



Aplicação de Ferramentas Estatísticas na Interpretação de Dendrogramas de Similaridade Gerados a Partir de Perfis de rDNA de Comunidades Bacterianas de Solo

Anderson Petrónio de Brito Ferreira¹

André Nepomuceno Dusi²

Gustavo Ribeiro Xavier³

Norma Gouvêa Rumjanek³

Introdução

A comunidade microbiana do solo é composta de bactérias, fungos, microfauna e algas e é responsável pelo processo chamado de produção primária, no qual a existência e a continuidade da vida no globo terrestre tem sido baseada através de sua atuação e interação sobre os detritos depositados no solo pela vegetação (WARDLE & HUNGRIA, 1994).

Segundo RANJARD et al. (2000), por atuarem intensamente nas cadeias tróficas e nos diversos processos ecológicos, os microrganismos do solo possuem potencial para refletir a história passada do ambiente. Por isso, é essencial entender o interrelacionamento entre os microrganismos e o ambiente através do estudo da diversidade estrutural e funcional das comunidades microbianas e como elas respondem aos vários distúrbios naturais ou antrópicos.

A diversidade microbiana estrutural e funcional do solo tem sido estudada recentemente através de métodos que se baseiam na investigação de parte da sequência do DNA, notadamente os genes que codificam o 16S rRNA em bactérias e o 18S rRNA em fungos, que são amplificados pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) e, posteriormente, caracterizados através da clonagem e sequenciamento ou, então, analisados por eletroforese através das técnicas da Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA - *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição Terminal (T-RFLP - *Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism*), Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*), Análise do Espaador Intergênico Ribossomal (RISA - *Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*), Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturantes (DGGE - *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), Eletroforese em Gel com Gradiente de Temperatura (TGGE - *Temperature Gradient Gel Electrophoresis*) e Polimorfismo Conformacional da Fita Simples (SSCP - *Single Strand Conformational Polymorphism*) onde um perfil de fragmentos de DNA do microrganismo ou da comunidade

microbiana é obtido (RANJARD et al., 2000; KOZDROJ & VAN ELSAS, 2001).

Algumas técnicas, como ARDRA e RISA, são mais utilizadas para a obtenção de perfis de fragmentos de DNA de microrganismos isolados, enquanto outras técnicas, como DGGE/TGGE e SSCP, são frequentemente empregadas para a obtenção de perfis de fragmentos de DNA de comunidades microbianas.

Embora haja diferenças entre as várias metodologias empregadas nos estudos de perfis de fragmentos de DNA de microrganismos ou comunidades microbianas, seus resultados são expressos na forma de dendrogramas, nos quais são mostrados os agrupamentos entre os microrganismos ou entre as comunidades microbianas. No caso de metodologias que oferecem uma análise preliminar das comunidades microbianas, especialmente quando não se conhece os indivíduos destas comunidades, ocorre uma dificuldade muito grande na interpretação dos agrupamentos mostrados nos dendrogramas, principalmente em responder se os diferentes agrupamentos são significativamente distintos.

Apesar disso, a técnica de PCR-DGGE tem sido aplicada ao estudo de diversidade de espécies de *Paenibacillus* presentes na rizosfera de cultivares de milho (SILVA et al., 2003), em comunidades microbianas do solo (JONES & THIES, 2007), em comunidades procarióticas redutoras de sulfato presentes em solos e sedimentos (MILETTO et al., 2007), na diversidade microbiana de membranas de nano e microfiltração de bioreatores (CHOI et al., 2007), nas mudanças da estrutura da comunidade microbiana em função do tamanho das partículas do solo (ZHANG et al., 2007) e na comparação com outros métodos utilizados para o monitoramento de comunidades microbianas complexas (HONG et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de uso da análise de variância para a determinação da significância dos agrupamentos de comunidades bacterianas do solo observados em dendrogramas de similaridade, construídos a partir de perfis de fragmentos de DNA observados em géis de DGGE.

¹ Pesquisador Embrapa Arroz e Feijão, BR GO-462, km 12, CP: 179, CEP: 75375-000, Santo Antônio de Goiás-GO.

² Pesquisador Embrapa Hortaliças, BR 060, km 09, CP: 218, CEP: 70359-970, Brasília, DF.

³ Pesquisador Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 07, CP: 74.505, CEP: 23890-000, Seropédica-RJ.

Material e Métodos

Amostras de solo foram coletadas no Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA), localizado no município de Seropédica (RJ) e em Área de Produção Convencional (APC) de batata e Área de Floresta Secundária (AFS) em junho de 2003 na Embrapa Hortaliças, Brasília - DF. Foi conduzido um experimento em casa-de-vegetação, na Embrapa Agrobiologia, RJ, usando o delineamento experimental de blocos ao acaso com três repetições, com parcela sub-dividida no tempo e fatorial (5X3) na parcela. O fatorial foi composto pelos três tipos de solo e cinco agrotóxicos (Tabela 1), sendo três inseticidas e dois fungicidas e um tratamento controle. O efeito das quatro coletas, realizadas aos 32, 47, 62 e 77 dias após o plantio (DAP), foi avaliado na sub-parcela. O cultivo da batata cv. Achat foi realizado em potes de 1,5 kg contendo os solos descritos acima e foram feitas duas pulverizações, aos 30 e 45 DAP, com os inseticidas e fungicidas listados na Tabela 1, com exceção do Aldicarb, que foi incorporado ao solo no momento do preparo dos vasos.

Tabela 1: Grupo químico, dose do ingrediente ativo.ha⁻¹, modo de aplicação e período de aplicação dos agrotóxicos usados no experimento com batata cv. Achat.

Ingrediente ativo	Grupo Químico	Dose do ingrediente ativo (kg.ha ⁻¹)	Modo de aplicação	Período de aplicação
INSETICIDAS				
ALDICARB	Carbamato	1,95	Incorporação ao solo	No plantio
Clorpirifós	Organofosforado	0,72	Pulverização	30 e 45 DAP
Deltametrina	Piretróide	0,008	Pulverização	30 e 45 DAP
FUNGICIDAS				
Metalaxil+	Fenilamida	0,2	Pulverização	30 e 45 DAP
Mancozeb	Etilenobisditio-carbamato			
Tebuconazole	Triazol	0,2	Pulverização	30 e 45 DAP

DAP= Dias Após Plantio

Com o objetivo de avaliar a diversidade bacteriana a partir do cultivo da comunidade microbiana, foi utilizado um meio de cultivo contendo ágar e solo como fonte de nutrientes (ZILLI et al., 2003). Foram testadas quantidades diferentes de solo e ágar, a fim de se obter condições ótimas para a solidificação do meio de cultivo. Os solos citados acima foram pulverizados, separadamente, em moinho de rolagem (SMITH & MYUNG, 1990). Posteriormente foram testadas 1,5; 2 e 4 g de ágar e 10, 20, 40 e 80 g de solo moído em 100 ml de água para a confecção do meio terra pulverizada (MTP). Após retirar cada planta do vaso, pesou-se 10 gramas de solo em erlenmeyer, adicionou-se 90 ml de água destilada autoclavada e colocou-se para agitar (200 RPM; 30 min). Foi retirada uma alíquota de 100 µL que foi inoculada em placas de Petri contendo o MTP. As placas foram incubadas a 25°C durante 5 dias para o crescimento microbiano. Após este período, adicionou-se 2 ml de água autoclavada para a coleta do material crescido. Este material foi transferido para microtubos e centrifugado (9.000 g;

15 min). Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi armazenado à -20°C.

A extração do DNA seguiu o protocolo descrito por SCHWIEGER & TEBBE (1998) e modificado por XAVIER et al. (2004). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 35 µl, em triplicata, usando 1 µl de DNA molde nas diluições 1:20, 1:40 e 1:80. As reações consistiram de DNA molde, tampão (10 mM), MgCl₂ (3,5 mM), dNTP (0,2 µM cada), BSA (0,17 µg.µl⁻¹), Taq DNA polimerase (Invitrogen) (0,7 U) e 0,2 µM de cada um dos iniciadores universais para bactérias 1401r (CGGTGTGTACAAGACCC) e 968f-GC (AACGCGAAGAACCTTAC), descritos por HEUER & SMALLA (1997). Estes iniciadores flanqueiam uma região de aproximadamente 500 pares de bases entre os nucleotídeos 968 e 1401 do gene que codifica o 16S rRNA de *Escherichia coli*, incluindo as regiões variáveis V6 até V8 (BROSIOUS et al., 1978). Uma pequena sequência de nucleotídeos rica em G+C ou grampo GC (CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGG GGG) (MUYZER et al., 1993), foi anexado ao iniciador 968f para impedir a desnaturação total da dupla fita do DNA durante a eletroforese.

Após a amplificação um volume de 12 a 20 µl de cada amostra de DNA amplificado foi aplicado em gel desnaturante de poli-acrilamida 6 % (N-acrilamida, N'-metilbisacrilamida, 37:1) dissolvida em tampão TAE 0,5X (Tris-HCl, 20 mM pH 7,8; acetato de sódio 10 mM e Na-EDTA, 0,5 mM). O gradiente de desnaturante utilizado foi de 50 a 65%. A eletroforese foi realizada no sistema Dcode™ (Bio-Rad) sob voltagem constante (120 V; 60 °C; 16 horas). Ao final, o gel foi corado com uma solução de Syber Gold (Molecular Probe) (20X) e visualizado sob luz ultravioleta no sistema de foto-documentação IMAGO (B&L). A obtenção das imagens digitalizadas foi realizada em três diferentes tempos de exposição à luz UV, sendo um destes tempos de exposição aquele determinado automaticamente pelo foto-documentador e 50% a mais e a menos deste tempo. Este procedimento auxiliou na identificação efetiva das bandas. Todas as bandas foram consideradas fragmentos de DNA amplificado e, portanto, usadas na construção das matrizes de similaridade.

Foram elaboradas matrizes binárias de presença e ausência de bandas para cada uma das três repetições, em cada coleta, em função da posição que as bandas ocupavam no gel (KOZDROJ & Van ELSAS, 2001) as quais foram utilizadas para a construção de uma única matriz (ABOIM, 2004). A partir desta matriz binária foi feita a análise de agrupamento por dendrograma, utilizando o coeficiente de Jaccard para o cálculo da similaridade e o método UPGMA para agrupamento, através do programa NTSYS-PC v. 2.10 (Applied Biostatistics). Após a construção dos dendrogramas de cada área, foram determinados, para cada repetição, os valores de similaridade de cada tratamento (inseticida e fungicida) em relação ao controle. Como o tratamento controle foi utilizado como referência para gerar os valores de similaridade utilizados na análise da variância, este passou a não fazer parte da mesma, permanecendo apenas 5 tratamentos, sendo 3 inseticidas e 2 fungicidas. As médias dos tratamentos (3 inseticidas e 2 fungicidas) foram testadas a 5% de significância pelo teste de

Scott-Knott e, também, submetidas a uma análise de regressão para a determinação dos coeficientes de melhor ajuste ao modelo e das diferenças entre as coletas.

Resultados e Discussão

Das quantidades de ágar e solo testadas, foi observada melhor consistência do meio de cultura utilizando-se 40 g de solo, 2 g de ágar em 100 ml de água. Após o período de incubação de 5 dias, foi observado um crescimento microbiano abundante, mostrando a eficiência do meio de cultura em promover o crescimento da população microbiana. Os meios de cultura puramente sintéticos apresentam uma série de limitações para estudo da diversidade microbiana (COWAN, 2000; RANJARD et al., 2000). O MTP aqui apresentado apresenta também a vantagem de ser de baixo custo e de não necessitar de equipamentos sofisticados, quando comparado a kits e protocolos de extração de DNA de solo, além de permitir uma avaliação da fração viva e ativa dos microrganismos do solo.

A Figura 1 mostra os géis de DGGE de comunidade bacteriana provenientes da área do SIPA, da APC e de AFS próxima à área de produção. É possível observar que algumas bandas (quadrado) estão presentes em todos os tratamentos e em todas as coletas, indicando a presença de grupos de bactérias que, independentemente do tratamento aplicado ou da época de coleta, encontra-se estabelecido naquele ambiente. Além disso, podemos observar uma diferenciação no posicionamento de algumas bandas, seja em função do tratamento aplicado (setas) ou em função da variação ao longo do período de coleta (círculo), o que pode ser observado nas amostras provenientes do controle (linhas 13 a 16).

Agrotóxicos são produtos que foram desenvolvidos para atuar sobre determinados organismos alvos, porém, podem apresentar efeito residual sobre outros organismos, promovendo alterações na estrutura da comunidade microbiana (SPADOTTO, 2002). No entanto, dados relativos à dinâmica associada à aplicação de agrotóxicos em áreas tropicais são bastante limitados.

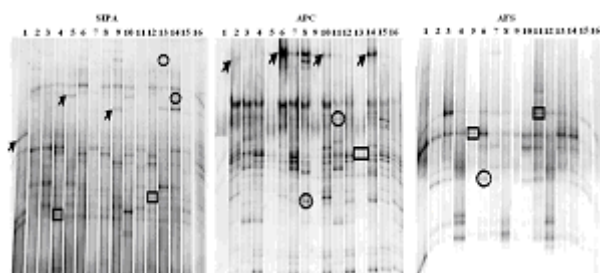


Figura 1: Gel de DGGE de comunidades bacterianas do solo cultivadas em meio solo, submetida ao tratamento com inseticidas: SIPA= Sistema Integrado de Produção Agroecológica; APC= Área de Produção Convencional; AFS= Área de Floresta Secundária. Linhas 1 a 4- Aldicarb, coletas 1, 2, 3 e 4; Linhas 5 a 8- Clorpirifós, coletas 1, 2, 3 e 4; Linhas 9 a 12- Deltametrina, coletas 1, 2, 3 e 4 e linhas 13 a 16- Controle, coletas 1, 2, 3 e 4.

Na Figura 2 são mostrados os dendrogramas representativos da comunidade bacteriana do solo do SIPA, APC e de AFS, respectivamente, cultivado com batata, submetido à aplicação de inseticidas. Nas amostras de solo da área do SIPA, a aplicação do inseticida Aldicarb resultou na redução da

similaridade entre a comunidade bacteriana sob este tratamento e o tratamento controle aos 30 dias após a aplicação, mantendo-se essa tendência ao longo do período. No solo da APC a aplicação do inseticida Aldicarb, também, resultou em um afastamento em relação à comunidade bacteriana do controle, sendo que, aos 32 dias após a aplicação (coleta 1), a similaridade entre as comunidades bacterianas do controle e do tratamento com Aldicarb foi de apenas 7%. Porém, ao longo do período de estudo, houve uma tendência de recuperação dessa comunidade no sentido de se tornar mais semelhante ao controle. Em relação ao efeito do Aldicarb sobre a comunidade bacteriana do solo da AFS, houve também um afastamento em relação ao controle que, se por um lado não foi tão acentuado no início do experimento, foi persistente ao longo de todas as coletas realizadas (Figura 2).

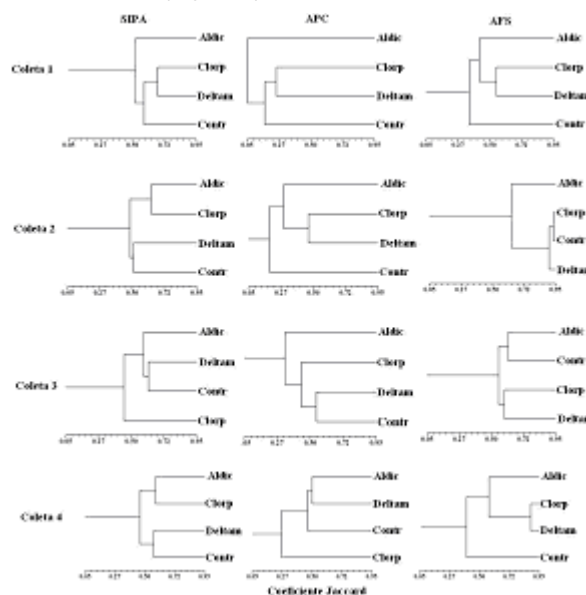


Figura 2: Dendrogramas de similaridade representativos das comunidades bacterianas do solo cultivado com batata submetida à aplicação de inseticidas. As coletas foram realizadas aos 32, 47, 62 e 77 dias após emergência (DAP). SIPA= Sistema Integrado de Produção Agroecológica; APC= Área de Produção Convencional; AFS= Área de Floresta Secundária. Aldic= Aldicarb; Clorp= Clorpirifós; Deltam= Deltametrina e Contr= Controle.

O efeito do inseticida Clorpirifós sobre a comunidade bacteriana do solo do SIPA foi semelhante ao Aldicarb, refletindo na redução da similaridade de cerca de 58% aos 30 dias após o plantio para cerca de 46% aos 75 dias (Figura 2). Já em solo da APC foi observado um impacto inicial muito forte sobre a comunidade bacteriana do solo, reduzindo a similaridade dessa comunidade a apenas 7%. Possivelmente, os efeitos dos inseticidas sobre os microartrópodos do solo pode ter disponibilizado nutrientes, possibilitando o rápido desenvolvimento de grupos bacterianos oportunistas ocorrendo, assim, a redução de similaridade entre as comunidades microbianas. No entanto, a comunidade bacteriana mostrou uma ligeira recuperação em relação ao impacto inicial, permanecendo com índices de similaridade em torno de 25%. Nas amostras de solo de AFS essa recuperação inicial mostrou-se bastante elevada, mas aos 62 DAP (coleta 3) observa-se novamente uma redução na similaridade em relação ao tratamento controle, que se mantém aos 77 DAP (coleta 4). Em um estudo conduzido por três anos consecutivos PANDEY &

SINGH (2004), observaram que após o tratamento do solo com Clorpirifós, houve uma redução gradativa da população bacteriana de até 70% observada após 30 dias da aplicação. Após esse período observou-se uma recuperação da população bacteriana que alcançou um número de células similar ao controle somente após 120 dias do tratamento do solo.

Dos três inseticidas testados, a Deltametrina, que pertence à classe toxicológica mais baixa (WARE & WHITACRE, 2004), foi o que promoveu o menor efeito sobre a população bacteriana em todos os solos (Figura 2). Na literatura, o efeito da deltametrina sobre fungos quer seja sobre a germinação dos esporos ou sobre as hifas tem sido relatado como não significativo (SHARMA et al., 2005; ER & GOKCE, 2004) enquanto, sobre a comunidade bacteriana não são encontradas informações a respeito. Por outro lado, foi observado efeito sobre a população de artrópodos do solo sob cultivo convencional e plantio direto, tanto em relação à abundância, quanto em relação à composição das espécies (BADJI et al., 2004).

A aplicação de fungicidas resultou em efeitos sobre a comunidade bacteriana do solo similar aos aqui apresentados para os inseticidas (FERREIRA, 2006).

A partir da matriz de similaridade, gerada pelo coeficiente Jaccard, foi determinado o percentual de similaridade de cada tratamento (Inseticidas: Aldicarb, Clorpirifós e Deltametrina; Fungicidas: Tebuconazole e Metalaxil+Mancozeb) em relação ao controle nas 4 épocas de coleta e nas 3 repetições.

O quadro de análise de variâncias (Tabela 2) mostra que ocorreu um efeito de bloco altamente significativo, justificando a escolha do delineamento de blocos casualizados, em função de ser capaz de isolar heterogeneidades que ocorrem na área experimental.

Tabela 2: Quadro de análise de variância da similaridade dos tratamentos em relação ao controle, realizado em delineamento de blocos ao acaso com parcela sub-dividida.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	FC
Bloco	2	1592,27	11,024**
Origem do solo (A)	2	8209,52	53,839**
Agrotóxico (B)	4	406,44	2,814*
(A X B)	8	122,79	0,850 ^{ns}
erro	28	144,43	-
Coleta (C)	3	2238,82	13,359**
(A X C)	6	2394,62	14,288**
(B X C)	12	174,47	1,041*
(A X B X C)	24	118,31	0,706 ^{ns}
erro	90	167,59	-
Total corrigido	179	67356,55	-
CV Parcela (%)		26,48	
CV Sub-parcela (%)		28,53	
Média Geral		45,38	

Fc = F calculado; * Significativo ($p > 0,05$); ** Significativo ($p > 0,01$); ^{ns} não significativo.

Como pode ser observado na tabela 3, foram encontradas diferenças significativas na similaridade das comunidades bacterianas do solo em relação ao controle, resultante da aplicação do inseticida aldicarb. De forma geral, os menores índices de similaridade foram observados aos 32 DAP (coleta 1).

Em especial, destaca-se que a comunidade bacteriana do solo da APC apresentou os menores índices de similaridade em relação ao controle, o que sugere que uma baixa resiliência pode ser uma característica desta comunidade bacteriana que, em função disto, é fortemente impactada pela aplicação do inseticida.

Tabela 3: Percentual de similaridade nas diferentes épocas de coleta em relação ao controle da comunidade bacteriana do solo cultivado com batata e submetida à aplicação de Aldicarb. Médias de 3 repetições.

Dias Após Plantio	SIPA	APC	AFS
32	52,3 a	5,3 b	37,7 a
47	47,7 a	26,7 b	67,3 a
62	53,7 a	34,0 b	62,0 a
77	43,6 a	41,7 a	37,7 a

Médias de similaridade na mesma linha, seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). SIPA – Sistema Integrado de Produção Agroecológica; APC – Área de Produção Convencional; AFS – Área de Floresta Secundária.

Os dados provenientes da similaridade das comunidades bacterianas do solo cultivado com batata e submetida à aplicação dos diferentes agrotóxicos com a comunidade bacteriana do controle também foram utilizados para determinação da regressão em função das coletas, sendo gerado um gráfico para cada agrotóxico em cada tipo de solo (Figura 3). Cada gráfico consta de 4 pontos, representando as 4 coletas. Em cada gráfico podem ser visualizados as curvas de tendência, representando o modelo de melhor ajuste encontrado na análise da regressão, a equação que explica o melhor modelo para cada situação (solo X agrotóxico) e o coeficiente de determinação (R^2) de cada modelo. As curvas representadas por linhas pontilhadas indicam que não houve diferença significativa entre as coletas, enquanto que, as curvas representadas por linhas contínuas, indicam que foram observadas diferenças significativas entre as coletas para os valores de similaridade entre as comunidades bacterianas submetidas à aplicação de agrotóxicos e o controle.

Em relação ao efeito do Aldicarb sobre a similaridade da comunidade bacteriana, representada pelas linhas de tendência, observa-se um comportamento distinto para cada um dos solos (Figura 3). No solo do SIPA, observa-se que a aplicação do Aldicarb provocou uma redução da similaridade da comunidade bacteriana em relação ao controle. No entanto, após o impacto inicial, os índices de similaridade desta comunidade permaneceram constantes durante todo o período de estudo, mantendo-se em uma faixa de 55%. No solo da APC, foi observado um impacto inicial muito forte, reduzindo a similaridade da comunidade bacteriana em relação ao controle para valores em torno de 10% a 15%. No entanto, ao longo das coletas há uma tendência de recuperação da comunidade bacteriana. Já para a comunidade bacteriana do solo de AFS, observa-se um marcante efeito inicial, resultando em índices de similaridade em torno de 40%, sendo seguido de uma recuperação da comunidade bacteriana. Porém, a partir da 3ª coleta a comunidade bacteriana volta a se afastar do controle. Provavelmente a comunidade bacteriana do solo da AFS apresenta uma resposta mais suscetível à aplicação do Aldicarb,

uma vez que a recuperação da comunidade bacteriana foi seguida de um novo afastamento em relação ao controle. Por outro lado, a comunidade bacteriana do solo do SIPA apresenta a maior resiliência, apesar de um efeito inicial que foi menor do que os observados para as outras áreas.

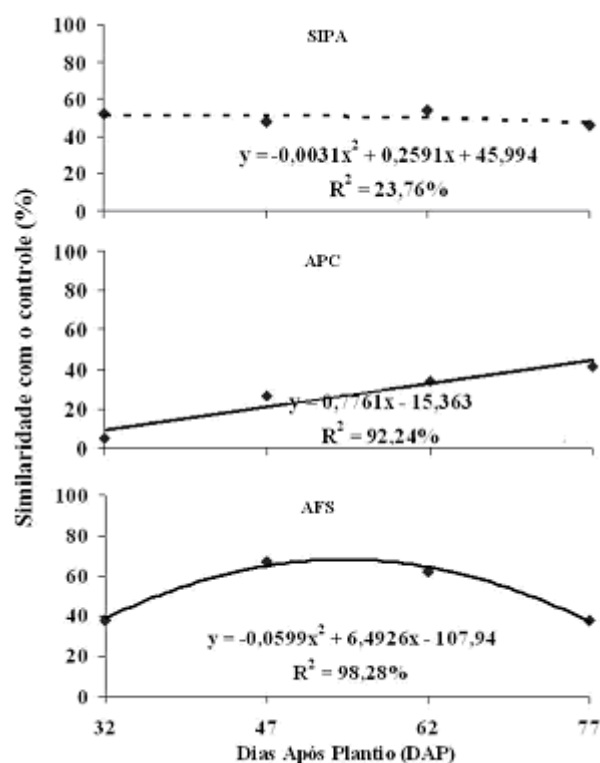


Figura 3: Regressão da similaridade das comunidades bacterianas do solo cultivado com batata submetida à aplicação de aldicarb, em relação ao controle, nos diferentes solos, em função das diferentes coletas. (32, 47, 62 e 77 DAP). SIPA= Sistema Integrado de Produção Agroecológica; APC= Área de Produção Convencional; AFS= Área de Floresta Secundária.

Conclusões

A aplicação dos agrotóxicos provocou impactos sobre a comunidade bacteriana do solo, causando diminuição dos valores de similaridade dos tratamentos em relação ao controle. Apesar destes impactos não terem sido claramente observados nos perfis de bandas mostrados nos géis de DGGE e nos agrupamentos por dendrogramas de similaridade, o uso da análise de variância, seguida dos testes de médias e regressão, mostrou diferenças significativas de similaridade entre os tratamentos em relação ao controle, nos diferentes solos e diferentes épocas de coleta. Estes resultados mostram o potencial de uso da análise da variância em estudos de ecologia e diversidade de comunidades microbianas do solo acessadas através de ferramentas moleculares.

Referências Bibliográficas

ABOIM, M. C. R. **Impacto à diversidade bacteriana e sua relação com indicadores de qualidade do solo em ecossistemas agrícolas e naturais de Mata Atlântica, na região serrana do Rio de Janeiro.** 2004. 97 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

BADJI, C. A.; GUEDES, R. N. C.; SILVA, A. A.; ARAÚJO, R. A. Impact of deltamethrin on arthropods in maize under conventional and no-tillage cultivation. **Crop Protection**, Oxford, v. 23, n. 11, p. 1031-1039, nov. 2004.

BROSIUS, J.; PALMER, M. L.; KENNEDY, P. L.; NOLLER, H. F. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 75, n. 10, p. 4801-4805, 1978.

CHOI, J. -H.; LEE, S. H.; FUKUSHI, K.; YAMAMOTO, K. Comparison of sludge characteristics and PCR-DGGE based microbial diversity of nanofiltration and microfiltration membrane bioreactors. **Chemosphere**, Oxford, v. 67, n. 8, p. 1543-1550, apr. 2007.

COWAN, D. A. Microbial genomes - the untapped resource. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 14-16, jan. 2000.

ER, M. K.; GOKCE, A. Effect of selected pesticides used against glasshouse tomato pests on colony growth and conidial germination of *Paecilomyces fumosoroseus*. **Biological Control**, San Diego, v. 31, n. 3, p. 398-404, nov. 2004.

FERREIRA, E. P. de B. **Efeito de cultivares de batata e de agrotóxicos sobre os perfis de rDNA de comunidades bacterianas do solo.** 2006. 81p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

HEUER, H.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. In: van ELSAS, J. D.; TREVORS, J. T.; WELLINGTON, E. M. H. (Ed.). **Modern soil microbiology**. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 353-374. (Books in Soils, Plants and the Environment, 56).

HONG, H.; PRUDEN, A.; REARDON, K. F. Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 69, n. 1, p. 52-64, apr. 2007.

JONES, C. M.; THIES, J. E. Soil microbial community analysis using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of the bacterial ribosomal internal transcribed spacer regions. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 69, n. 2, p. 256-267, may 2007.

KOZDROJ, J.; Van ELSAS, J. D. Structural diversity of microbial communities in arable soils of a heavily industrialised area determined by PCR-DGGE fingerprinting and FAME profiling. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 17, n. 1, p. 31-42, may 2001.

MILETTO, M.; BODELIER, P. L. E.; LAANBROEK, H. J. Improved PCR-DGGE for high resolution diversity screening of complex sulfate-reducing prokaryotic communities in soils and sediments. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 70, n. 1, p. 103-111, jul. 2007.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

PANDEY, S.; SINGH, D. K. Total bacterial and fungal population after chlorpyrifos and quinalphos treatments in groundnut (*Arachis hypogea* L.) soil. **Chemosphere**, Oxford, v. 55, n. 2, p. 197-205, apr. 2004.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 151, n. 3, p. 167-177, 2000.

SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. C. A new approach to utilize PCR-single strand conformation polymorphism for 16S rDNA gene-based microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4870-4876, 1998.

SHARMA, J.; SATYA, S.; KUMAR, V.; TEWARY, T. K. Dissipation of pesticides during bread-making. **Chemical Health and Safety**, Washington, v. 12, n. 1, p. 17-22, jan./feb. 2005.

SILVA, K. R. A.; SALLES, J. F.; SELDIN, L.; Van ELSAS, J. D. Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 54, n. 2, p. 213-231, aug. 2003.

SMITH, J. L.; MYUNG, H. U. Rapid procedures for preparing soil and KCl extracts for ^{15}N analysis. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 21, n. 12, p. 2273-2279, 1990.

SPADOTTO, C. A. **Uso de herbicidas no Brasil**. Comitê de Meio Ambiente, Sociedade Brasileira da Ciência de Plantas Daninhas. 2002. Disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br/herbicidas>. Acesso em: 15 abr. 2008.

WARDLE, D. A.; HUNGRIA, M. A biomassa microbiana do solo e sua importância nos ecossistemas terrestres. In: ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Ed). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI; Goiânia: EMBRAPA-CNPAF, 1994. p.195-216. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 44). WARE, G. W.; WHITACRE, D. M. **The Pesticide Book**. 6. ed. Willoughby: Meister Media Worldwide, 2004. 496 p.

XAVIER, G. R.; SILVA, F. V.; ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G. **Adaptação de método para extração de DNA microbiano**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2004. 24 p. (Embrapa Agrobiologia, Documentos, 171).

ZHANG, P.; ZHENG, J.; PAN, G.; ZHANG, X.; LI, L.; ROLF, T. Changes in microbial community structure and function within particle size fractions of a paddy soil under different long-term fertilization treatments from the Tai Lake region, China. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 58, p. 264-270, 2007.

ZILLI, J. E.; SANTOS, E. L.; HAGLER, L. M.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Desenvolvimento de meio de cultura para microrganismos do solo utilizando solo como fonte de nutrientes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22., 2003, Florianópolis, SC. **Resumos...** Florianópolis: SBM, 2003. p. 130.

Comunicado Técnico, 109

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia

BR465 – km 7

Caixa Postal 74505

23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil

Telefone: (0xx21) 2682-1500

Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

1ª impressão (2008): 50 exemplares



Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Comitê de publicações

Eduardo F. C. Campello (Presidente)

José Guilherme Marinho Guerra

Maria Cristina Prata Neves

Veronica Massena Reis

Robert Michael Boddey

Maria Elizabeth Fernandes Correia

Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente

Revisor e/ou ad hoc: Márcia Soares Vidal e Stefan Schwab

Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix.

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia.