



# ESTRUTURA DAS COMUNIDADES BACTERIANAS EM SOLO SOB CERRADO NATIVO E ÁREAS SOB CULTIVO ORGÂNICO E CONVENCIONAL

J. Q. Gonçalves<sup>1\*</sup>; J. D. Bresolin<sup>2</sup>; F. Schlemmer<sup>3</sup>; S.R. Passos<sup>4</sup>; I. C. Mendes<sup>5</sup>; G. R. Xavier<sup>6</sup> & F. B.

Reis Junior<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Estudante de Biologia da UnB, <sup>2</sup>Bolsista CNPq/Embrapa Cerrados, <sup>3</sup>Estudante de Pós-Graduação em Gestão e Manejo Ambiental em Sistemas Agrícolas (UFLA) - Bolsista Embrapa Cerrados, <sup>4</sup>Bolsista de Iniciação Científica da Embrapa Agrobiologia, <sup>5</sup>Pesquisador Embrapa Cerrados, <sup>6</sup>Pesquisador Embrapa Agrobiologia, \*Bolsista de graduação PIBIC CNPq/Embrapa Cerrados - janaquixa@yahoo.com.br

## INTRODUÇÃO

A biodiversidade dos solos desempenha papel fundamental na regulação dos processos biogeoquímicos formadores e mantenedores dos agroecossistemas e o estímulo à atividade dos microorganismos do solo e à diversidade microbiana é considerado uma das principais características dos sistemas orgânicos de produção agrícola.

As limitações dos métodos tradicionais fazem com que técnicas de biologia molecular sejam muito utilizadas para o estudo da diversidade microbiana. Uma das técnicas mais utilizadas para avaliação da estrutura das comunidades microbianas do solo é o DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturante). Essa técnica é baseada na amplificação de fragmentos específicos de DNA por PCR e eletroforese em gel de poli-acrilamida com gradiente de desnaturação, no qual é possível separar fragmentos de DNA de mesmo tamanho, mas com diferentes seqüências de bases (Muyzer et al., 1993).

## OBJETIVO

Utilizar a técnica de DGGE para comparar a estrutura das comunidades bacterianas em solo sob Cerrado nativo e áreas sob cultivo orgânico e convencional.

## MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de um Latossolo Vermelho Amarelo foram coletadas em áreas vizinhas sob Cerrado nativo, cultivo convencional e cultivo com diferentes tempos de adoção (3, 6 e 15 anos) do sistema orgânico de produção. Cada uma das áreas foi dividida em três transectos de onde foram retiradas amostras compostas, na profundidade de 0 - 10cm, resultando em três repetições para cada área avaliada.

O DNA total do solo foi extraído diretamente das amostras com o auxílio do Kit MoBio Ultra Clean Soil. Em seguida, a presença e a integridade do DNA foram verificadas em gel de agarose 1%, seguindo protocolo estabelecido por Nübel et al. (1996).

O DNA extraído foi utilizado para a amplificação utilizando os iniciadores U968f-GC e L1401r que flanqueiam as regiões variáveis V6-V8 do 16S rDNA (Zoetendal et al., 1998). A reação de PCR foi conduzida em termociclador MJ PTC100 (MJ Research Inc.) com o seguinte programa: desnaturação inicial a 94°C por 4'; 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 1', anelamento dos primers a 47°C por 1'30", extensão da fita de DNA a 72°C por 1'; extensão final a 72° por 15'.

Os produtos de PCR foram separados por DGGE em gel de poli-acrilamida 6% com gradiente desnaturante contendo uréia e formamida variando de 40 a 70%, voltagem constante de 70V e temperatura de 60°C por um período de 18 horas em tampão TAE. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução SYBR-Green I (Molecular Probes) 1:10.000 (v:v).

Os perfis de bandas gerados pelo DGGE foram analisados pelo programa BioNumerics (Applied Mathematics, Versão 1.01) e para a análise de agrupamento foi usado o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) e o coeficiente de Jaccard.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O DNA obtido após a extração apresentou qualidade e quantidade suficientes para realização da reação de PCR. A amplificação produziu bandas com alta intensidade e com o tamanho esperado de aproximadamente 500 pb.

Após a análise dos resultados de DGGE observou-se a formação de três grupos com apenas 25% de

similaridade. Em um grupo concentraram-se amostras oriundas do Cerrado nativo, em outro as amostras da área sob cultivo convencional e finalmente um grupo contendo as amostras de áreas sob cultivo orgânico.

Esses resultados reforçam a tese de que alterações impostas ao ecossistema afetam a diversidade das populações bacterianas. Em relação ao cultivo orgânico, observou-se uma separação em dois grupos com 35% de similaridade, onde amostras da área com 15 anos foram separadas daquelas com 3 ou 6 anos de adoção desse sistema de manejo, indicando que variações no intervalo de tempo de adoção da agricultura orgânica também provocaram mudanças na comunidade microbiana.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostraram que a conversão de áreas de Cerrado nativo para áreas cultivadas altera a estrutura das comunidades bacterianas do solo, as comunidades bacterianas do solo de áreas sob cultivo orgânico são diferentes daquelas sob cultivo convencional e que o tempo de adoção de cultivo orgânico altera a estrutura das comunidades microbianas do solo.

Na continuação desses estudos, o próximo passo será a identificação de bandas predominantes em todas as amostras, ou aquelas presentes apenas sob determinado manejo, o que poderá ser feito através de sua eluição dos géis e posterior seqüenciamento. Esse procedimento possibilitará conhecer as populações mais dominantes da comunidade e as que são mais afetadas pelo manejo estabelecido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gelsomino A., Keijzer-Wolters A. C., Cacao G., Van Elsas, J.D., 1999, Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods*. 38: 1-15.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinder, A.G., 1993, Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.
- Nübel, U., Engelen, B., Feslke, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W., Backhaus, H., 1996, Sequence Heterogeneities of Gene Encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus*

*popolymyxa* Detected by Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *J. Bacteriol.* 178: 5636-5643.

- Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D. L., De Vos, W. M., 1998, Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3854-3859.

(Fonte de financiamento: EMBRAPA, CNPq Projeto 472174/2004-5)