEINEMEIER, O.; INSAM, H.; KAISER, E.A. & WALENZIK, A. Soil microbial biomass and respiration measurement: an automated technique based on infra-red gas analysis. **Plant and Soil**, v. 116, p. 191-195, 1989.

HELMKE, E.; WEYLAND, H. *Rhodococcus marinonascens* sp. nov., actinomycete from the sea. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, p. 127-138, 1984.

HIRANO, S.S.; HUPPER, C.D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* – a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, p. 624-653, 2000.

HIRAOKA, M.; YAMAMOTO, S.; MATSUMOTO, E.; NAKAMURA, S.; FALESI, I.C.; BAENA, A.R.C. (2003). Contemporary use and management of Amazonian Dark Earths. *In*: LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GLASER, B. & WOODS, W.I. (Ed.). *Amazonian Dark Earths: Origin, properties & management*. Kluwer Academic Publishers. 2003. p. 387-406.

<http://www.ipt.br/inovacao/exemplos/plastico>

<http://www.ebi.ac.uk/index.html>

http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/artigos/fbni_inocula_feijoeiro.htm

<http://www.helicobacter.com.br>

<http://www.museu-goeldi.br>

<http://ncbi.nlm.nih.gov>

HUGHES, M. S.; SKUCE, R. A.; BECK, L. A.; NEILL, S. D. Identification of mycobacteria from animals by restriction enzyme analysis and direct DNA cycle sequencing of polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA gene sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, p. 3216-3222, 1993.

IWAI, Y.; TAKAHASHI, Y. Selection of microbial sources of bioactive compounds. *IN*: OMURA, S., ed. *The search for bioactive compounds from microorganisms*. New York: Springer-Verlag. 1992. p. 281-302.

JAYARO, B. M.; DORÉ JUNIOR, J. J. E.; BAUMBACH, G. A.; MATTHEWS, K. R.; OLIVER, S. P. Differentiation of *Streptococcus uberis* from *Streptococcus parauberis* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, p. 2774-2778, 1991.

JENSEN, P.R.; DWIGHT, R.; FENICAL, W. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1102-1108, 1991.

JIANG, C.L. & XU, L.H. Diversity of aquatic actinomycetes in lakes of the middle plateau, Yunnan, China. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 249-253, 1996.

KANE, M.D. & BREZNAK, J.A. *Acetonema longum* gen. nov. sp. nov., an H₂/CO₂ acetogenic bacterium from the termite, *Pterotermes occidentis*. **Archives of Microbiology**, v. 156, p.91-98, 1991.

KHAN, M.R.; WILLIAMS, S.T. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. VIII. Distribution and characteristics of acidophilic actinomycetes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 7, p. 345-348, 1975.

KERN, D.C. Caracterização de solos com Terra Preta Arqueológica na região de Oriximiná, Pará. Porto Alegre, UFRGS, Faculdade de Agronomia, 1988. 232 p. Dissertação (Mestrado).

KERN, D.C. & KÄMPF, N. Antigos assentamentos indígenas na formação de solos com Terra Preta Arqueológica na região de Oriximiná, Pará. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 13, p. 219-225, 1989.

KERN, D.C.; D'AQUINO, G.; RODRIGUES, T.E.; FRAZÃO, F.J.L.; SOMBROEK, W.; MYERS, T.P.; NEVES, E.G.. Distribution of Amazonian Dark Earths in the Brazilian Amazon. In: LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GLASER, B. & WOODS, W.I. (Ed.). *Amazonian Dark Earths: Origin, properties & management*. Kluwer Academic Publishers. 2003. p. 51-75.

KLOEPPER, J.W. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: METTING, F.B., ed. **Soil Microbial Ecology**. New York, Marcel Dekker, 1993. p.255-274.

LAGUERRE, G.; ALLARD, M. R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 60, p. 56-63, 1994.

LANCINII, G.; LORENZETTI, R. Biotechnology of antibiotics and other bioactive microbial metabolites. New York: Plenum Press, 1993. 235p.

LANE, D. L.; PACE, B.; OISEN, G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 82, p. 6955-6959, 1985.

LECHEVALIER, H.A. & LECHEVALIER, M.P. Introduction of the order Actinomycetales. IN: Starr, m.p.; stolp,h.; truper, h.g.; balow,a.; schlegel, h.g. ed. The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Berlin: Springer-Verlag, 1981. v. 2, p. 1915-2123.

LECHEVALIER, M.P. Actinomycetes in agricultural and forestry. IN: GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T.; MORDARSKY, M. ed. Actinomycetes in Biotechnology, Orlando: Academic Press, 1988.

LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GLASER, B. & WOODS, W.I. (Ed.). Amazonian Dark Earths: Origin, properties & management. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 505.

LEONG, J. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 187-209, 1986.

LIU, S.; TANG, W. The study on endophytic *Streptomyces* of cotton. IN: INTERNATIONAL WORKSHOP ON BIOLOGICAL CONTROL OF PLANT DISEASES. 1996, Beijing, China. **Proceedings**, s. 1, 1996.

LOUWS, F. J; RADEMAKER, J. L. W.; AND BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999.

MARA, D.D.; ORAGUI, J.I. Occurrence of *Rhodococcus coprophilus* and associated actinomycetes in feces, sewage and fresh water. **Applied Environmental Microbiology**, v. 42, p. 1037-1042, 1981.

McCANN, J.M.; WOODS, W.I.; MEYER, D.W. Organic matter and Anthrosols in Amazonia: interpreting the Amerindian legacy. In: Rees RM, Ball BC, Campbell CD, Watson CA (eds) Sustainable management of soil organic matter. CAB International, Wallingford, p. 180–189, 2001.

McCARTHY, A.J.; CROSS, T. A note on a selective isolation medium for the thermophilic actinomycete *Thermonospora chromogena*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 51, p. 299-301, 1981.

McCARTHY, A.J.; WILLIAMS, S.T. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment – a review. **Gene**, v. 115, p. 189-192, 1992.

McLNROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, p. 895-901, 1995.

MESQUITA, A.C. Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes 2004 158 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002. 262 p.

MULLIS, K.; FALLONA, F. Specific synthesis of DNA “in vitro ” via polymerase chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v. 55, p. 335-350, 1987.

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

MYERS, N. Environmental services of biodiversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 93, p. 2764-2769, 1996.

NESME, X.; VANEECHOUTTE, M.; ORSO, S.; HOSTE, B.; SWINGS, J. Diversity and genetic relatedness within genera *Xanthomonas* and *Stenotrophomonas* using restriction endonuclease site differences of PCR-amplified 16S rRNA gene.

Systematic and Applied Microbiology, Stuttgart, v. 18, p. 127-135, 1995.

NEWEIGY, N.A.; EISAS, N.A.; EL-SHEWY, L.A. Biological control of damping-off in broad bean varieties Giza 2 and Rebya 40. Ain Shams University: Faculty of Agriculture, n.1778, p.27. 1982. (Research Bulletin), Cairo.

NOGUEIRA, M.A. Interações entre micorriza arbuscular, rizobactérias, fósforo e silício na manifestação da toxidez de manganês em soja. 2001. 195 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

NOLAN, R.D.; CROSS, T. Isolation and screening of actinomycetes. IN: GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T.; MORDARSKY, M. ed. Actinomycetes in Biotechnology, Orlando: Academic Press, 1988.

OKAMI, Y.; OKAZAKI, T. Studies in marine actinomycetes. I. Isolation from the Japan Sea. **Journal of Antibiotics**, v. 25, p. 456-460, 1972.

ORCHARD, V.A.; GOODFELLOW, M. The selective isolation of *Nocardia* from soil using antibiotics. **Journal of General Microbiology**, v. 85, p. 160-162, 1980.

OVREAS, L.; JENSEN, S.; DAAE, F.L. & TORSVIK, V. Microbial community changes in perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 36, p. 2739-2742, 1998.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and biosphere. **Science**, Washington, v. 276, p. 734-740, 1997.

PALLERONI, N, J. Pseudomonas classification – a new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 64, p. 231-251, 1993.

PARKINSON, D. & PAUL, E.A. (1982). Microbial biomass. *In*: Page, A.L.; Miller, R.H. & Keeney, D.R. (eds.). *Methods of Soil Analysis*, vol. 2. American Society for Agronomy, Madison, USA, p. 821-830.

PAVAN, C.; MOREIRA-FILHO, C. Nitrogen-fixing bacteria in agronomy, and in biodiversity. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 4, p. 1-3, 1998.

PERCICH, J.A.; LOCKWOOD, J.L. Interaction of atrazine with soil microorganisms: population change and accumulation. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, p. 1145-1152, 1978.

QUINTELAS C.; TAVARES T. Removal of chromium(VI) and cadmium(II) from aqueous solution by a bacterial biofilm supported on granular activated carbon. **Biotechnology Letters**. v. 23, p. 1349-1353, 2001.

QUISPEL, A.; BURGGRAAF, A.J.P.; BORSJE, H.; TAK, T. The role of lipids in the growth of *Frankia* isolates. **Canadian Journal of Botany**, v. 61, p. 2801-2806, 1993.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v. 20, p. 1-11, 2001.

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

REITER, B.; PFEIFER, U.; SCHWAB, H.; SESSITSCH, A. response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, n. 5, p. 2261-2268, 2002.

RIVAS, R.; MATEOS, P.F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; VELÁZQUEZ, E. *Paenibacillus xylanilyticus* sp. nov., an airborne xylanolytic bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 405-408, 2005.

ROWBOTHAM, T.J.; CROSS, T. Ecology of *Rhodococcus coprophilus* and associated actinomycetes in fresh water and agricultural habitats. **Journal of General Microbiology**, v. 100, p. 231-240, 1977.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, p. 406-425, 1987.

SARDI, P.; SARCCHI, M.; QUARON, S.; PETROLUNI, G.; BORGONOV, E.; MERLI, S. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2691-2693, 1992.

SCHMIDT, M.W.I., NOACK, A.G. Black carbon in soils and sediments: analysis, distribution, implications, and current challenges. **Global Biochemical Cycles**, v. 14 p. 777-793, 2000.

SHISHIDO, M. ; BREUIL, C.; CHANWAY, C.P. Endophytic colonization of spruce by growth-promoting rhizobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 29, p. 191-196, 1999.

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

SOBRAL, J.K. A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine Max*) e estudo da interação endófitos-planta. 2003. 174 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

SOMBROEK, W. Amazon soils: A Reconnaissance of the Soils of the Brazilian Amazon Region. Wageningen. **Center for Agricultural Publications and Documentation**. 292p. 1966.

SORKHOH, N.A.; GHANNDUM, M.A.; IBRAHIM, A.S.; STRETTON, R.J.; RADWAN, S.S. Sterol and diacetylglycerolphosphocholines in the lipids of the hydrocarbon utilizing prokariote *Rhodococcus rhodochrous*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 69, p. 856-863, 1966.

SPIERS, A. J.; BUCKLING, A.; RAINEY, P. B. The causes of *Pseudomonas* diversity. **Microbiology**. v. 146, p. 2345-2350, 2000.

SWOFFORD, D.; OLSEN, G.; WADDEL, P.; HILLIS, M. Phylogenetic inference. IN: HILLIS, D.M.; MORTIZ, C.; MABLE, B.K. (Ed.) Molecular systematics. 2. ed. Sunderland: Sinauer Assoc., 1996. p. 407-514.

TAKIZAWA, M.; COLWEL, R.R.; HILL, R.T. Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 997-1002, 1993.

THIES, J. & SUZUKI, K. Amazonian Dark Earths biological measurements. In: LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GLASER, B. & WOODS, W.I. (Ed.). *Amazonian Dark Earths: Origin, properties & management*. Kluwer Academic Publishers. 2003. p. 287-332.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G. GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific-gap penalties and weigh matrix choice. **Nucleic Acids Research**, London, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TIEDJE, J.M. 20 years since Dunedin: The past and future of microbial ecology. In: Bell. C.R.; Brylinsky, M.; Johson-Green, P. (eds.). **Microbial Biosystems: News and Frontiers**. Proc. Of the 8th Int. Symp. on Microbial Ecology. Halifax, Canada, p. 933-939, 2000.

TIEDJE, J.M.; ASUMING-BREMPONG S.; NUSSLEIN, K.; MARSH, T.L.; FLYNN, S.J. Opening the black box of soil microbial diversity. **Applied Soil Ecology**, v. 386, p. 1-14, 1999.

TSAI, S. M.; CANNAVAN, F. S. ; SILVA JR., J. P.; CHAVES, M. G.; PASSIANOTO, C. C.; BORGES, C. P. Diversidade bacteriana em terra preta de índio baseada em seqüenciamento do gene 16S rRNA. **Resumos do XXIX Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**. Ribeirão Preto, São Paulo. 2003.

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

VAN DE PEER, Y,; DE WACHTER, R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. **Computer Application in Biosciences**, v. 10, p. 569-570, 1994.

VAN WEES, S.C.M.; LUIJENDIJK, M.; SMOORENBURG, I.; VAN LOON, L.C.; PIETERSE, C.M.J. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 41, p. 537-549, 1999.

VANEECHOUTTE, M.; DIJKSHOORN, L.; TJERNBERG, I.; ELAICHOUNI, A.; DE VOS, P.; CLAEYS, G.; VERSCHRAEGEN, G. identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 11-15, 1995.

WANG, Y.; ZHANG, Z.S.; RUAN, J.S. WANG, Y.M.; ALI, S.M. Investigation of actinomycete diversity in the tropical rainforests of Singapore. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 23, p. 178-187, 1999.

WIDMER, F.; FLIEBBACH, A.; LACZKÓ, E.; SCHULZE-AURICH, J. & ZEIER, J. Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and BiologTM – **Analyses. Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p. 1029-1036, 2001.

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

WILLIAMS, S.T.; DAVIES, F.L.; MAYFIELD, C.I.; KHAN, M.R. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. II the pH requirements of *Streptomyces* from two acid soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 3. p. 187-195, 1971.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 51, p. 221-271, 1987.

WOODS, W.I. & MCCANN, J.M. El origen y persistencia de las tierras negras de la Amazonía. In: Hiraoka, M.; Mora, S (Ed.), Desarrollo Sostenible en la Amazonía. p. 23-30, 2001.

XIE, C.H. & YOKOTA, A. *Dyella japonica* gen. nov., sp. nov., a gamma-proteobacterium isolated from soil. . **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 55, p. 753-756, 2005.

YADAV, J.S.; QUENSEN III, J.F.; TIEDJE, J.M.; REDDY, C.A. Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors 1242, 1254, and 1260) by the white rot fungus *Phanaerochate chrysosporium* as evidenced by congener-specific analysis. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61 p. 2560-2565, 1995.

ZAITLIN, B.; TURKINGTON, K.; PARKINSON, D.; CLAYTON, G. Effects of tillage and inorganic fertilizers on culturable soil actinomycete communities and inhibition of fungi by specific actinomycetes. **Applied Soil Ecology**, v. 26, p. 53-62, 2004.

ZINNIEL, D.K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N.B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C.A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R.G.; VIDAVER, A.K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, p. 2198-2208, 2002.