

Uso de Ferramentas Moleculares em Estudos da Diversidade de Microrganismos do Solo



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Cerrados
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1517-5111

Dezembro, 2002

Documentos 51

Uso de Ferramentas Moleculares em Estudos da Diversidade de Microrganismos do Solo

Fábio Bueno dos Reis Junior
Iêda de Carvalho Mendes
Kátia Regina dos Santos Teixeira
Veronica Massena Reis

Planaltina, DF
2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Cerrados

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa Postal 08223

CEP 73301-970 Planaltina - DF

Fone: (61) 388-9898

Fax: (61) 388-9879

<http://www.cpac.embrapa.br>

sac@cpac.embrapa.br

Supervisão editorial: *Nilda Maria da Cunha Sette*

Revisão de texto: *Maria Helena Gonçalves Teixeira /*

Jaime Arbués Carneiro

Normalização bibliográfica: *Rosângela Lacerda de Castro*

Capa: *Chaile Cherne Soares Evangelista*

Editoração eletrônica: *Leila Sandra Gomes Alencar*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Souza*

Jaime Arbués Carneiro

1ª edição

1ª impressão (2002): tiragem 100 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Cerrados.

-
- U86 Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo / Fábio Bueno dos Reis Junior... [et al.]. – Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002.
33p.— (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111; 51)
1. Solo - microbiologia. 2. Biologia molecular.
I. Reis Junior, Fábio Bueno dos. II. Série.

631.46 - CDD 21

© Embrapa 2002

Autores

Fábio Bueno dos Reis Junior

Eng. Agrôn., Ph.D., Embrapa Cerrados,
fabio@cpac.embrapa.br

Iêda de Carvalho Mendes

Eng. Agrôn., Ph.D., Embrapa Cerrados,
mendesi@cpac.embrapa.br

Kátia Regina dos Santos Teixeira

Biól., Ph.D., Embrapa Agrobiologia,
katia@cnpab.embrapa.br

Veronica Massena Reis

Eng. Agrôn., Ph.D., Embrapa Agrobiologia,
veronica@cnpab.embrapa.br

Apresentação

O interesse pelo estudo dos microrganismos presentes no solo é cada vez maior, uma vez que esses representam papel crucial na regulação e funcionamento dos ecossistemas. Além disso, esses microrganismos também podem apresentar valores biotecnológico e econômico, representando uma grande fonte de produtos farmacêuticos, corantes, enzimas, ácidos orgânicos e muitos outros recursos ainda inexplorados. No entanto, apesar de sua importância, o solo tem sido considerado um dos habitats menos estudados do planeta. As limitações dos métodos microbiológicos tradicionais, aliadas ao avanço tecnológico na área de biologia molecular, fazem com que as técnicas moleculares sejam, no momento, muito utilizadas para o estudo da diversidade microbiana do solo. Este documento vem colocar à disposição de estudantes e profissionais da área de microbiologia um resumo atualizado dessas técnicas, destacadas por sua ampla utilização por vários pesquisadores.

Carlos Magno Campos da Rocha
Chefe-Geral da Embrapa Cerrados

Sumário

Introdução	9
Importância do uso de ferramentas moleculares em estudos de diversidade	10
A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	11
O Uso do RNA Ribossômico como Marcador Filogenético	12
PCR-clonagem-seqüenciamento	13
ARDRA - Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado	13
Outros Genes e Métodos Utilizados em Análises Filogenéticas	14
Gene <i>nifH</i>	14
Gene <i>gyrB</i>	15
RFLP - Polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição	16
T-RFLP - Polimorfismo do tamanho e composição de bases de fragmentos terminais de restrição	17
AFLP - Polimorfismo de tamanho do fragmento amplificado	18
RAPD - DNA polimórfico amplificado ao acaso	18
REP, ERIC e BOX	19
A Utilização de Sondas para Estudo da Diversidade Microbiana	19
Microarray ou Microchips de DNA	20
DGGE - Eletroforese em gel de gradiente desnaturante	21
TGGE - Eletroforese em gel de gradiente de temperatura	21
SSCP - Polimorfismo conformacional da fita simples	23
Limitações Metodológicas	24
Referências Bibliográficas	25
Abstract	34

Uso de Ferramentas Moleculares em Estudos da Diversidade de Microrganismos do Solo

Fábio Bueno dos Reis Junior

Iêda de Carvalho Mendes

Introdução

É cada vez maior o interesse pelo estudo dos microrganismos presentes no solo uma vez que esses representam papel-chave na ciclagem de nutrientes e na manutenção de sua fertilidade. Existem, ainda, microrganismos que são importantes no controle biológico de doenças e pragas da agricultura (o principal exemplo é o *Bacillus thuringiensis* comumente referido como *Bt* que tem sido utilizado, há vários anos, para o controle de insetos) na degradação de xenobiontes (Xeno = estranho; biótico = vida. Compostos sintéticos como detergentes, plásticos, pigmentos, agrotóxicos e outros), na disponibilização de substâncias promotoras de crescimento para as plantas (rizobactérias promotoras de crescimento das plantas - PGPRs), no aumento da eficiência da planta na absorção de fósforo, água e outros nutrientes (fungos micorrízicos) ou na fixação do nitrogênio atmosférico, fornecendo-o para as plantas (bactérias diazotróficas). Além disso, esses microrganismos também podem apresentar valor biotecnológico, sendo um manancial de fármacos, corantes, enzimas, ácidos orgânicos e muitos produtos ainda inexplorados. Apesar de sua importância, o solo ainda tem sido considerado um dos habitats menos estudados do planeta e apenas recentemente começou-se a entender que sua biodiversidade é fator crucial na regulação e no funcionamento dos ecossistemas ([Copley, 2000](#)).

A qualidade do solo pode ser definida como sua capacidade de sustentar a produtividade biológica e manter a qualidade ambiental. Estudos sobre a

qualidade do solo são importantes como ferramenta de auxílio para os agricultores e como medida de sustentabilidade de diferentes ambientes. No entanto, nossa habilidade em qualificar o solo e identificar as propriedades que servem como indicadores fica complicada pela multiplicidade de fatores químicos, físicos e biológicos que controlam os processos biogeoquímicos e suas variações no espaço e no tempo. Os microrganismos do solo são potencialmente os marcadores biológicos mais sensíveis e disponíveis e podem, portanto, ser muito úteis na classificação de ecossistemas perturbados. Eles constituem a parte viva e mais ativa da matéria orgânica, podendo atuar como indicadores capazes de refletir mudanças sutis nas propriedades do solo bem antes que alterações nos teores de matéria orgânica possam ser observadas. Todavia, sabendo-se que os microrganismos são parte integrante da qualidade do solo, um melhor entendimento da dinâmica e das estruturas das comunidades microbianas é necessário.

Várias metodologias são propostas para estudos que envolvem a ecologia microbiana do solo. A diversidade biológica é geralmente utilizada como índice que reflete a qualidade do ecossistema, de modo que as metodologias que possibilitam o estudo da diversidade microbiana também possam indicar diferenças entre solos tanto com respeito as suas populações quanto a suas funções ([Turco et al., 1994](#)). Por isso, ao acessar a biodiversidade importantes considerações devem ser feitas, não apenas no que se refere ao número e distribuição das espécies, mas também quanto a sua diversidade funcional ([Yin et al., 2000](#)).

Importância do uso de ferramentas moleculares em estudos de diversidade

Tradicionalmente, a detecção e a identificação de bactérias eram feitas de acordo com os principais meios de obtenção de carbono e energia, suas exigências nutricionais e meio de cultivo para seu crescimento, além da observação direta via microscópio ([Kennedy, 1999](#); [Herbert, 1990](#)). No entanto, a utilização dessas metodologias fornecia informações limitadas com necessidade de maior refinamento ([Zak et al., 1994](#)). Como alternativas para esses métodos, foram desenvolvidas várias técnicas, dentre as quais destacam-se aquelas baseadas nos ácidos nucleicos.

As limitações às técnicas tradicionais de detecção e de identificação de microrganismos são ainda maiores quando se quer estudar a diversidade de microrganismos associada a determinado ambiente. Sabe-se que a diversidade das

bactérias é maior que a de qualquer outro grupo de organismos, no entanto, os meios de cultivo são, em maior ou menor extensão, seletivos a grupos particulares. Até mesmo quando se quer utilizar um meio seletivo para determinado organismo-alvo, algumas estirpes não culturáveis, provavelmente, serão excluídas das análises ([Coutinho et al., 1999](#)). [Amann et al. \(1995\)](#) sugerem que apenas 1-10% das espécies bacterianas do planeta tenham sido identificadas, deixando vasta porção dessa biota desconhecida e não estudada.

[Torsvik et al. \(1990\)](#) utilizaram técnicas moleculares para estudar populações bacterianas de solo sob uma floresta decídua. No estudo, os autores encontraram 4000 diferentes genomas, sendo uma estimativa 200 vezes maior do que a obtida de análises convencionais.

Pode-se dizer que, indiscutivelmente, o maior celeiro de genes no planeta reside na fração microbiana da biodiversidade. As limitações dos métodos tradicionais, aliadas ao avanço tecnológico na área de biologia molecular, fazem com que as técnicas moleculares sejam, no momento, muito utilizadas para o estudo da diversidade microbiana ([Elsas et al., 1998](#)). Estudar-se-á um conjunto dessas técnicas, destacadas por sua ampla utilização por vários pesquisadores.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os métodos moleculares receberam grande impulso com o desenvolvimento da técnica conhecida como PCR. Essa técnica descrita por [Saiki et al. \(1985\)](#), permite amplificar pequenos e específicos segmentos do genoma, permitindo a obtenção, *in vitro*, de várias cópias de determinada região do DNA. Como a reação de PCR é específica, pode-se obter a amplificação de seqüências de nucleotídeos-alvo mesmo em uma amostra com grande diversidade de seqüências, permitindo a detecção de organismos específicos em misturas heterogêneas. Seqüências do DNA de determinados microrganismos podem ser amplificadas, utilizando-se *primers* (seqüências iniciadoras) complementares àquelas localizadas em locais específicos do genoma. O que ocorre é a extensão do fragmento de DNA a partir dos *primers*, pela ação de uma DNA polimerase termoestável, a *Taq* DNA polimerase (isolada originalmente do microrganismo *Thermus aquaticus*). Antes da extensão, o DNA é desnaturado e o *primer* anelado, sendo o ciclo (desnaturação - anelamento - extensão) repetido várias vezes, permitindo a amplificação exponencial daquela seqüência específica ([Saiki et al., 1985](#)).

A detecção de organismos específicos em extratos de planta ou de solo pode ser determinada utilizando-se essa técnica. Nesse tipo de estudo, os *primers* específicos são usados em uma PCR com o DNA extraído dos extratos como molde. A detecção de determinado organismo é indicada pela formação de um produto de amplificação de tamanho definido. Para a confirmação da especificidade dessa amplificação, pode-se fazer uma hibridização ou o seqüenciamento do produto de PCR ([Kirchhof et al., 1997b](#)).

A sensibilidade e a especificidade da PCR pode ser aprimorada com um método conhecido por *nested PCR* em que as amplificações iniciais são realizadas com um par de *primers* sem grande especificidade: os universais por exemplo. Com o produto amplificado, uma segunda rodada de amplificações é conduzida, dessa vez com os *primers* específicos. Essa técnica foi utilizada, com sucesso, por [Rosado et al. \(1998\)](#), para aumentar a probabilidade de amplificação específica do DNA do *nifH* de *Paenibacillus azotofixans* com base em amostras de solo.

Grande parte das técnicas moleculares hoje utilizadas apropriam-se da PCR ou de suas variações para o estudo da diversidade de bactérias nos mais diferentes ambientes.

O Uso do RNA Ribossômico como Marcador Filogenético

Os ácidos ribonucléicos ribossomais (rRNA) são considerados os biopolímeros mais adequados para estudos de diversidade. Seus genes, os rDNAs, são universalmente distribuídos entre os diferentes grupos de seres vivos, sendo a molécula com o maior grau de conservação existente. Sua variabilidade pode apresentar-se em maior ou menor extensão em diferentes regiões da molécula ([Lane et al., 1985](#)). Uma das vantagens de se usar informações sobre as seqüências do rRNA é sua disponibilização em bases de dados (RDP, Gen-Bank, EMBL), na maioria dos casos, acessíveis, gratuitamente, permitindo a comparação de novas seqüências obtidas com as seqüências presentes nessas bases ([Coutinho et al., 1999](#)).

O 16S rRNA (± 1500 nucleotídeos) gera grande quantidade de informações úteis para inferências filogenéticas. Apesar de o 23S rRNA (± 3000 nucleotídeos) conter duas vezes mais informação e, portanto, gerar maior acurácia nas inferências filogenéticas, a molécula menor (16S rRNA), por causa

da maior facilidade de seqüenciamento, tornou-se referência. Porém, o 23S rRNA tem sido utilizado como suplemento para os dados gerados do 16S rRNA em estudos de organismos intimamente relacionados ([Stahl, 1997](#)).

As primeiras aplicações de técnicas baseadas em ácidos nucléicos no estudo de ecologia microbiana foram concernentes a relações filogenéticas entre microrganismos determinada pela análise da seqüência do 16S rDNA ([Macrae, 2000](#)). Atualmente, outras técnicas vêm sendo desenvolvidas, com base na utilização desses marcadores (ARDRA, Hibridização *in situ*), fazendo com que sejam as ferramentas moleculares mais utilizadas para a exploração da diversidade e da análise da estrutura de comunidades microbianas ([Kozdroj & Elsas, 2000](#)).

PCR-clonagem-seqüenciamento

A clonagem e seqüenciamento do gene do 16S rRNA é considerado o método mais poderoso para a exploração da diversidade microbiana em amostras naturais ([Muyzer, 1999](#)). Com a utilização da PCR, fragmentos do gene do 16S rRNA, presentes em amostras complexas, podem ser seletivamente amplificados. Uma biblioteca genômica derivada da amplificação dessas amostras é produzida pelo método de clonagem. Esses clones contêm fragmentos definidos que podem ser rapidamente seqüenciados. Outra rota para esse tipo de caracterização molecular é a clonagem e o seqüenciamento do cDNA transcrito a partir do 16S rRNA com utilização da enzima transcriptase reversa ([Amann et al., 1995](#)).

Provou-se que os microrganismos predominantemente isolados em meio de cultura com base em amostras ambientais, não correspondem àqueles mais freqüentemente identificados depois da PCR e seqüenciamento do gene do 16S rRNA (Giovannoni et al., 1990; Stackebrandt et al., 1993; citados por [Heuer & Smalla, 1997](#)). Pode-se concluir que os microrganismos, provenientes do isolamento por métodos tradicionais que utilizam meio de cultura, podem não representar os microrganismos que estão realmente presentes em maior número nessas amostras.

ARDRA - Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado

Esta técnica, um tipo de RFLP (ver neste documento), é baseada no grau de conservação dos sítios de restrição do rDNA que reflete padrões filogenéticos. A ARDRA é bastante útil para uma rápida análise da diversidade de um

ambiente ([Grifoni et al., 1995](#)). No entanto, recomenda-se cuidado na escolha do fragmento de rDNA a ser amplificado e analisado por esse método. No caso da análise de diversidade intra-específica ou entre grupos de isolados com elevada afinidade filogenética, o fragmento amplificado deve incluir o espaço intergênico 16S-23S rDNA. Essa região intergênica apresenta maior variabilidade tanto na sua composição de bases quanto no seu tamanho quando comparadas com a 16S ou 23S rDNAs. Quando o estudo em questão, tratar da diversidade entre isolados distantes, filogeneticamente, os fragmentos amplificados podem ser o 16S ou 23S rDNAs. Esses genes geram padrões de bandejamento mais simples, dependendo das enzimas de restrição utilizadas ([Rosado et al., 1999](#)).

[Laguerre et al. \(1996\)](#) promoveram, com a utilização da ARDRA (16S-23S rDNA), a caracterização de 43 estirpes de *Rhizobium leguminosarum* de diferentes biovars. A análise dos padrões de restrição da região intergênica 16S-23S rDNA amplificada permitiu a diferenciação das estirpes no nível intra-específico. Os autores afirmaram que por meio dos padrões de bandejamento facilmente analisáveis e reproduzíveis, gerados da restrição da região intergênica, foi possível discriminar as estirpes até o limite determinado pela elevada similaridade existente.

[Azevedo \(1998\)](#) analisou os perfis de restrição da região intergênica 16S-23S rDNA de 71 estirpes de *Azospirillum amazonense*. Pelos resultados, observa-se, no nível intra-específico, grande diversidade genética entre essas estirpes.

Outros Genes e Métodos Utilizados em Análises Filogenéticas

Gene *nifH*

É um dos genes que, em conjunto, codificam a formação da proteína *FeMo*, componente da enzima nitrogenase, responsável pelo processo de fixação biológica de nitrogênio. Esse gene apresenta seqüências extremamente conservadas, sendo considerado um dos genes funcionais existentes mais antigos ([Rosado et al., 1999](#)). As relações filogenéticas entre bactérias, baseadas em divergências na seqüência do *nifH*, apresentam-se de maneira semelhante ao que ocorre com o 16S rDNA. A vantagem da utilização desse gene para o estudo de populações microbianas no ambiente é que, neste caso, trata-se de um gene funcional, permitindo uma correlação entre a estrutura e a função da comunidade microbiana ([Rosado et al., 1999](#)). Sua utilização permite

também o estudo específico de bactérias diazotróficas, possibilitando o conhecimento sobre a diversidade desse grupo especial de microrganismos associados a diferentes ambientes.

Gene *gyrB*

Este gene que codifica uma topoisomerase tipo II (enzima que participa da helicoidização do DNA), apresenta grande potencial para inferir a filogenia de microrganismos ([Paitan et al., 1998](#)). Desde 1995, quando *primers* universais para esse gene tornaram-se disponíveis, em várias publicações, têm-se sugerido sua utilização ([Watanabe et al., 2001](#)). Esse gene apresenta pré-requisitos importantes como limitada transferência horizontal e presença em todos os grupos de bactérias ([Watanabe et al., 2001](#)). Para a diferenciação de algumas espécies, variações muito pequenas entre os rRNAs 16S e 23S parecem não ser suficientes para permitir o desenho de sondas espécie-específicas ([Yamada et al., 1999](#)). [Yamamoto et al. \(1999\)](#) afirmam, ainda, que a resolução da análise de seqüências do gene do 16S rRNA, algumas vezes, é insuficiente para a distinção de espécies com genoma intimamente relacionados, isto se deve à lenta razão de substituição de bases no 16S rRNA. Ademais, análises filogenéticas, baseadas em genes que codificam a formação de proteínas, proporcionam maior grau de resolução, pois esses genes evoluem mais rapidamente.

[Kasai et al. \(2000\)](#) assumiram que os resultados de seqüenciamento do 16S rRNA não são suficientemente divergentes para a distinção do gênero *Micromonospora* no nível de espécie. Trabalhando com o *gyrB* esses autores concluíram que as estruturas filogenéticas deduzidas de seqüências desse gene eram consistentes com os resultados de estudos com hibridização DNA-DNA. Utilizando uma combinação de PCR para o gene *gyrB* com a técnica de RFLP, [Niemann et al. \(2000\)](#) encontraram um meio rápido e fácil de discriminação entre *Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum* tipo II, *M. africanum* tipo I, *M. microti*, *M. bovis* e subtipos de *M. bovis*. Os autores concluíram, ainda, que o polimorfismo apresentado pelo gene *gyrB* representa o único marcador que facilita a diferenciação de *Mycobacterium* por seqüenciamento de DNA ou por uma simples análise de PCR-RFLP.

Apesar do crescente número de trabalhos que vêm utilizando o gene *gyrB* em estudos de análise filogenética e da existência de um banco de dados com seqüências de ácidos nucléicos e aminoácidos de aproximadamente mil estirpes

diferentes ([Watanabe et al., 2001](#)), ainda não existem relatos da sua aplicação em amostras de solo ou rizosfera ([Rosado et al., 1999](#)).

Além do *nifH* e do *gyrB*, outros genes têm sido propostos para serem utilizados como marcadores filogenéticos, principalmente, para o estudo de determinados grupos específicos de organismos. [Mcdonald & Murrel \(1997\)](#), por exemplo, propuseram o uso do gene da metano monoxigenase (*pmoA*) como marcador genético para identificação de metanotrofos do tipo II em amostras ambientais.

RFLP - Polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição

Esta metodologia é baseada na digestão do DNA ou de seqüências específicas desse DNA por enzimas de restrição, seguida por separação eletroforética em gel dos fragmentos resultantes. As enzimas de restrição, também chamadas endonucleases de restrição, reconhecem seqüências específicas de bases na dupla hélice do DNA e clivam ambos os fragmentos duplex em pontos específicos ([Stryer, 1996](#)). O RFLP é baseado em padrões de restrição com o uso de enzimas selecionadas com base na sua habilidade de revelar polimorfismo nos fragmentos de DNA analisados.

Quando são feitos estudos de RFLP com o DNA bacteriano total, gera-se uma enorme quantidade de fragmentos. Portanto, as diferenças nos tamanhos dos fragmentos não podem ser visualizadas diretamente no gel, posto que os inumeráveis fragmentos resultantes do tratamento com a enzima de restrição produzem, nesse gel, um efeito de arraste contínuo. Para se fazer a detecção dos marcadores RFLP, os fragmentos do gel são transferidos para uma membrana de nylon (ou nitrocelulose) por um processo denominado *Southern Blot*. Por fim, a visualização de fragmentos polimórficos é possível por meio da hibridização contra sondas de DNA que apresentam seqüências homólogas às do DNA imobilizado na membrana ([Ferreira & Grattapaglia, 1998](#)).

[Gündish et al. \(1993\)](#) analisaram os resultados de RFLP obtidos depois da digestão do DNA total de estirpes de *Azospirillum* por enzimas de corte raro. Esses autores utilizaram uma técnica especial de eletroforese, conhecida como Eletroforese de Gel com Campo Pulsátil (PFGE). Devido a mudanças periódicas no campo elétrico, essa técnica permite separar fragmentos de alto peso molecular, resultando em um padrão de restrição bastante claro do genoma bacteriano.

[Laguerre et al. \(2001\)](#) utilizaram essa metodologia para avaliar a diversidade de estirpes de rizóbio. As análises de RFLP dos genes simbióticos *nodC* e *nifH* mostraram, de maneira geral, sua correlação com o espectro hospedeiro e independência do status taxonômico, já que os resultados não foram concordantes com aqueles baseados nas seqüências do 16S rDNA. Segundo os autores, esses resultados suportam a tese de que a transferência lateral entre espécies de rizóbio desempenha importante papel na diversidade e na estrutura de suas populações naturais.

T-RFLP - Polimorfismo do tamanho e composição de bases de fragmentos terminais de restrição

O T-RFLP é tido como um método molecular quantitativo para análises rápidas de comunidades microbianas complexas ([Liu et al., 1997](#)). Nessa técnica, os passos iniciais de extração do DNA, amplificação por PCR e restrição assemelham-se aos utilizados na técnica de ARDRA. No entanto, um dos *primers* utilizados é marcado com um fluorocromo. Com o uso de um seqüenciador automático de DNA, o tamanho dos fragmentos terminais de restrição (T-RF) pode ser determinado, e a sua quantidade, estimada.

Com base na localização terminal do marcador fluorescente nos produtos de PCR, pode-se garantir que apenas os fragmentos terminais sejam medidos. A riqueza de espécies de comunidades microbianas é estimada pela determinação do número de fragmentos terminais, observados com a digestão dos rDNAs totais das comunidades amplificadas por PCR. O padrão de T-RFLP percebido (atuando como impressão digital das comunidades) é um conjunto do número de fragmentos com tamanho único e a abundância relativa de cada fragmento é refletida pelo tamanho de cada pico no eletroferograma. As amostras são corridas em gel de poliacrilamida em um seqüenciador. Cada banda fluorescente corresponderá a uma única população, e a intensidade de cada banda será diretamente proporcional à quantidade do produto de PCR, dando uma indicação aproximada da abundância da população na comunidade.

Essa metodologia foi útil na estimativa da diversidade filogenética e estudo da composição de comunidades em vários ambientes, atuando como um meio para determinação do número e abundância de ribotipos numericamente dominantes dentro de uma comunidade. [Gardener & Weller \(2001\)](#) utilizaram o método de T-RFLP para observar mudanças nas populações de bactérias da rizosfera em função da ocorrência do mal-do-pé em trigo (*Gaeumannomyces graminis* var.

tritic), uma podridão-de-raízes. O propósito desse estudo foi o de acessar mudanças na comunidade bacteriana rizosférica que ocorrem quando as raízes de trigo vão do estado saudável ao doente. As comparações dos padrões de T-RFLP entre plantas doentes e saudáveis revelaram diferenças em vários sinais fluorescentes. Na rizosfera das plantas de trigo, infectadas pelo patógeno, observaram-se maiores populações de várias espécies bacterianas. Os autores concluíram que essas populações, observadas na região da rizosfera de plantas de trigo doentes, poderiam ser explicadas pela maior exsudação de substratos a partir dos tecidos infectados.

AFLP - Polimorfismo de tamanho do fragmento amplificado

Esta técnica, assim como a ARDRA, é uma combinação da PCR com o RFLP, com base na análise do padrão de restrição (RFLP) e posterior amplificação via PCR de fragmentos de DNA selecionados do total de fragmentos obtidos da restrição. A restrição é conduzida utilizando-se duas enzimas que produzem fragmentos de DNA com terminações diferentes. A essas terminações de seqüência conhecidas, são acoplados oligonucleotídeos curtos (adaptadores) que servirão de molde para o PCR. A amplificação seletiva é conduzida pelo uso de dois *primers* (seqüências iniciadoras) complementares aos adaptadores, acrescidos de algumas bases complementares a terminações de restrição. [Janssen et al. \(1996\)](#) comprovaram a aplicabilidade da técnica de AFLP como ferramenta taxonômica, estudando 147 estirpes distribuídas nos gêneros *Xanthomonas*, *Aeromonas*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, entre outros.

RAPD - DNA polimórfico amplificado ao acaso

O RAPD requer pequenas quantidades de DNA e é capaz de revelar alto grau de marcas polimórficas, sendo um método rápido e passível de automatização ([Fungaro & Vieira, 1998](#)). Esse método, considerado mais simples e mais barato do que o RFLP ([Oliveira et al., 2000](#)), baseia-se na amplificação de fragmentos não específicos de DNA. São utilizados *primers* com seqüências arbitrárias de nucleotídeos que geram produtos de amplificação via PCR os quais são analisados. O fato de as seqüências *primers* serem geradas arbitrariamente permite a observação de perfis de RAPDs com vários produtos de amplificação, decorrentes da existência de vários sítios homólogos a esses *primers* espalhados no genoma ([Fungaro & Vieira, 1998](#)). Fenótipos moleculares, gerados de RAPD, podem servir para diagnosticar diferentes níveis taxonômicos, podendo apresentar poder de discriminação até níveis intra-específicos.

[Di Cello et al. \(1997\)](#) utilizaram a metodologia de RAPD para estudar mudanças na estrutura de populações de *Burkholderia cepacia* ao longo do crescimento de plantas de milho. Os autores mostraram o alto grau de polimorfismo, ou seja, diversidade genética, entre os isolados. Nos estádios iniciais de crescimento das plantas, a diversidade apresentada foi maior em comparação aos últimos estádios no final da maturação. Os autores explicaram que uma possível razão para esse fato seja a maior instabilidade de um ecossistema com plantas jovens em comparação àquele onde as plantas já estão desenvolvidas.

REP, ERIC e BOX

Estas metodologias são variações da PCR em que se utilizam *primers* complementares a seqüências de DNA de ocorrência natural altamente conservada e repetitivas, presentes em múltiplas cópias nos genomas da maioria das bactérias. Três famílias de seqüências repetitivas foram identificadas, incluindo a REP de 35-40 pb, ERIC de 124-127 pb e, finalmente, o elemento BOX de 154 pb. O uso de *primers*, desenhados para essas regiões, leva à amplificação seletiva de regiões distintas no genoma. Os *primers* BOX são geralmente recomendados por gerar impressões digitais mais robustas e produzir um padrão de fragmentos mais complexo. Os *primers* para REP geram menor complexidade, mas ainda produzem impressões digitais reproduzíveis e que permitem a diferenciação dos isolados. O conjunto de *primers* para o ERIC é mais sensível a condições subótimas da PCR, como presença de contaminantes na amostra de DNA, porém gera padrões de bandejamento altamente discriminatórios ([Rademaker & De Bruijn, 1996](#)).

A Utilização de Sondas para Estudo da Diversidade Microbiana

O uso de sondas moleculares é um método versátil que permite não só o estudo de organismos isolados e cultivados como também o desses organismos em amostras ambientais.

Uma sonda consiste em fragmento marcado de DNA ou RNA complementar à seqüência de um gene-alvo de interesse. Em condições controladas, ocorre a hibridização entre a sonda e sua seqüência-alvo. A detecção da seqüência do gene-alvo depende da natureza do sistema de marcação da sonda que pode apresentar nucleotídeos marcados radioativamente (ex.: ^{32}P) ou não (ex.: enzimas, moléculas

fluorescentes) ([Coutinho et al., 1999](#)). Sondas de ácidos nucleicos podem ser construídas para detecção de genes específicos e então serem usadas para detecção de organismos com o genoma correspondente. A combinação da PCR, com a utilização de sondas, aumenta significativamente a sensibilidade dos protocolos de detecção ([Rosado et al., 1999](#)).

Testes de hibridização, em fase sólida ou colônias, usando-se sondas de oligonucleotídeos específicos, mostraram-se metodologias rápidas para a validação e a confirmação de resultados morfológicos e fisiológicos em estudos de identificação taxonômica de isolados ([Kirchhof et al., 1997a](#)). Um exemplo do uso de sondas oligonucleotídicas é dado por [Kirchhof et al. \(1997b\)](#) num trabalho de identificação de bactérias endofíticas, isoladas de *Pennisetum purpureum*, *Miscanthus sinensis*, *M. sacchariflorus* e *Spartina pectinata*. Vários isolados foram identificados como *Azospirillum lipoferum* e *Herbaspirillum seropedicae*. Outros, entretanto, foram identificados como pertencentes ao gênero *Herbaspirillum*, possivelmente representando nova espécie.

[Amann et al. \(1990\)](#) sofisticaram o uso de sondas ribossômicas, conjugando marcadores fluorescentes com oligonucleotídeos. As sondas foram utilizadas em experimentos de hibridização in situ que consistem na imobilização e na permeabilização das células diretamente nas amostras ambientais. Depois da hibridização, os oligonucleotídeos marcados são detectados através de microscopia de fluorescência, revelando os microrganismos-alvo. A combinação dessa técnica com o poder de resolução do microscópio confocal de varredura a laser trouxe grande contribuição para o estudo das comunidades microbianas em seus ambientes naturais. Um ótimo exemplo de utilização dessa técnica é o trabalho conduzido por [Aßmus et al. \(1995\)](#), em que se estudou a colonização da rizosfera de plântulas de trigo por estirpes de *Azospirillum brasilense*. Nesse trabalho, mostrou-se que a estirpe Sp245 foi detectada repetidas vezes no interior dos pêlos radiculares, enquanto as estirpes Sp7 e Wa3 puderam colonizar apenas o rizoplano.

Microarray ou Microchips de DNA

A tecnologia de microchips de DNA representa o último avanço dos métodos moleculares, com grande potencial para a elucidação de uma gama de aspectos da ecologia microbiana dos solos, incluindo identificação de variações na estrutura de comunidades entre diferentes amostras ([Ogram, 2000](#)), identificação

de grupos filogenéticos que podem estar ativos ou sem atividade durante determinado período ou sob determinado tratamento ([Guschin et al., 1997](#)) e identificação de diferenças entre estirpes isoladas de diferentes ambientes ([Murray et al., 1999](#)).

Nessa metodologia, os microchips são preparados com sondas de oligonucleotídeos imobilizadas em uma matriz de gel de poliacrilamida ligada à superfície de uma placa de vidro ([Yershov et al., 1996](#)). Os oligonucleotídeos sintetizados para serem utilizados nos microchips devem ser purificados por eletroforese em gel ou por cromatografia líquida de alta performance. Essa exigência aumenta o controle sobre a qualidade da estrigência, assegurando grande especificidade. As amostras de DNA ou RNA são marcadas com fluorocromos ou outros compostos que permitem sua quantificação. Centenas ou mesmo milhares de oligonucleotídeos diferentes podem ser imobilizados em um único microchip, permitindo a detecção simultânea de grande variedade de microrganismos em uma amostra. Além disso, um microchip pode ser utilizado por até 30 vezes, sem deterioração do sinal de hibridização, bastando ser lavado com água destilada ([Guschin et al., 1997](#)).

[Small et al. \(2001\)](#) utilizaram o método de *microarray* para detecção do 16S rRNA intacto extraído de amostras de solo. RNAs totais de *Geobacter chapellei* e *Desulfovibrio desulfuricans* (redutores de ferro e sulfato, respectivamente) foram detectados com sua hibridização com sondas universais e espécie-específicas. Com base nos resultados desse trabalho, também, mostrou-se a possibilidade de aplicação da técnica de *microarray* na detecção direta de microrganismos em amostras ambientais sem a necessidade de utilização da PCR.

DGGE - Eletroforese em gel de gradiente desnaturante

TGGE - Eletroforese em gel de gradiente de temperatura

Estas técnicas, introduzidas por [Muyzer et al. \(1993\)](#), permitem analisar produtos de PCR de acordo com suas seqüências de pares de bases e não com diferenças no tamanho dos produtos. Dessa maneira, permitem a determinação da diversidade genética de comunidades microbianas naturais e também a identificação filogenética dos membros das comunidades ([Rosado et al., 1999](#)).

A DGGE utiliza géis de poliacrilamida contendo um gradiente linear de desnaturantes (uréia e formamida). Moléculas de DNA com o mesmo tamanho, mas com seqüência diferente de nucleotídeos, apresentam comportamento eletroforético diferente quando expostas ao gradiente de agentes desnaturantes. A seqüência de nucleotídeos de um fragmento de DNA definirá a posição no gradiente em que o DNA de fita dupla irá desnaturar-se passando a fita simples, interrompendo sua migração no gel. Uma vez que moléculas de DNA, com seqüências diferentes, apresentam taxas de migração diferentes em géis desnaturantes, essa metodologia é uma poderosa ferramenta para estudos ecológicos com microrganismos. Uma variação dessa técnica, conhecida como TGGE, utiliza um gradiente térmico com concentração constante de uréia e formamida. A identificação dos membros das comunidades microbianas pode ser dada pelo seqüenciamento das bandas excisadas ou por hibridização com sondas específicas ([Muyzer, 1999](#)).

Em princípio, DGGE e TGGE podem ser utilizadas para análise de qualquer grupo de genes amplificados por PCR. No entanto, para estudos sobre a diversidade estrutural de comunidades microbianas, o gene 16S rRNA é especialmente útil por apresentar as características já citadas anteriormente, como alto grau de conservação e presença de regiões variáveis entre as espécies ([Heuer & Smalla, 1997](#)). Porém, se o objetivo do estudo é acompanhar a dinâmica populacional de grupos específicos de microrganismos, o desenho e a aplicação de *primers* que permitam a amplificação de fragmentos particulares do gene do 16S rRNA ou outros genes relacionados especificamente a esses microrganismos parece ser o método mais promissor ([Heuer & Smalla, 1997](#)). Um exemplo é o estudo feito por [Lovell et al. \(2000\)](#) que utilizou a DGGE depois da amplificação do gene *nifH* em suas amostras para examinar a complexidade e a estabilidade de organismos diazotróficos na rizosfera de *Spartina*. Esses autores concluíram que a comunidade diazotrófica presente era bastante diversa e aparentemente constituída por organismos desconhecidos.

Hoje as técnicas de DGGE e TGGE estão bem estabelecidas como ferramentas moleculares para estudos de microbiologia ambiental, permitindo o estudo da complexidade e do comportamento das comunidades microbianas em grande número de amostras, de maneira rápida, relativamente barata e reproduzível ([Muyzer, 1999](#)).

SSCP - Polimorfismo conformacional da fita simples

Esta técnica, à semelhança da DGGE, é baseada na diferenciação da conformação que uma fita simples de DNA assume, dependendo de sua seqüência de nucleotídeos. Essa diferença conformacional, quando a molécula é submetida a uma corrida eletroforética, resulta em taxas de migração diferentes para fragmentos de DNA do mesmo tamanho, porém com diferentes conformações secundárias. O método foi originalmente desenvolvido para detecção de mutações no genoma humano por [Orita et al. \(1989\)](#), gerando fitas simples de DNA por meio de uma desnaturação realizada antes de aplicar as amostras de DNA no gel. No entanto, a desnaturação do DNA não costuma perdurar por toda a corrida e, por esta razão, [Schwieger & Tebbe \(1998\)](#), visando à otimização da análise, acrescentaram uma etapa de digestão de uma das hélices proveniente de amplificação com *primer* fosforilado no terminal 5'. Dessa forma, adiciona-se ao gel um DNA de fita simples que toma diferentes conformações de acordo com sua seqüência de bases nucleotídicas.

Essa técnica, aplicação mais recente que a DGGE em estudos de microrganismos em amostras ambientais, tem ganhado destaque rapidamente ([Schwieger & Tebbe, 1998](#); [Peters et al., 2000](#); [Schwieger & Tebbe 2000](#)). [Peters et al. \(2000\)](#) utilizaram o SSCP para monitorar a diversidade de bactérias, actinomicetos e fungos em sucessões de comunidades durante diferentes estádios de uma compostagem orgânica, utilizando três diferentes pares de *primers* específicos para regiões hipervariáveis do rDNA 18S (fungos) e rDNA 16S (bactérias e actinomicetos). Os autores concluíram que houve sucessão e incremento na diversidade de microrganismos ao longo do período de compostagem.

[Schwieger & Tebbe \(2000\)](#), usando o método de SSCP, analisaram os perfis genéticos do gene rRNA 16S e detectaram a especificidade das comunidades da rizosfera com diferentes plantas, demonstrando o potencial da técnica para o monitoramento de *Sinorhizobium melloti* (L33) utilizado como inoculante em *Medicago sativa* e *Chenopodium album*. [Simon et al. \(1993\)](#), usando *primers* específicos para determinados táxons, conseguiram discriminar fungos micorrízicos arbusculares e examinaram a especificidade do hospedeiro pela técnica de SSCP.

Limitações Metodológicas

Os primeiros requisitos da maioria dos métodos moleculares utilizados nos estudos de ecologia microbiana, e os primeiros obstáculos a serem superados são a extração e a purificação dos ácidos nucléicos. A eficiência na lise das células, a purificação e o tamanho dos ácidos nucléicos isolados são cruciais para o sucesso na aplicação desses métodos ([Ogram, 2000](#)). A composição do DNA isolado é dependente da eficiência da lise celular, sabendo-se que essa lise é mais difícil em certos grupos bacterianos ([More et al., 1994](#)). Os métodos baseados nas reações de PCR dependem da pureza das amostras uma vez que a PCR é inibida por contaminantes como os ácidos húmicos ([Tebbe & Vahjen, 1993](#)). O tamanho do DNA extraído também influencia a PCR, já que o isolamento de pequenos fragmentos pode aumentar a frequência na formação de artefatos nessas reações ([Zhou et al., 1996](#)).

À medida que a eficiência das técnicas moleculares possibilita análises comparativas de comunidades microbianas, considerável atenção deve ser dada à padronização dos parâmetros ligados ao processamento das amostras, pois qualquer diferença detectada entre os padrões dessas comunidades é atribuída a diferenças na estrutura gênica das comunidades e não a diferenças na preparação das amostras ([Marsh et al., 2000](#)). Os solos são altamente variáveis em relação a suas características físicas e químicas, por isso, um procedimento que separe eficientemente os compostos húmicos de uma amostra de solo pode não ser eficiente quando utilizado em uma amostra distinta. A divergência entre os técnicos responsáveis pela extração e purificação do DNA do solo também é considerada uma fonte de variabilidade do DNA recuperado entre diversos laboratórios, estimulada pelo desenvolvimento de novos e variados protocolos por laboratórios isolados ([Ogram, 2000](#)). Um único método para extração e purificação do DNA oriundo dos mais variados matizes ambientais seria de grande proveito para o avanço da utilização generalizada das ferramentas de biologia molecular ([Ogram, 2000](#)).

As ferramentas moleculares aqui apresentadas, na maioria das vezes, não são apropriadas para resgatar a riqueza ou a abundância total das espécies bacterianas presentes em determinado ambiente, o que se deve à natureza altamente complexa da maioria das comunidades ([Ogram, 2000](#)). Apesar disso, poucos estudos têm-se referido a metodologias que combinam métodos tradicionais e métodos moleculares para avaliações de diversidade microbiana

(Dunbar et al., 1999). Estudos comparativos como este podem ser necessários, pois as metodologias ainda apresentam, individualmente, limitações que podem distorcer as informações sobre a composição, a riqueza e a estrutura das comunidades (Bull et al., 2000). Na verdade, os métodos moleculares não representam uma panacéia para as dificuldades encontradas nos estudos de ecologia microbiana (e nunca foram apresentados como tal), assim sendo, uma análise polifásica pode ser requerida para uma descrição mais fiel da ecologia microbiana dos solos, incorporando resultados de análises de várias metodologias (utilização de meios de cultura, BIOLOG, métodos imunológicos etc.) com os resultados obtidos com ferramentas moleculares.

Outro fator importante que deve ser discutido é que apesar de as ferramentas moleculares fornecerem nova perspectiva para as avaliações da diversidade microbiana dos solos, elas não possibilitam que organismos, com potencial valor biotecnológico, sejam cultivados e trabalhados, mostrando a necessidade de se desenvolver técnicas de cultivo que permitam o estudo e a utilização desses organismos para propósitos biotecnológicos

Referências Bibliográficas

AßMUS, B.; HUTZLER, P.; KIRCHHOF, G.; AMANN, R.; LAWRENCE, J. R.; HARTMANN, A. *In situ* localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 61, p. 1013-1019, 1995.

AMANN, R. I.; KRUMHOLZ, L.; STAHL, D. A. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 172, p. 762-770, 1990.

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

AZEVEDO, M. S. **Influência do solo e da planta hospedeira sobre a diversidade gênica de isolados de *Azospirillum amazonense* associados às raízes de arroz, milho e sorgo**. 1998. 110 f. Tese (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998.

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

COPLEY, J. Ecology goes underground. **Nature**, London, v. 406, p. 452-454, 2000.

COUTINHO, H. L. C.; OLIVEIRA, V. M.; MANFIO, G. P.; ROSADO, A. S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: Methodological innovations. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 71, p. 491-503, 1999.

DI CELLO, F.; BEVININO, A.; CHIARINI, L.; FANI, R.; PAFFETTI, D. TABACCHIONI, S.; DALMASTRI, C. Biodiversity of a Burkholderia cepacia population isolated from maize rhizosphere at different plant growth stages. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, p. 4485-4493, 1997

DUNBAR, J.; TAKALA, S. M.; BARNES, S. M.; DAVIS, J. A.; KUSKE, C. R. Levels of community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 65, p. 1662-1669, 1999.

ELSAS, J. D. van; DUARTE, G. F.; ROSADO, A. S.; SMALLA, K. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. **Journal of Microbiological Methods**, Washington, DC, v. 32, p. 133-154, 1998.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Aplicações da PCR em ecologia molecular. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 205-228.

GARDENER, B. B. M.; WELLER, D. M. Changes in populations of rhizosphere bacteria associated with take-all disease of wheat. **Applied of Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 67, p. 4414-4425, 2001.

GRIFONI, A; BAZZICALUPO, M.; DI SERI, C.; FANCELLI, S.; FANI, R. Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA and of the histidine operon. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 127, p. 85-91, 1995.

GÜNDISH, C.; KIRCHHOF, G.; BAUR, M.; BODE, W.; HARTMANN, A. Identification of *Azospirillum* species by RFLP and pulsed-field gel electrophoresis. **Microbe Releases**, Swindon, UK, v. 2, p. 41-45, 1993

GUSCHIN, D. Y.; MOBARRY, B. K.; PROUDINIKOV, D.; STAHL, D. A.; RITTMANN, B.; IZARBEKOV, A. D. Oligonucleotide microchips as genosensors for determinative and environmental studies in microbiology. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, p. 2397-2402, 1997.

HERBERT, R. A. Methods for enumerating microorganisms and determining biomass in natural environments. In: NORRIS, J.R. & GRIGOROVA, R. (Ed.). **Methods in Microbiology: Techniques in Microbial Ecology**. San Diego, CA: Academic Press, Inc., 1990, p. 1-40.

HEUER, H.; SMALLA, K. Application of denaturing gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. In: ELSAS, J. D. van; WELLINGTON, E. M. H.; TREVORS, J. T.; DEKKER, M. (Ed.). **Modern soil microbiology**. New York: Marcel Dekker Publisher, 1997. p. 353-373.

JANSSEN, P.; COOPMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J.; BLEEKER, M.; VOS, P.; ZABEU, M.; KERTERS, K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. **Microbiology**, Reading, v. 142, p. 1881-1893, 1996.

KASAI, H.; TAMURA, T.; HARAYAMA, S. Intrageneric relationships among *Micromonospora* species deduced from *gyrB*-based phylogeny and DNA relatedness. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, DC, v. 50, p. 127-134, 2000.

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

KIRCHHOF, G.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; ECKERT, B.; DÖBEREINER, J.; HARTMANN, A. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. **Plant & Soil**, The Hague, v. 194, p. 44-55, 1997a.

KIRCHHOF, G.; SCHLOTTER, M.; AbMUS, B.; HARTMANN, A. Molecular microbial approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 853-862, 1997b.

KOZDRÓJ, J.; ELSAS, J.D. van. Response of the bacterial community to root exudates in soli polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 32, p. 1405-1417, 2000.

LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P.; ALLARD, M.; CHARNAY, M.; LOUVRIER, P.; MAZURIER, S.; RIGOTTIER-GOIS, L.; AMARGER, N. Typing of rhizobia by PCR DNA finferprinting and PCR-restriction fragment lenght polymorphism analysis of chromossomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 62, p. 2029-2036, 1996.

LAGUERRE, G.; NOUR, S. M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROUIN, P.; AMARGER, N. Classification of rhizobia based *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. **Microbiology**, Reading, v. 174, p. 981-993, 2001.

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

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

LOVELL, C. H.; PICENO, Y. M.; QUATTRO, J. M.; BAGWELL, C. E. Molecular analysis of diazotrophic diversity in the rizosphere of the smooth cordgrass, *Spartina alterniflora*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 66, p. 3814-3822, 2000.

MACRAE, A. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, p. 77-82, 2000.

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

McDONALD, I. R.; MURREL, J. C. The particulate methane monooxygenase gene *pmoA* and its use as a functional gene probe for methanotrophs. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.15, p. 205-210, 1997.

MORE, M. I.; HERRICK, J. B.; SILVA, M. C.; GHIORSE, W. C.; MADSEN, E. L. Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 60, p. 1572-1580, 1994.

MURRAY, A. E.; LI, G. S.; LIES, D.; NEALSON, K. H.; ZHOU, J. Z.; TIEDJE, J. M. Applications of DNA microarray technology to investigating gene expression in *Shewanella oneidensis* MR-1 and functional diversity among related species. In: CONFERENCE OF SMALL GENOMES, 7., 1999, Arlington, Virginia, USA, **Abstracts...** Abstract 38.

MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 2, p. 317-322, 1999.

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

NIEMANN, S.; HARMSSEN, D.; RÜSCH-GERDES, S.; RICHTER, E. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 38, p. 3231-3234, 2000.

OGRAM, A. Soil molecular microbial ecology at age 20: methodological challenges for the future. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 32, p. 1499-1504, 2000.

OLIVEIRA, I. A.; VASCONCELLOS, M. J.; SELDIN, L.; PAIVA, E.; VARGAS, M. A.; SÁ, N. M. H. Random amplified polymorphic DNA analysis of effective *Rhizobium* sp. associated with beans cultivated in Brazilian cerrado soils. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, p. 39-44, 2000.

ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K.; SEKIYA, T. Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 86, p. 2766-2770, 1989.

PAITAN, Y.; BOULTON, N.; RON, E. Z.; ROSENBERG, E.; ORR, E. Molecular analysis of the *gyrB* gene from *Myxococcus xanthus*. **Microbiology**, Reading, v. 144, p. 1641-1647, 1998.

PETERS, S.; KOSCHINSKY, S.; SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. C. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 930-936, 2000.

RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUJN, F. J. Characterization and classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: CAETANO-ANOLLES, G.; GRESSHOFF, P. M. (Ed.). **DNA markers: protocols, applications and overviews**. New York: Wiley, J. & Sons, Inc., 1996. p. 1-26.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. A moderna microbiologia do solo: Aplicação de técnicas de biologia molecular. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FRUTINI-NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DCS, 1999. p. 429-448.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F.; SELDIN, L.; ELSAS, J. D. van. Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analysed by denaturin gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 64, p. 2770-2779, 1998.

SAIKI, R. K.; SCARF, F.; FALOONA, F. A.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, DC, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SCHLOTTER, M.; LEBUHN, M.; HEULIN, T.; HARTMANN, A. Ecology and evolution of bacterial microdiversity. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, p. 647-660, 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, DC, v. 64, p. 4870-4876, 1998.

SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. C. Effect of field inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 on the composition of bacterial communities rhizospheres of a target plant (*Chenopodium album*)-linking of 16S rRNA gene-based single-strand

conformation polymorphism community profiles to the diversity of cultivated bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 66, p. 3556-3565, 2000.

SIMON, L.; LÉVESQUE, R. C.; LALONDE, M. Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single-strand conformation polymorphism-polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 59, p. 4211-4215, 1993.

SMALL, J.; CALL, D. R.; BROCKMAN, F. J.; STRAUB, T. M.; CHANDLER, D. P. Direct detection of 16S rRNA in soil extracts by using oligonucleotide microarrays. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 67, p. 4708-4716, 2001.

STAHL, D. A. Molecular approaches for the measurement of density, diversity, and phylogeny. In: HURST, C. J.; KNUDSEN, G. R.; McINERNEY, M. J.; STETZENBACH, L. D.; WATER, M. W. **Manual of environmental microbiology**. Washington: ASM Press, 1997. p 102-114.

STRYER, L. Explorando os genes. In: **Bioquímica (Quarta Edição)**. New York, FREEMAN, W.H. & Company, 1996.

TEBBE, C. C.; VAHJEN, W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 59, p. 2657-2665, 1993.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAEE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 56, p. 782-787, 1990.

TURCO, R. F.; KENNEDY, A. C.; JAWSON, M. D. Microbial indicators of soil quality. In: DORAN, J. W.; COLEMAN, D. C.; BEZDICEK, D. F.; STEWART, B. A. (Ed.). **Defining soil quality for a sustainable environment**. Madison, Soil Science Society of America, 1994, p. 73-90.

WATANABE, K.; NELSON, J. S.; SHIGEAKI, H.; KASAI, H. ICB database: the *gyrB* database for identification and classification of bacteria. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, p. 344-345, 2001.

YAMADA, S.; OHASHI, E.; AGATA, N.; VENKATESWARAN, K. Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in

rice. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 65, p. 1483-1490, 1999.

YAMAMOTO, S.; BOUVET, P. J. M.; HARAYAMA, S. Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, DC, v. 49, p. 87-95, 1999.

YERSHOV, G.; BARSKY, V.; BELGOVSKIY, A.; KIRILLOV, E.; KREIDILIN, E.; IVANOV, I.; PARINOV, S.; GUSCHIN, D.; DROBISHEV, A.; DUBILEY, S.; MIRZABEKOV, A. DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microships. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 93, p. 4913-4918, 1996.

YIN, B.; CROWLEY, D.; SPSROVEK, G.; MELO, W.J. de; BORNEMAN, J. Bacterial functional redundancy along a soil reclamation gradient. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 66, p. 4361-4365, 2000.

ZAK, J. C.; WILLIG, M. R.; MOORHEAD, D. L.; WILDMAN, H. G. Functional diversity of bacterial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 26, p. 1101-1108, 1994.

ZHOU, J.; BRUNS, M. A.; TIEDJE, J. M. DNA recovery from soils of diverse composition. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 62, p. 316-322, 1996.

Use of Molecular Tools in Diversity Studies of Soil Micro-organisms

Abstract - *In spite of its importance, the soil still one of the least studied habitats of the planet and only recently we began to understand that its biodiversity is a crucial factor for the regulation and operation of the ecosystems. Traditionally, the detection and identification of bacteria were made observing their principal means of obtaining carbon and energy, their nutritional demands and cultivation media for growth, besides direct observation in the microscope. However, the use of these methodologies provided limited information with need of larger refinement.*

The traditional techniques of detection and identification of micro-organisms show even more limitations when we want to study all the diversity of micro-organisms associated to a certain environment. It is known that the diversity of bacteria is larger than the diversity of any other group of organisms, however, the cultivation media are, in larger or smaller extension, selective to particular groups. Estimates point that only 10% of the planet's bacterial species have been identified, leaving a vast portion of this biota ignored and not studied.