

**Uso do Meio Solo e PCR/DGGE como Estratégia  
para Caracterização da Comunidade Bacteriana**







*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

*ISSN 1676-6709*

*Outubro/2008*

# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 31***

**Uso do Meio Solo e PCR/DGGE como  
Estratégia para Caracterização da Comunidade  
Bacteriana**

**Norma Gouvêa Rumjanek  
Jerri Édson Zilli  
Fernando Wagner Rangel  
Samuel Ribeiro Passos  
Claudia Miranda Martins  
Enderson Petrônio de Brito Ferreira  
Marcela C. R. Aboim  
Rayssa Vincentin  
José Guilherme Marinho Guerra  
Gustavo Ribeiro Xavier**

***Seropédica – RJ  
2008***

Exemplares desta publicação podem ser adquiridas na:

**Embrapa Agrobiologia**

BR 465 – km 7

Caixa Postal 74505

23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil

Telefone: (0xx21) 2682-1500

Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: [www.cnpab.embrapa.br](http://www.cnpab.embrapa.br)

e-mail: [sac@cnpab.embrapa.br](mailto:sac@cnpab.embrapa.br)

Comitê Local de Publicações: Eduardo F. C. Campello (Presidente)  
José Guilherme Marinho Guerra  
Maria Cristina Prata Neves  
Verônica Massena Reis  
Robert Michael Boddey  
Maria Elizabeth Fernandes Correia  
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente:

Revisores e/ou ad hoc: Kátia Regina dos Santos Teixeira e Stefan Schwab

Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Felix

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

1ª impressão (2008): 50 exemplares

R936u Rumjanek, Norma Gouvêa

Uso do Meio Solo e PCR/CGGE como Estratégia para Caracterização da Comunidade Bacteriana / Norma Gouvêa Rumjanek et al. – Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia, 2008. 27 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Agrobiologia, ISSN 1676-6709; 31).

1. Eletroforese em gel de gradiente desnaturante. 2. Ecologia microbiana. 3. Análise do solo. I. Zilli, Jerri Édson, colab. II. Rangel, Fernando Wagner, colab. III. Passos, Samuel Ribeiro, colab. IV. Martins, Cláudia Miranda, colab. V. Ferreira, Enderson Petrônio de Brito, colab. VI. Aboim, Marcela C. R., colab. VII. Vincentin, Rayssa, colab. VIII. Guerra, José Guilherme Marinho, colab. IX. Xavier, Gustavo Ribeiro, colab. X. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). XI. Título. XII. Série.

CDD 541.372

# **Autores**

## **Norma Gouvêa Rumjanek**

Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia, C. Postal 74.505, BR 465 km 07, Seropédica, RJ, Brasil, 23851-970. e-mail: norma@cnpab.embrapa.br

## **Jerri Édson Zilli**

Pesquisador da Embrapa Roraima. BR 174, Km 8 - Distrito Industrial - Boa Vista, RR, Brasil, 69301-970. e-mail: zilli@cpafrr.embrapa.br

## **Fernando Wagner Rangel**

Estudante de Doutorado em Biotecnologia – UFAM. Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000 – Coroadó, Manaus, AM, Brasil, 69077-000

## **Samuel Ribeiro Passos**

Estudante de Doutorado em Agronomia – Ciência Rural – UFRRJ. BR 465 km 07, Seropédica, RJ, Brasil, 23890-000

## **Claudia Miranda Martins**

Professora da UFC, Campus Pici, Bl. 909 – Fortaleza, CE, Brasil, 60455-760

## **Enderson Petrônio de Brito Ferreira**

Pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão. Rodovia GO 462, km 12, Zona Rural, C. Postal 179, Sto Antônio de Goiás, GO, Brasil, 75375-000. e-mail: enderson@cpaf.embrapa.br

## **Marcela C. R. Aboim**

Estudante de Doutorado em Biotecnologia Vegetal – UFRJ. Centro de Ciências da Saúde, Bl. K, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ.

## **Rayssa Vincentin**

Estudante de Agronomia – UFRRJ. BR 465 km 07, Seropédica, RJ, Brasil, 23890-000

## **José Guilherme Marinho Guerra**

Pesquisador da Embrapa Agrobiologia. C. Postal 74.505, BR 465 km 07, Seropédica, RJ, Brasil, 23851-970. e-mail: gmguerra@cnpab.embrapa.br

## **Gustavo Ribeiro Xavier**

Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, C. Postal 74.505, BR 465 km 07, Seropédica, RJ, Brasil, 23851-970. e-mail: gustavo@cnpab.embrapa.br

# SUMÁRIO

Resumo .....	7
Abstract.....	8
Introdução .....	9
Material e Métodos .....	10
Experimento I : Impacto de uso de herbicida glifosato na comunidade bacteriana associada a rizosfera de soja .....	11
I.1. Delineamento e coleta de solo .....	11
I.2. Enriquecimento da Comunidade Bacteriana Através do Cultivo em Meio Solo .....	12
I.3. Extração de DNA.....	13
I.4. Condições da PCR e DGGE .....	13
Experimento II: Determinação do efeito de fungicidas sobre a comunidade bacteriana associada a rizosfera do feijoeiro .....	14
II.1. Delineamento e coleta de amostras .....	14
II.2. Enriquecimento da Comunidade Bacteriana .....	15
II.3. Extração de DNA.....	15
II.4. Condições da PCR e DGGE .....	15
Experimento III: Determinação do efeito de agrotóxico sobre a comunidade bacteriana associada a rizosfera de batata .....	15
III.1. Coleta do Solo e Instalação dos Experimentos .....	15
III.3. Enriquecimento da Comunidade Microbiana em Meio Solo .....	16
III.4. Extração de DNA.....	16
III.5. Condições da PCR e DGGE .....	16
Experimento IV: Avaliação da comunidade microbiana em diferentes classes de solos .....	17
IV.1. Coleta de amostras .....	17
IV.2. Enriquecimento da Comunidade Bacteriana.....	17
IV.3. Extração de DNA .....	17
IV.4. Condições da PCR e DGGE .....	17
Resultados e Discussões.....	18
Experimento I: Impacto de uso de herbicida glifosato na comunidade bacteriana associada a rizosfera de soja .....	18
Experimento II: Determinação do efeito de fungicidas sobre a comunidade bacteriana associada a rizosfera do feijoeiro cv. Pérola .....	19
Experimento III: Determinação do efeito de agrotóxicos sobre a comunidade bacteriana associada a rizosfera de batata .....	20
Experimento IV: Avaliação da comunidade microbiana em diferentes classes de solos .....	22
Conclusões .....	23
Referências Bibliográficas .....	24

# Uso do Meio Solo e PCR/DGGE como estratégia para caracterização da comunidade bacteriana

---

*Norma Gouvêa Rumjanek  
Jerri Édson Zilli  
Fernando Wagner Rangel  
Samuel Ribeiro Passos  
Claudia Miranda Martins  
Enderson Petrônio de Brito Ferreira  
Marcela C. R. Aboim  
Rayssa Vincentin  
José Guilherme Marinho Guerra  
Gustavo Ribeiro Xavier*

## Resumo

---

A caracterização da comunidade microbiana baseada em métodos dependentes e independentes de cultivo tem recebido destaque nos últimos anos e representa uma relevante complementaridade para a ecologia microbiana. O objetivo deste trabalho foi apresentar uma nova estratégia metodológica utilizando solo como fonte de nutrientes para o cultivo microbiano e posterior caracterização do perfil da comunidade por PCR-DGGE. Como forma de demonstrar a aplicabilidade dessa estratégia metodológica, diferentes fontes de DNA de amostras ambientais foram testadas, variando o tipo de solo, a cultivar e o manejo agrônomo adotado. Os perfis de PCR-DGGE obtidos com o perfil da comunidade microbiana de amostras ambientais utilizando o solo como fonte de nutrientes e inóculo para seu cultivo revelaram ser possível adotar essa estratégia para revelar géis que apresentam nitidez das bandas, dinâmica das populações, dominância de bandas, os quais são atributos compatíveis com os observados em outras análises por DGGE utilizando kits de extração de DNA de microrganismos de ambientes naturais. A utilização do meio-solo ou suas variações como fonte de nutrientes e inóculo, representa uma forma adicional de identificar fatores ambientais ou antrópicos, que influenciam a atividade e a estrutura da comunidade microbiana.

Palavras-chave: eletroforese em gel de gradiente desnaturante, ecologia microbiana, análise do solo,

# Soil medium and PCR-DGGE as a strategy to characterize bacterial community

---

## Abstract

---

The characterization of microbial community based on dependent and independent methods of cultivation has received attention in recent years and represents an important complement to the microbial ecology. The purpose of this study was to present a new strategy methodology using soil as a source of nutrients for microbial cultivation and further characterization of the profile of the community by PCR-DGGE. As a way of demonstrating the applicability of this strategy methodology, different sources of DNA from environmental samples were tested by varying the type of soil, cultivate and agronomic management adopted. The profiles of PCR-DGGE obtained from microbial community of environmental samples using 1the soil as a source of nutrients and inoculum for its cultivation can be revealed adopt this strategy to reveal profile showing sharpness of bands, the population dynamics, dominance of bands. These attributes are consistent with those observed in other reviews by PCR-DGGE using kits to extract DNA of microorganisms in natural environments. The use of medium soil or its variations as a source of nutrients and inoculum, represents an additional way to identify environmental factors or anthropogenic, that influence the activity and structure of microbial community.

Keywords: denaturing gradient gel electrophoresis, microbial ecology, soil analysis,



## Introdução

---

Os microrganismos do solo contemplam uma importante fração da biota edáfica, tanto pela diversidade de espécies, quanto pela multiplicidade de atividades metabólicas desempenhadas. Eles atuam nos ciclos biogeoquímicos de vários nutrientes no solo, através da decomposição e mineralização da matéria orgânica, disponibilização de nutrientes retidos nos colóides do solo e fixação biológica de nitrogênio (KENNEDY, 1999; RANJARD et al., 2000). Além disso, estes microrganismos apresentam elevado valor biotecnológico, pois atuam na supressão de doenças vegetais, promoção de crescimento de plantas e degradação de xenobiontes e, também sendo fonte de genes, enzimas, ácidos orgânicos e muitos compostos ainda não explorados (BULL et al., 2000).

Segundo RANJARD et al. (2000), os microrganismos do solo, por atuarem intensamente nas cadeias tróficas e nos diversos processos ecológicos do solo, possuem potencial para revelar a história passada do ambiente. Por isso, é essencial entender o inter-relacionamento 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.

Apesar de reconhecida a sua essencialidade e de um certo entendimento de suas relações com os mecanismos gerais que controlam cada ciclo biogeoquímico, existem lacunas consideráveis nos conhecimentos relativos à diversidade microbiana e às funções exercidas pelos microrganismos em seu ambiente natural (ROSADO & DUARTE, 2002).

Parte desse problema deve-se ao paradigma de que os microrganismos do solo, apresentam uma grande diversidade e somente uma pequena proporção pode ser cultivada, já que não são conhecidas as exigências nutricionais, inter-relações e interdependências com os demais componentes (bióticos e abiótico) do ambiente (TORVISK, GOSKOYR E DAAE, 1990; AMANN, LUDWIG E SCHLEIFER, 1995; BAKKEN, 1995; GANS WOLINSKY E DUNBAR, 2005). Isto deve-se à carência de informações sobre a diversidade dos microrganismos, o que demonstra a necessidade de maior refinamento dos métodos de caracterização desses microrganismos

(RANJARD POLY E NAZARET, 2000; KOZDRÓJ e VAN ELSAS, 2001).

Como resultado, várias abordagens metodológicas baseadas em métodos independentes de cultivo, a exemplo do DGGE, TGGE, SSCP, RFPL, ARDRA, BOX-PCR, ITS-PCR e ERIC-PCR, têm sido desenvolvidas como forma de avaliar a diversidade (genética e estrutural) da comunidade microbiana de ambientes naturais, mas ainda assim, os métodos apresentam limitações e são pouco informativos sobre a atividade metabólica, biomassa e diversidade desses microrganismos. Apesar dessas limitações, a técnica de DGGE (“Denaturing gradient gel electrophoresis” - Eletroforese em gel de gradiente desnaturante) vem sendo uma das ferramentas mais utilizadas na ecologia molecular microbiana (MUYZER e SMALLA, 1998), permitindo aumentar o conhecimento sobre os microrganismos em diferentes ambientes (SAIT, HUGENHOLTZ e JANSSEN, 2002; GREEN et al., 2004; KEMNITZ, KOLB e CONRAD, 2005).

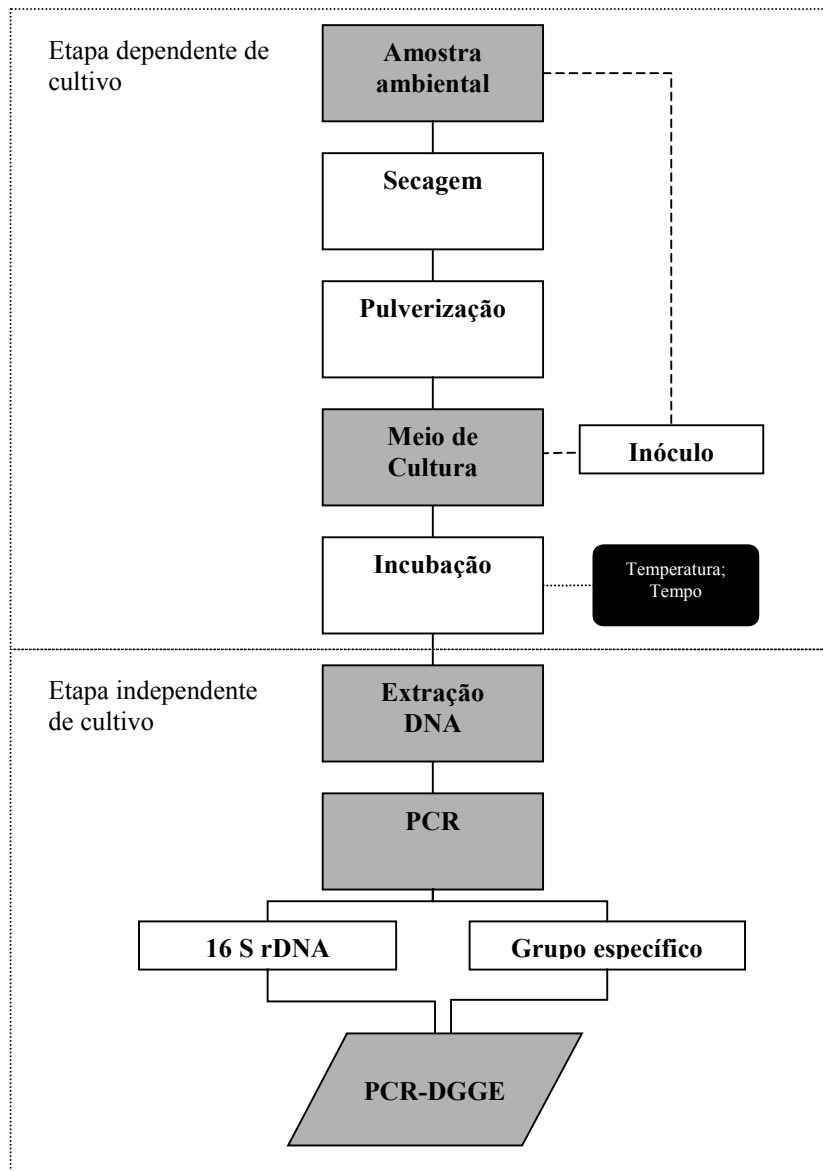
A abordagem polifásica de avaliação da comunidade microbiana baseada em métodos dependentes e independentes de cultivo tem recebido destaque nos últimos anos e representa uma relevante complementaridade para a ecologia microbiana na caracterização dessas comunidades (EDENBORN e SEXSTONEA, 2007).

O presente trabalho teve como objetivo apresentar uma nova estratégia metodológica utilizando solo como fonte de nutrientes para o cultivo microbiano e posterior caracterização do perfil da comunidade com a ferramenta molecular de PCR-DGGE.

## **Material e Métodos**

---

Como forma de demonstrar a aplicabilidade dessa estratégia metodológica (Figura 1), diferentes fontes de DNA de amostras ambientais foram testadas, conforme descrição dos experimentos:



**Figura 1:** Estratégia para caracterização do perfil da comunidade microbiana utilizando solo como fonte de nutrientes e inóculo para seu cultivo (etapa dependente de cultivo) e PCR-DGGE (etapa independente de cultivo).

## Experimento I : Impacto de uso de herbicida glifosato na comunidade bacteriana associada a rizosfera de soja<sup>a</sup>

### I.1. Delineamento e coleta de solo

Amostras de um solo Latossolo Vermelho Distroférico foram coletadas na profundidade de 0-20 cm de uma área de lavoura de soja conduzida no sistema de plantio direto e de uma mata nativa em Londrina (PR) localizadas no campo experimental da Embrapa Soja (latitude 23 11; longitude 51 11) e transportadas para a Embrapa

<sup>a</sup> parte da tese de doutorado do segundo autor.

Agrobiologia em Seropédica (RJ). Foi conduzido em casa de vegetação um experimento entre os meses de maio e agosto de 2003 sob condições controladas. O solo foi homogeneizado e acomodado em vasos plásticos com aproximadamente 1 kg, onde manteve-se a umidade do solo em torno de 2/3 da capacidade de campo. O delineamento experimental foi blocos ao acaso com três repetições e cinco tratamentos: quatro doses do herbicida glifosato no solo (2,2; 4,4; 8,8 e 17,6 mg kg<sup>-1</sup> de ingrediente ativo (i.a.), que correspondem as doses de 1,4; 2,8; 5,6 e 11,2 kg ha<sup>-1</sup> de i. a. e um controle sem herbicida. A aplicação do herbicida foi realizada no início do experimento misturando-se uma solução (1:10, v/v, herbicida:água) ao solo. Foram realizadas coletas de amostras de solo para serem inoculadas no meio solo em 1, 3, 9, 27 e 81 dias após a aplicação do herbicida.

A Tabela 1 apresenta o resultado das análises físicas e químicas do solo antes da aplicação do herbicida.

**Tabela 1:** Análise química do solo das áreas de lavoura e mata coletadas em Londrina (PR) na profundidade de 0-20 cm, realizada no laboratório de solos da Embrapa Agrobiologia (EMBRAPA, 1997)

Amostras	pH	Matéria orgânica (%)	Al <sup>+3</sup>	Ca <sup>+2</sup> + Mg <sup>+2</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> + HPO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	K <sup>+</sup>
			cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>			mg/dm <sup>3</sup>		
Área da lavoura <sup>a</sup>	6,5	2,5	0,0	6,7	4,7	2,0	58	440
Área da mata <sup>b</sup>	6,0	6,0	0,0	10,2	8,3	1,9	4	420

<sup>a</sup> Latossolo Vermelho Distroférrico com textura muito argilosa (63% de argila, 7% de areia e 30% de silte) (EMBRAPA, 1997);

<sup>b</sup> Latossolo Vermelho Distroférrico com textura muito argilosa (63% de argila, 9% de areia e 28% de silte) (EMBRAPA, 1997).

## I.2. Enriquecimento da Comunidade Bacteriana Através do Cultivo em Meio Solo

Antes da aplicação do herbicida separou-se uma fração do solo que foi submetida a uma pulverização em moinho de rolagem (SMITH & MYUNG, 1990). O preparo do meio consistiu de 40 g de terra pulverizada, 3 g de ágar e água para completar o volume de 100 mL, seguindo-se uma autoclavagem e distribuição de aproximadamente 30 mL deste meio nas placas de Petri (ZILLI et al., 2003). Como inoculante utilizou-se 100 µL de uma suspensão 10<sup>-1</sup> (10g.100mL<sup>-1</sup>)

das amostras de solo, coletadas de cada tratamento e dissolvidas em solução salina (0,85% de NaCl). Estabeleceu-se um tempo de crescimento de cinco dias em temperatura de 25°C. Após este período, fez-se uma lavagem da superfície do meio de cultura com água deionizada esterilizada coletando-se a suspensão microbiana em microtubos que foram submetidos a centrifugação (10000rpm; 20min) e o precipitado armazenado (-20°C) até o processamento seguinte.

### **I.3. Extração de DNA**

Para a extração de DNA, seguiu-se o protocolo descrito por SCHWIEGER e TEBBE (1998) e modificado por XAVIER et al. (2004). O precipitado microbiano estocado (-20°C) foi ressuspenso em 0,6 mL de tampão de lise TES (0,05 M NaCl; 0,01 M EDTA; 0,05 M Tris HCl pH 8,0; 1% SDS) e agitado em vórtex. Em seguida, as amostras foram submetidas a 5 etapas de congelamento/descongelamento, constituídas de imersão em nitrogênio líquido (5 min), agitação (180 rpm; 10 seg) e aquecimento (65°C; 5 min). Aplicou-se, então, 8,4 µL de proteinase K (20 mg mL<sup>-1</sup>) nas amostras que foram incubadas sob agitação (180 rpm; 65°C; 1h). Em seguida, adicionou-se, 0,6 mL (1 volume) de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugou-se as amostras (5.000 rpm; 6 min). O sobrenadante foi transferido cuidadosamente para novos tubos, onde foram adicionados 0,6 mL (1 volume) de clorofórmio-álcool isoamílico, repetindo-se a centrifugação anterior. Uma alíquota de aproximadamente 0,5 mL do sobrenadante foi transferida para um novo tubo e 0,5 volumes de isopropanol gelado foram adicionados. As amostras foram, então, incubadas (60 min; -20°C) e centrifugadas (13.000 rpm; 20 min). Removido o sobrenadante, o precipitado foi centrifugado a vácuo para a secagem e ressuspendido em 50 µL de tampão TE (10 mM Tris; 1 mM NA-EDTA; pH 8,0). O DNA extraído foi submetido a eletroforese (100V; 20min.) em tampão de corrida TBE (0,5X) em gel de agarose (0,8%), corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV.

### **I.4. Condições da PCR e DGGE**

As reações de amplificação foram realizadas com três diluições do DNA extraído (1:10; 1:25 e 1:50). Cada 35 µL da reação consistiu de 1 µL do produto da extração de DNA, tampão (10 mM), MgCl<sub>2</sub> (3,5 mM), dNTP (0,2µM cada), *Taq* DNA polimerase (0,7U) e os iniciadores

968F-CG e 1401R (0,2  $\mu$ M cada). Estes iniciadores e as condições da reação de PCR: aquecimento inicial (95°C; 3 min), 40 ciclos compostos de desnaturação (94°C; 30 seg), anelamento (55°C; 30 seg) e extensão (72°C; 30 seg) e uma etapa final de extensão (72°C; 5 min) estão descritas em GELSOMINO et al.(1999). Após a amplificação, os produtos das três reações de PCR, provenientes das diluições, foram combinados em um único microtubo.

O produto da amplificação foi analisado por DGGE (Eletroforese em gel com gradiente desnaturante), utilizando o sistema DCode™ (BioRad DCode™ System -Universal Mutation Detection System). O gradiente desnaturante utilizado foi de 50-65%, obtido usando-se duas soluções, uma contendo apenas solução de poli-acrilamida e a outra uréia (7M) e formamida (40% v/v) e poli-acrilamida. A eletroforese foi realizada no sistema *Dcode™* (Bio-Rad) sob voltagem constante (120V; 60°C; 16 h) e ao final o gel foi corado com uma solução de Sybr Gold (Molecular Probe, N° Cat.S11494) (20X) e visualizado sob luz ultravioleta no sistema de foto-documentação IMAGO (B&L).

## **Experimento II: Determinação do efeito de fungicidas sobre a comunidade bacteriana associada a rizosfera do feijoeiro<sup>b</sup>**

### **II.1. Delineamento e coleta de amostras**

Amostras de solo foram coletadas na Fazenda Capivara de propriedade da Embrapa Arroz e Feijão em Goiânia, área de produção de feijão. A adubação foi realizada conforme a recomendação para a cultura do feijão.

O experimento foi implantado em casa-de-vegetação, cultivando-se feijão (cv Pérola) em vasos de 1,5 kg. As amostras de solo foram utilizadas para o cultivo das plantas sob a aplicação de 6 fungicidas (carboxin – thiram, carbendazim – thiram, Trifenil hidróxido de estanho, Mancozeb, Thiophante – Methyl e Azoxystrobin). O experimento foi delineado em blocos ao acaso com 5 repetições e 3 coletas.

Os fungicidas Derosal e Vitavax-Thiram foram aplicados na semeadura. As pulverizações dos fungicidas foram realizadas

---

<sup>b</sup> parte do trabalho de pós-doutorado da quinta autora.

conforme as recomendações dos fabricantes, utilizando-se para tal finalidade um pulverizador costal com capacidade para cinco litros. Foram realizadas três coletas aos 34, 48 e 69 dias após o plantio.

## **II.2. Enriquecimento da Comunidade Bacteriana**

Foram utilizadas as mesmas condições citadas anteriormente (I.2), utilizando a relação de 20:1 de solo e ágar em 100ml de água.

## **II.3. Extração de DNA**

Foram utilizadas as mesmas condições citadas anteriormente (I.3).

## **II.4. Condições da PCR e DGGE**

A reação de PCR consistiu de um volume final de 35µL, sendo este composto de tampão 1X (20mmol/L Tris-HCl; pH 8,0; 500mmol/L KCl), 1,5mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, 250 µmol/L dNTPs (200mmol/L cada), 0,4µmol/L de cada iniciador e 1U de DNA polimerase (*Taq* DNA polymerase, Promega). Foram utilizados os iniciadores 1401R e U968F-GC (0,2µM cada). A reação de amplificação foi realizada em um termociclador PERKIN ELMER GeneAmp 9600. Estes iniciadores e as condições da reação de PCR: aquecimento inicial (95°C; 30 s), anelamento (55°C; 30 s) e extensão (72°C; 30 s) e uma etapa final de extensão (72°C, 5 min) conforme GELSOMINO et al. (1999). O produto da amplificação foi analisado por DGGE conforme citado anteriormente.

## **Experimento III: Determinação do efeito de agrotóxico sobre a comunidade bacteriana associada a rizosfera de batata<sup>c</sup>**

### **III.1. Coleta do Solo e Instalação dos Experimentos**

Amostras de solo foram coletadas no Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA), localizado no município de Seropédica (RJ), em Área de Produção Convencional (APC) de batata e Área de Floresta Secundária (AFS) em junho de 2003 na Embrapa Hortaliças, Brasília – DF.

---

<sup>c</sup> parte da tese de doutorado do sexto autor.

Foi conduzido um experimento em casa-de-vegetação em um delineamento experimental em blocos ao acaso com 3 repetições, com parcela sub-dividida no tempo e fatorial (5X3) na parcela. O fatorial foi composto pelos 3 tipos de solo e 5 agrotóxicos, sendo 3 inseticidas e 2 fungicidas e 1 tratamento controle. O efeito das 4 coletas, realizadas aos 32, 47, 62 e 77 dias após o plantio (DAP), foi avaliado na sub-parcela.

Os solos foram peneirados e o preparo dos vasos foi realizado misturando-se vermiculita ao solo na proporção 3:1 (3 partes de solo para 1 parte de vermiculita). Cada solo foi misturado à vermiculita separadamente com o auxílio de uma betoneira, cujo interior, antes e depois desta operação com cada solo, foi fumigado pela adição de 30 mL de Clorofórmio ( $\text{CH}_3\text{Cl}$ ) e incubada durante 1 noite com a abertura lacrada, com o objetivo de evitar a contaminação do solo subsequente. O plantio das plantas de batata cv. Achat foi realizado em meados de julho de 2003 e foram feitas duas pulverizações aos 30 e 45 DAP com um dos três inseticidas (Aldicarb, Clorpirifós e Deltametrina) e dois fungicidas (MetalaxII+ Mancozeb e Tebuconazole), com exceção do Aldicarb, que foi incorporado ao solo no momento do preparo dos vasos. As coletas foram realizadas aos 32, 47, 62 e 77 DAP.

### **III.3. Enriquecimento da Comunidade Microbiana em Meio Solo**

Foram utilizadas as mesmas condições citadas anteriormente (I.2), utilizando a relação de 20:1 de solo e ágar em 100ml de água.

### **III.4. Extração de DNA**

Foram utilizadas as mesmas condições citadas anteriormente (I.3).

### **III.5. Condições da PCR e DGGE**

Foram utilizadas as mesmas condições citadas anteriormente (II.4).



## **Experimento IV: Avaliação da comunidade microbiana em diferentes classes de solos<sup>d</sup>**

### **IV.1. Coleta de amostras**

Foram analisadas amostras de 8 classes de solo (1-CHERNOSSOLO EBÂNICO Órtico típico, 2-NITOSSOLO HÁPLICO distrófico moderado típico, 3-ARGISSOLO ACINZENTADO distrófico arênico fragipânico, 4-ARGISSOLO VERMELHO-AMARELO distrófico típico, 5-CAMBISSOLO FLUVICO, 6-GLEISSOLO HÁPLICO tb distrófico típico, 7-NEOSSOLO FLUVICO tb distrófico típico, 8-LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO) sob cobertura vegetal de pastagem. As amostras foram coletadas no Município de Pinheiral, RJ. De cada solo foram coletadas 7 amostras compostas por 5 amostras simples, de uma profundidade de 0-20 cm.

### **IV.2. Enriquecimento da Comunidade Bacteriana**

Foram utilizadas as mesmas condições citadas anteriormente (I.2), utilizando a relação de 10:1 de solo e ágar, para cada classe de solo.

### **IV.3. Extração de DNA**

Foram utilizadas as mesmas condições citadas anteriormente (I.3).

### **IV.4. Condições da PCR e DGGE**

Primers universais para amplificação do 16S rDNA (U968gc1 5'-CGCCCGCCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCGGGGGGCA CGGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC-3' e L1401 5'-GCGTGTGTACAAGACCCC-3') foram utilizados para avaliar a comunidade bacteriana total do solo. As condições de amplificação foram similares às utilizadas por MUYZER, DE WAAL e ULTTERLINDEN (1993).

As amostras amplificadas foram aplicadas em gel de poliacrilamida (6,5%) com gradiente desnaturante de 50% a 65% para as amostras de eubacterias (ABOIM, 2004). Após a corrida eletroforética o gel foi corado a partir da coloração com prata.

---

<sup>d</sup> parte da tese de doutorado da sétima autora.

Para a análise do perfil de bandas foi utilizado o programa NTSYS, utilizando o coeficiente Jaccard e o método UPGMA.

## **Resultados e Discussões**

---

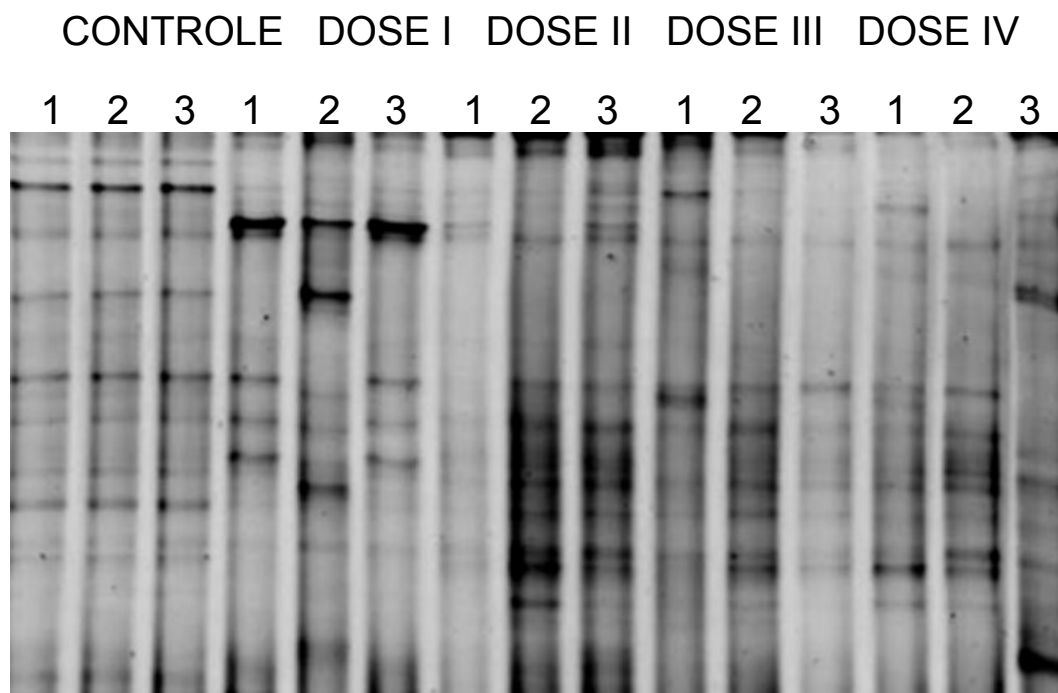
Nos resultados das análises de PCR-DGGE para a obtenção do perfil da comunidade microbiana de amostras ambientais utilizando o solo como fonte de nutrientes e inóculo para seu cultivo (Figura 1), indicaram a utilidade da estratégia adotada para caracterizar essa comunidade, conforme descrito em cada um dos experimentos:

### **Experimento I: Impacto de uso de herbicida glifosato na comunidade bacteriana associada a rizosfera de soja**

Para exemplificação desse experimento, foram apresentados os resultados referentes à caracterização da comunidade bacteriana de amostras de solo da área de mata, após nove dias da aplicação do herbicida glyphosate, com a aplicação de quatro doses do herbicida glifosato, 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6 mg kg<sup>-1</sup> de i. a no solo e um controle sem a aplicação de herbicida (Figura 2).

De acordo com os resultados, foi observado diferença no perfil da comunidade bacteriana em relação aos tratamentos, sobretudo em relação ao tratamento controle, sem a aplicação de herbicida. O efeito da dose de herbicida também foi observado, assim como a presença de bandas que desapareceram ou surgiram em relação ao controle. A degradação do herbicida e a seleção de bactérias resistentes ou tolerantes aos herbicidas ou seus metabólitos são indicativos da dinâmica populacional (AMARRANTE JÚNIOR et al., 2002; ZILLI et al., 2008).

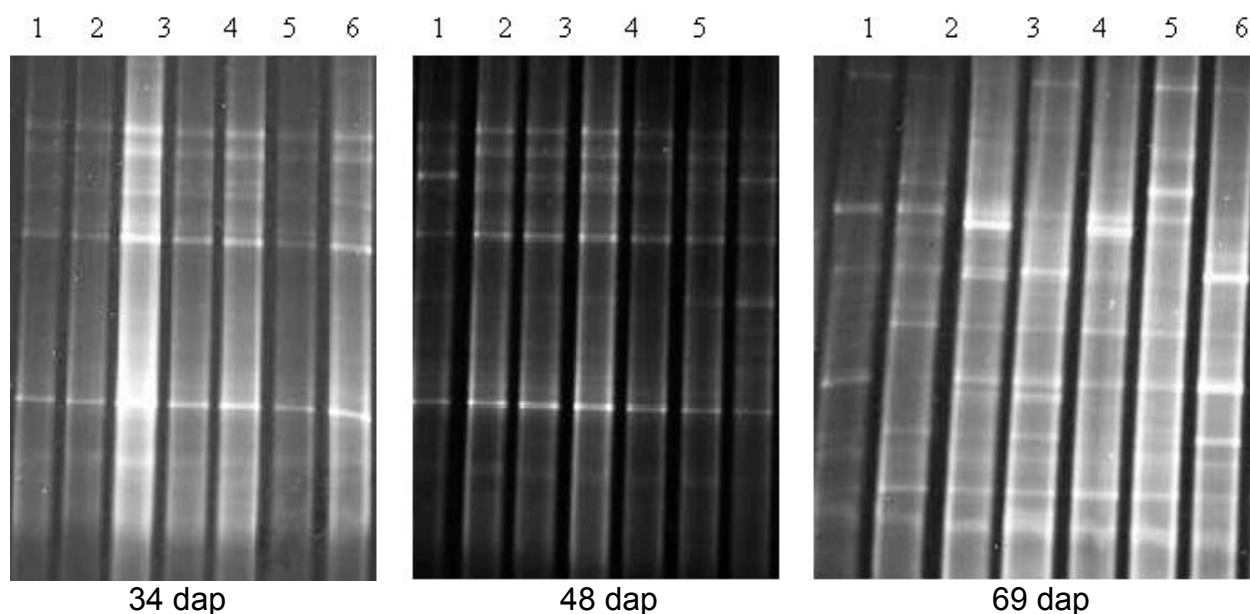
Em alguns casos, têm sido observado efeito negativo sobre microrganismos do solo (WACHOWSKA e BANASZKIEWICZ, 1999; KREMER et al., 2005), e até efeito positivos da aplicação de glifosato (SMILEY, OGG e JAMES COOK, 1991; DESCALZO et al., 1998; JOHAL e RAHE, 1984; LEVESQUE, RAHE e EAVES, 1993; KREMER, 2003; KREMER, MEANS e KIM, 2005).



**Figura 2:** Perfis de PCR-DGGE representativos da comunidade bacteriana (16S rDNA) presentes em amostras de solo da área de mata, após nove dias da aplicação do herbicida glyphosate. Os número de 1 a 3 indicam as repetições de cada tratamento. Doses do herbicida glifosato: controle) 0; i) 2,2; ii) 4,4; iii) 8,8 e iv) 7,6 mg kg<sup>-1</sup> de i. a no solo.

## Experimento II: Determinação do efeito de fungicidas sobre a comunidade bacteriana associada a rizosfera do feijoeiro cv. Pérola

Na figura 3 pode-se observar os perfis de PCR-DGGE da comunidade bacteriana cultivada em meio solo na área de produção, com os tratamentos: Controle, Amistar, Brestanid, Cercobin, Derosal, Persist e Vitavax, oriundos das três coletas.

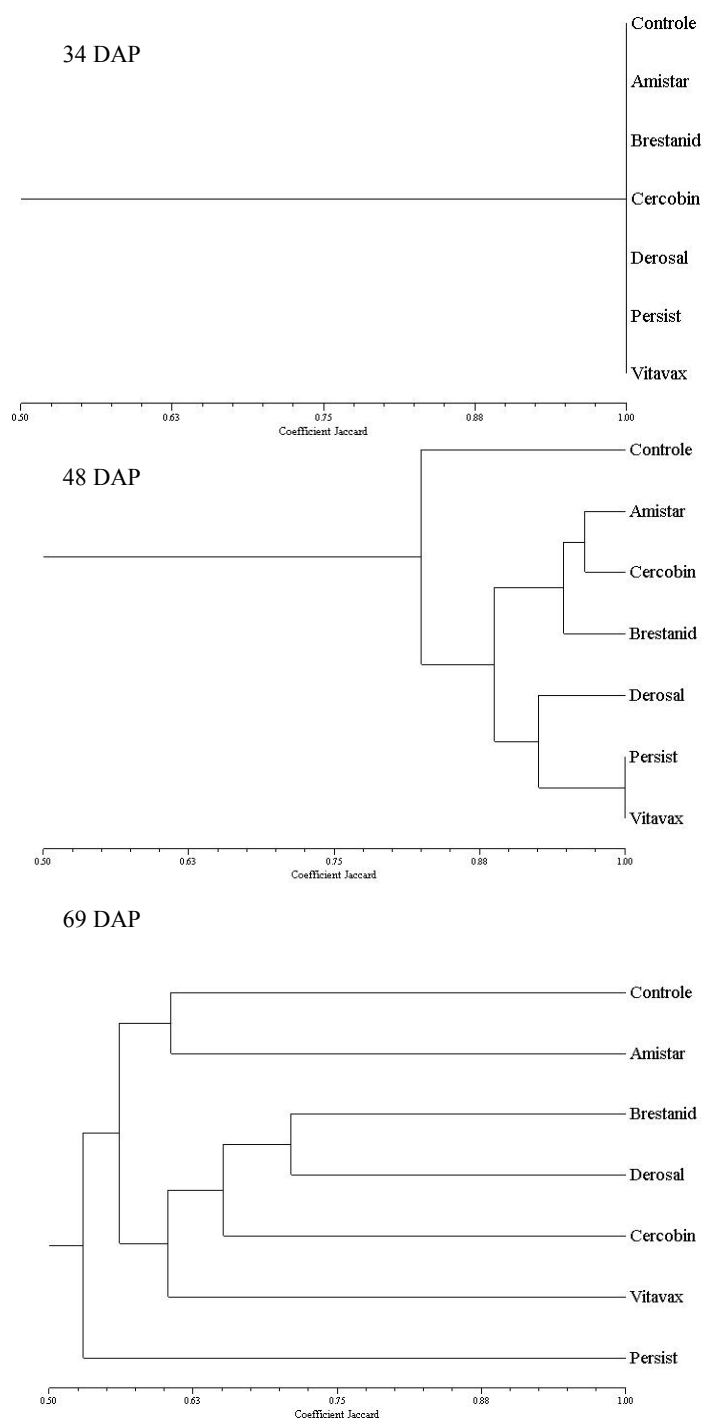


**Figura 3:** Perfis de PCR-DGGE representativos da comunidade bacteriana cultivada em meio solo na área de produção. Dados de 3 coletas (34, 48 e 69 DAP). Tratamentos: 1 (Controle), 2 (Amistar), 3 (Brestanid), 4 (Cercobin), 5 (Derosal), 6 (Persist), 7 (Vitavax).

Os dados obtidos na área de produção na primeira coleta mostraram não haver diferença do controle em relação aos fungicidas aplicados de acordo com o dendrograma de similaridade entre as amostras (Figura 4A). Em um primeiro momento a comunidade não sofreu alteração na comunidade bacteriana, sugerindo que a população estava adaptada à presença desse tipo de agroquímico. Na segunda coleta já se pode observar uma pequena alteração dos perfis em relação ao tratamento controle (Figura 4B). Na terceira coleta a alteração dos perfis foi mais pronunciada, sendo o fungicida Persist o que mais alterou a comunidade em relação ao tratamento controle (Figura 4C).

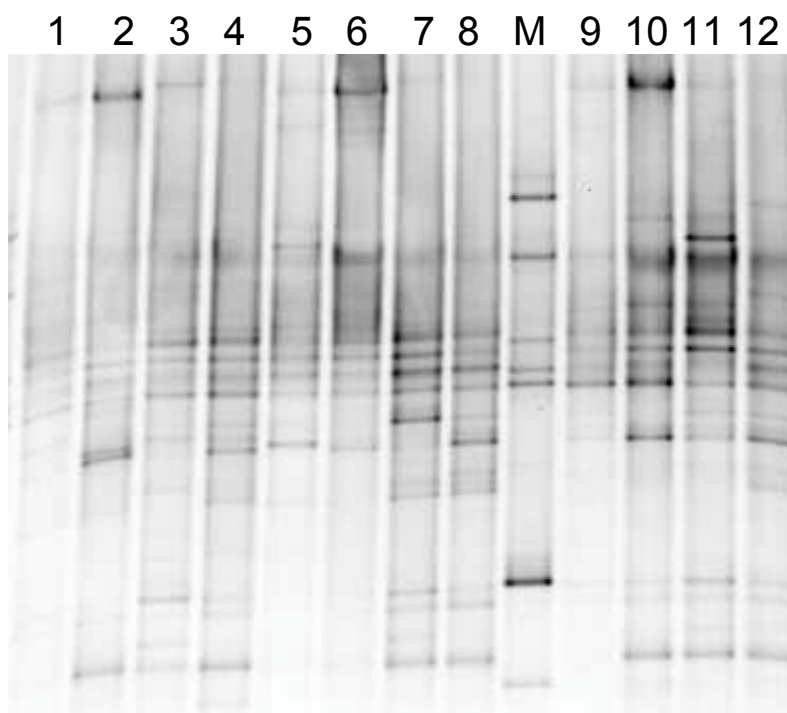
### **Experimento III: Determinação do efeito de agrotóxicos sobre a comunidade bacteriana associada a rizosfera de batata**

Em relação ao perfil obtido por PCR-DGGE da comunidade bacteriana associada a rizosfera de batata foi apresentado os resultados referentes ao tratamento com fungicidas (Tebuconazole e Metalaxil + Mancozeb). Nesse caso, foi observada alteração da comunidade em relação ao tratamento controle e em relação ao período da coleta (Figura 5), o que sugere um efeito do tipo e do tempo de aplicação dos fungicidas.



**Figura 4:** Dendrograma obtido através da análise de 16S rDNA por PCR-DGGE da comunidade bacteriana associada a rizosfera do feijoeiro cv. Pérola. Dados de 3 coletas (34, 48 e 69 DAP).

Apesar do objetivo do trabalho não foi avaliar a degradabilidade dos agrotóxicos ao longo do tempo, tem sido observado que a toxicidade causada pela aplicação de produtos químicos sobre os microrganismos é atenuada quando ocorre a degradação do produto, pela escala temporal, o que tem sido sugerido estar associado à recuperação da população microbiana (TOPP, VALLAEYS e SOULAS, 1997).



**Figura 5:** Gel de PCR-DGGE de comunidades bacterianas da área de produção convencional de batata (Brasília) crescida em meio solo, submetida ao tratamento com fungicidas: Linhas 1 a 4- Tebuconazole, coletas 1, 2, 3 e 4; Linhas 5 a 8- Metalaxil+Mancozeb, coletas 1, 2, 3 e 4 e Linhas 9 a 12- Controle, coletas 1, 2, 3 e 4.

## Experimento IV: Avaliação da comunidade microbiana em diferentes classes de solos

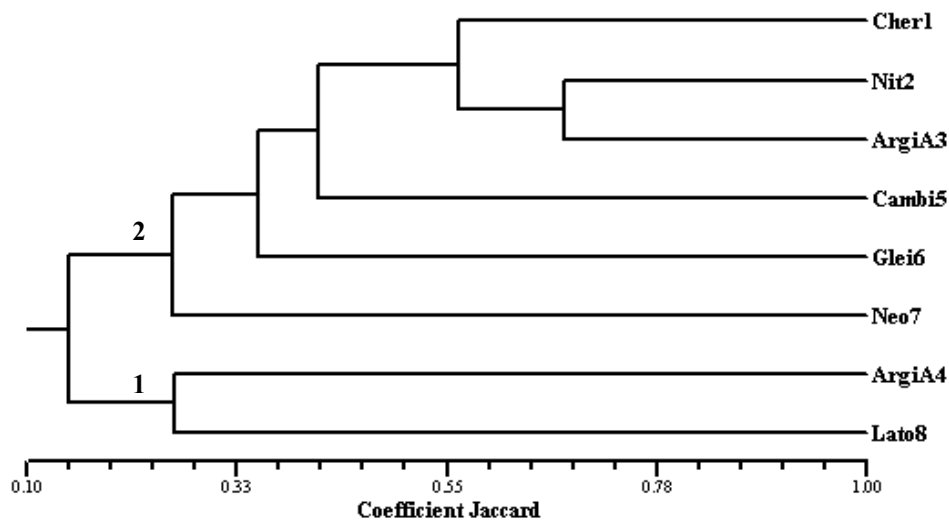
Analisando os perfis de PCR-DGGE foi possível a construção de um dendrograma de similaridade da comunidade bacteriana em que se pode observar que houve a formação de dois grupos no dendrograma, um (grupo 1) formado pelo ARGISSOLO VERMELHO-AMARELO e pelo LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO, apresentando baixa similaridade (menos de 30%) e outro grupo (grupo 2) formado pelos demais solos (Figura 6).

Uma maior similaridade (65%) foi apresentada pelos solos ARGISSOLO ACINZENTADO (ArgiA3) e NITOSSOLO HÁPLICO (Nito2). Os demais solos se agrupam a esses dois em índices que variam de 25 à 55% de similaridade.

Avaliando a divergência entre os perfis de DGGE gerados, observou-se que os solos apresentaram em sua diversidade bacteriana poucos membros da comunidade que são comuns a todos os solos, representam aproximadamente 15% da similaridade e, um grande

número de membros da sua comunidade microbiana que são exclusivo de cada solo.

No grupo 1 esta divergência de membros é maior, enquanto que no grupo 2 há uma diminuição do número de membros exclusivos que os diferem, na seguinte ordem crescente de similaridade: NEOSSOLO FLUVICO < GLEISSOLO HÁPLICO < CAMBISSOLO FLUVICO < CHERNOSSOLO EBÂNICO < NITOSSOLO HÁPLICO = ARGISSOLO ACINZENTADO.



*Figura 6: Dendrograma de similaridade da comunidade bacteriana de 8 classes de solo, avaliada pelo 16SrDNA do solo PCR-DGGE.*

Além da capacidade de utilização do solo como fonte de nutrientes para o cultivo microbiano e posterior caracterização do perfil da comunidade por PCR-DGGE, essa abordagem metodológica tem sido realizada com sucesso utilizando resíduos vegetais do processo de compostagem e de biofertilizantes para caracterizar essas comunidades nessas amostras (RANGEL, 2004).

## Conclusões

Os perfis de PCR-DGGE obtidos da comunidade microbiana de amostras ambientais utilizando o solo como fonte de nutrientes e inóculo para seu cultivo revelaram ser possível adotar essa estratégia para revelar géis que apresentam nitidez das bandas, dinâmica das populações, dominância de bandas, os quais são atributos compatíveis com os observados em outras análises por DGGE

utilizando kits de extração de DNA de microrganismos de ambientes naturais.

A utilização do meio-solo ou suas variações como fonte de nutrientes e inóculo, representa uma forma adicional de identificar fatores ambientais ou antrópicos, que influenciam a atividade e a estrutura da comunidade microbiana.

## Referências Bibliográficas

---

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

AMARRANTE JÚNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M. & RIBEIRO, M. L. Glyphosate: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, p. 589-593, 2002.

BAKKEN, L. R. Separation and purification of bacteria from soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, p. 143-169, 1995.

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular biology reviews**, v. 64, p. 573-606, 2000.

DESCALZO, R. D.; PUNJA, Z. K.; LÉVESQUE, C. A. & RAHE, J. E. Glyphosate treatment of bean seedlings causes short-term increases in *Pythium* populations and damping off potential in soils. **Appl. Soil Ecol.**, v. 8, p. 25-33, 1998.

EDENBORN, S. L.; SEXSTONEA, A. J. DGGE fingerprinting of culturable soil bacterial communities complements culture-independent analyses. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, p. 1570-1579, 2007.

GANS, J.; WOLINSKY, M.; DUNBAR, J. Computational Improvements Reveal Great Bacterial Diversity and High Metal Toxicity in Soil. **Science**, v. 26, p.1387-1390, 2005.

GELSOMINO, A.; KEIJZER-WOLTERS, A. C.; CACCO, G.; VAN ELSAS, J. J. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 1-15, 1999.



GREEN, S. J.; FREDERICK C.; MICHEL, F. C. J.; HADAR, Y.; MINZ, D. Similarity of bacterial communities in sawdust and straw amended cow manure composts. **FEMS Microbiology Letters**. v. 233, n. 1, p. 115-123, 2004.

JOHAL, G. S.; RAHE, J. E. Effect of soilborn plant pathogenic fungi on the herbicidal action of glyphosate on bean seedlings. **Phytopathology**, v. 74, p. 950-955, 1984.

KEMNITZ, D.; KOLB, S.; CONRAD, R. Phenotypic characterization of rice cluster III archaea without prior isolation by applying quantitative polymerase chain reaction to an enrichment culture. **Environmental Microbiology**, v. 7, p. 553-565, 2005.

KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 74, p. 65-76, 1999.

KOZDRÓJ, J.; VAN ELSAS, J. D. Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. **Journal of Microbial Methods**, v. 43, p. 197-212, 2001.

KREMER, R. Soil biological processes are influenced by Roundup Ready soybean production. **Phytopathology**, v. 93, p. 104, 2003.

KREMER, R. J.; MEANS, N. E.; KIM, S. Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere microorganisms. **Intern. J. Environ. Anal. Chem.**, v. 85, p. 1165-1174, 2005.

LEVESQUE, C. A.; RAHE, J. E.; EAVES, D. M. Fungal colonization of glyphosate-treated seedlings using a new root plating technique. **Mycol. Res.**, v. 97, p. 299-306, 1993.

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

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, n. 1, p. 27-141, 1998.

RANGEL, F. W. **Aplicação do DGGE na caracterização da comunidade bacteriana durante o processo de compostagem e na produção de biofertilizante AGROBIO determinado por DGGE.** 2004. Dissertação. (Mestrado em Ciências do Solo) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research Microbiology**, v. 51, p.167–177, 2000.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F. Utilização de eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura (TGGE) para estudar diversidade micrônica. In: MELO, I. S. et al. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento: microrganismos Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**, 2002. p. 97-128.

SAIT, M.; HUGENHOLTZ, P.; JANSSEN, P. H. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. **Environmental Microbiology**, v.4, p.654-666, 2002.

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.

SMILEY, R. W.; OGG, A. G.; JAMES COOK, R. Influence of glyphosate on Rhizoctonia root rot, growth, and yield of barley. **Plant Disease**, v. 76, p. 937-942, 1991.

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

TOPP, E.; VALLAEYS, T.; SOULAS, G. Pesticides: Microbial degradation and effects on microorganisms. In: VAN ELSAS, J. D.; TREVORS, J. T.; WELLINGTON, E. M. H. (Ed.). **Modern Soil Microbiology**. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 547-575.

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

WACHOWSKA, U.; BANASZKIEWICZ, T. Effect of herbicide roundup on microorganisms in the rhizosphere of grasses. **Nat. Sci.**, v.2, p.191-200, 1999.

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).

ZILLI, J. E.; BOTELHO, G. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Efeito de glyphosate e imazaquin na comunidade bacteriana do rizoplane de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e em características microbiológicas do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v 32, p. 633-642, 2008.

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











---

## *Agrobiologia*

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento

