

## AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO LODO DE ESGOTO NA MICROBIOTA DO SOLO UTILIZANDO O GENE 16S rRNA

E.A.N. Pedrinho<sup>1\*</sup>, E.G.M. Lemos<sup>1</sup>, R.M. Pereira<sup>1</sup>, D.C. Scaquitto<sup>1</sup>,  
É.L. da Silveira<sup>1</sup>, S.P. Val-Moraes<sup>1</sup>, L.M.C. Alves<sup>1</sup>, E. Wickert<sup>1</sup>, M.J. Valarini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Tecnologia, Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/nº, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil. E-mail: eliamar.pedrinho@gmail.com

### RESUMO

Este trabalho teve por objetivo estimar e comparar a diversidade microbiana de um solo tratado com lodo de esgoto (BAR 1N) com o mesmo solo sem tratamento (controle). A utilização do lodo de esgoto de origem industrial ou domiciliar em solos agrícolas como adubo orgânico é considerado, atualmente, uma alternativa promissora para disposição final deste resíduo. Estudos moleculares que utilizam a análise do gene 16S rRNA permitem a obtenção de informações relevantes acerca da ecologia microbiana, pois acredita-se que apenas 10% desses micro-organismos podem ser cultivados. O DNA genômico dos micro-organismos presentes em ambos os solos foi extraído, clonado e, após amplificação por PCR, foi feito o sequenciamento do gene 16S rRNA. As sequências obtidas foram submetidas à análise de similaridade de nucleotídeos com o banco de dados GenBank para que pudessem ser identificadas e classificadas. Após a análise dos filogramas observou-se um número elevado de micro-organismos não identificados nos solos analisados. Os resultados demonstraram que os filos bacterianos que se destacaram foram *Acidobacteria* e *Proteobacteria*. Análises filogenéticas revelaram diferenças entre os solos, mostrando por meio de índice de diversidade bacteriana que o solo controle apresentou maior diversidade quando comparado ao solo BAR 1N. O filo *Nitrospira* revelou-se significativamente afetado pela aplicação do lodo de esgoto.

PALAVRAS-CHAVE: Biossólido, ecologia microbiana, metagenoma.

### ABSTRACT

EVALUATION OF THE IMPACT OF SEWAGE SLUDGE ON SOIL MICROBES USING THE 16S RRNA GENE. The objective of this work was to evaluate and compare the microbial diversity of a soil treated with sewage sludge (BAR 1N) with the same soil without treatment (control). The use of industrial and domestic sewer sludge as organic fertilizer in agricultural soils is currently considered a promising alternative for the final destination of these residues. Molecular studies using the analysis of the gene 16S rRNA provide relevant information in regard to studies of microbial ecology, since it is believed that only 10% of these microorganisms can be cultivated. The sequences were submitted to analysis of nucleotide similarity, based on data in GenBank, in order to be identified and classified. Following phylogram analysis, a high number of nonidentified microorganisms were observed in the investigated soils. The results demonstrated that the outstanding bacterial phyla were *Acidobacteria* and *Proteobacteria*. Phylogenetic analyses revealed differences in both soils, based on the bacterial diversity index, showing that the test soil had more diversity when compared to the BAR 1N soil.

KEY WORDS: Biossolid, microbial ecology, metagenomic.

### INTRODUÇÃO

O uso agrícola do lodo de esgoto como adubo orgânico é considerado uma alternativa promissora

para disposição final deste resíduo. Devido às suas propriedades físico-químicas, o lodo de esgoto pode ser utilizado em áreas degradadas a fim de recuperar as características necessárias para o desenvolvimento

<sup>2</sup>Instituto de Zootecnia, Centro de Pesquisa em Genética e Reprodução Animal, Nova Odessa, SP, Brasil.

da vegetação (NASCIMENTO ARAUJO, 2004), incorporação de macro e micronutrientes (BETTIOL; CAMARGO, 2006), melhoria de áreas florestadas, fertilizantes em culturas anuais de grãos e condicionador de solo (MELO *et al.*, 2004). Por outro lado, pouco se sabe a respeito dos impactos decorrentes dessa utilização e dos seus efeitos sobre a estrutura das comunidades microbianas dos solos e sua capacidade metabólica. Processos importantes, como a ciclagem de nutrientes, estão diretamente relacionados com a atividade e diversidade microbiana do solo, existindo ainda poucos trabalhos relacionados à avaliação da diversidade de micro-organismos em solos com aplicação de lodo de esgoto.

A diversidade de micro-organismos no solo é importante para manter sua boa qualidade, já que eles desempenham inúmeras funções importantes nos solos como a participação nos ciclos do carbono, nitrogênio, fósforo (BORNEMAN, 1996), atividades metabólicas relevantes para o crescimento das plantas, recuperação de áreas degradadas (NASCIMENTO ARAUJO, 2004), decomposição de resíduos orgânicos, sequestro e desintoxicação de substâncias tóxicas (COSTANZA *et al.*, 1997).

Metodologias moleculares contribuem para o desenvolvimento de análise da diversidade microbiana dos solos (AMANN *et al.*, 1995; SANDAA *et al.*, 1998), revelando um novo cenário de distribuição dos micro-organismos em diferentes habitats (CANHOS *et al.*, 1997; PEREIRA *et al.*, 2006; SILVEIRA *et al.*, 2006), inclusive dos micro-organismos ainda não-cultivados em laboratório.

Este trabalho teve por objetivo analisar e comparar a diversidade genética de comunidades microbianas de um solo com aplicação de lodo de esgoto (BAR 1N) com o mesmo sem a aplicação (controle) pela abordagem metagenômica.

## MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de solo foram obtidas de áreas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária de Jaguariúna, SP, Brasil, localizada na latitude 22° 41' sul, longitude 47° W e altitude de 570 m e classificadas como Latossolo Vermelho Distroférrico (textura argilosa). Coletadas em 12 pontos ao acaso (0-20 cm profundidade) em zigue-zague, tanto para o solo sem tratamento (controle) como para o solo com aplicação do lodo de esgoto (BAR 1N), ambos separados por aproximadamente 500 m de distância. As amostras foram homogeneizadas, resultando em uma amostra composta para cada solo e foram submetidas a análises químicas e granulométricas (Tabela 1).

O lodo de esgoto utilizado no experimento foi obtido na Estação de Tratamento de Esgoto de Barueri, SP, que trata esgoto domiciliar e industrial.

A extração do DNA metagenômico das comunidades microbianas de cada solo, a amplificação, o sequenciamento do gene 16S rRNA e a análise das sequências observadas foram realizados conforme proposto por PEREIRA *et al.* (2006) e SILVEIRA *et al.* (2006). Cada sequência de DNA distinta obtida foi definida como Unidade Operacional Taxonômica (OTU). As sequências foram alinhadas pelo programa CLUSTALX v.1.81 (THOMPSON *et al.*, 1997) e submetidas à análise de agrupamento filogenético. Os filogramas foram construídos utilizando o método da distância com algoritmo "Neighbor-Joining" SAITOU; NEI (1987) e o modelo de substituição de nucleotídeos Kimura 2-P (KIMURA, 1980). As matrizes de distância foram processadas pelo programa MEGA, version 2.1 (KUMAR *et al.*, 2001) com bootstrap de 1.000 repetições. A análise da diversidade genética e diferenciação intra e interbibliotecas de sequências 16S rRNA foi realizada utilizando-se os programas Libshuff (SINGLETON *et al.*, 2001), Arlequin (SCHNEIDER *et al.*, 2000) e pelo pacote "PHYLIP" (FELSENTEIN; PHYLIP, 1989). A estimativa do número das espécies foi realizada pelo programa "EstimateS" versão 6.0b1 (HILL *et al.*, 2002) através do estimador não paramétrico ACE ("Abundance-base Coverage Estimator").

Tabela 1 - Características químicas e granulométricas dos solos BAR 1N e teste.

Características	Solo BAR 1N	Solo teste
pH (CaCl <sub>2</sub> )	5.2	5.8
Matéria orgânica (g/dm <sup>3</sup> )	27	25,5
P (mg/dm <sup>3</sup> )	34	17
K (mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	1.0	1.1
Ca (mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	30	32
Mg (mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	11	15
H+AL (mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	38	28
SB (mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	42.0	48.1
T (mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	80.0	76.1
V%	53	63
Argila (g/kg)	430	420
Limo (g/kg)	80	80
Areia fina (g/kg)	170	180
Areia grossa (g/kg)	320	320
Classe textural	Argilosa	Argilosa

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A aplicação do lodo no solo modificou algumas propriedades químicas como pH, que apresentou aumento de acidez, e um aumento de fósforo (Tabela 1). Isto pode ter influenciado a população microbiana nesse solo, uma vez que os filos *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e divisão NKB19 predominaram

nas amostras BAR-1N (solo tratado), enquanto nas amostras de solo controle (solo não tratado) apenas os filões *Nitrospira* e *Verrucomicrobia* (Tabela 2) tiveram um aumento no número de seus clones. Foram parcialmente sequenciados 155 clones das duas bibliotecas (BAR 1N e controle), sendo 74 clones pertencentes as amostras do solo BAR 1N e 81 ao controle. As sequências obtidas apresentaram, tamanho e qualidade adequadas para a estimativa da população bacteriana, nas duas áreas conforme PEREIRA *et al.* (2006). Após a análise do BLAST, foram encontradas 48 sequências distintas ou OTUs para BAR 1N e 61 sequências ou OTUs para a amostra controle (Tabela 2). Todas as sequências obtidas apresentaram taxas de similaridade variando de 85 a 100% em relação ao GenBank.

O número de clones sequenciados nas duas bibliotecas revelou diversidade de bactérias pertencentes ao filo *Acidobacteria*. Este filo é frequentemente encontrado em amostras ambientais como fontes termais, ambientes marinhos, terrestres e animais quando avaliados pela análise do gene 16S rRNA (BARNES *et al.*, 2007). HIRASHI *et al.* (1995) realizaram análises com este mesmo gene e propuseram que este agrupamento fosse denominado *Acidobacteria*, possuindo atualmente três representantes cultiváveis. DUNBAR *et al.* (2002) relataram a abundância desse filo em diversos estudos de meio ambiente mostrando que ele está presente praticamente em todos habitats do mundo e em diferentes ecossistemas. Em alguns casos, representantes desse filo constituíam cerca de 30 a 50% do total da população bacteriana obtida de diferentes solos (SILVEIRA *et al.*, 2006). QUASEIR *et al.* (2003) verificaram a existência de proteínas semelhantes (PurF/PurL) entre o filo *Acidobacteria* e o filo *Proteobacteria* sugerindo uma ocorrência de transferência horizontal dos genes entre esses filões durante a evolução, principalmente com a ordem *Rhizobiales*.

Dentre as 74 OTUs encontradas na biblioteca BAR 1N, 48 foram agrupadas em 7 filões diferentes e somente 3 sequências pertencentes ao filo Divisão NKB foram observadas no solo BAR 1N (Fig. 2). Por outro

lado, na biblioteca controle, 61 OTUs foram classificadas em 6 filões diferentes e nenhuma sequência pertencente a esta divisão se agrupou. (Fig. 1).

Analisando a distribuição dos clones nos diferentes filões observou-se que a maioria das sequências da biblioteca BAR 1N, 37,8% foi agrupada no filo *Acidobacteria*, enquanto que na biblioteca teste 35,8% agruparam-se com o mesmo filo, conforme visualizado na Tabela 2. Para o filo *Firmicutes*, observa-se um menor número de clones agrupados. Organismos pertencentes a esse filo apresentam baixo teor de G + C e metabolismo caracterizado por homo e heterofermentação, assim, permitem que prevaleçam em ambientes com grande quantidade de nutrientes disponíveis e áreas com baixa competição, características típicas de micro-organismos estrategistas R. Geralmente são encontrados em ambientes instáveis que estejam passando por transições (ATLAS; BARTHA, 1997).

Foram, também observadas frequências distintas de micro-organismos de alguns filões entre os solos estudados. Clones pertencentes ao filo *Proteobacteria* foram encontrados em maior quantidade no solo BAR 1N. Por outro lado, sequências agrupadas aos filões *Verrucomicrobia* e *Nitrospira* estão presente em maior número para amostra de solo controle (Tabela 2).

Dentre estes dois filões citados, o filo *Nitrospira* revela-se significativamente afetado pela aplicação do lodo de esgoto. Desta forma observa-se que a aplicação de lodo de esgoto em solos agrícolas é um fator de alteração da microbiota do solo, pois ele interfere no crescimento de alguns micro-organismos. Apenas uma sequência foi classificada como pertencente a esse filo em comparação com a amostra de solo controle, que apresentou dez sequências (Tabela 2). Esse filo é representado por bactérias aeróbias gram-negativas atuantes no ciclo do nitrogênio em ambientes aquáticos através da oxidação do nitrato. FAORO (2006) supõe que esse grupo pode ter atividades semelhantes no solo.

Tabela 2 - Distribuição das sequências dos clones 16S rRNA observados nos solos teste e BAR 1N.

Domínio: bactéria filões	BAR 1N N <sup>as</sup> de clones distintos	BAR 1N N <sup>as</sup> de clones observados	%	Teste N <sup>as</sup> de clones distintos	Teste N <sup>as</sup> de clones observados	%
Acidobacteria	15	28	37,8	19	29	35,8
Actinobacteria	4	7	9,5	4	4	4,9
Firmicutes	6	8	10,8	7	7	8,6
Nitrospira	1	1	1,4	8	10	12,4
Proteobacteria	13	18	24,3	7	7	8,6
Verrucomicrobia	7	9	12,1	18	27	33,3
Divisão NKB19	2	3	4,0	-	-	-
Total	48	74	100	61	81	100



Fig.1 - Dendrograma filogenético representando clones pertencentes aos filos Firmicutes, Actinobactéria e Proteobactéria obtidos de seqüências parciais do gene 16S rRNA de solo BAR 1N e teste. A seqüência 16S rRNA de "Uncultures Archaeon" (nº GenBank AB055990) foi usado como raiz. Todos os clones estão cadastrados no NCBI (GenBank), acessados por SL (Soil BAR1N) e ST (Soil Test).

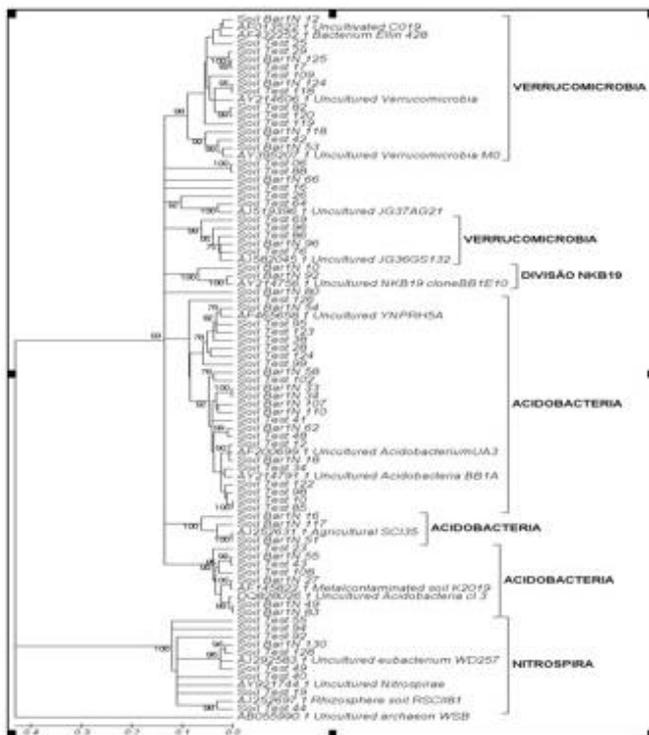


Fig.2 - Dendrograma filogenético representando clones pertencentes aos filos Nitrospira, Actinobactéria, Verrucomicrobia e Divisão NKB19 obtidos de seqüências parciais do gene 16S rRNA de solo BAR 1N e teste. A seqüência 16S rRNA de "Uncultures Archaeon" (nº GenBank AB 055990) foi usado como raiz. Todos os clones estão cadastrados no NCBI (GenBank), acessados por SL (Soil BAR1N) e ST (Soil Test).

LEE (1996) relatou que o filo *Verrucomicrobia* representa aproximadamente de 1% a 10% das bactérias de um solo não cultivado no interior da Austrália e EUA. Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com os descritos por LEE (1996), na amostra de solo controle ocorreu 33,3% de represen-

tantes desse filo, sendo que na amostra de solo BAR 1N a proporção foi reduzida para 12,1%, considerando assim a aplicação do lodo de esgoto como um fator de alteração da microbiota do solo. Por outro lado, foi verificado um aumento na por-

centagem de sequências agrupadas no filo *Actinobacteria*, na amostra de solo BAR 1N (Tabela 2). Representantes desse filo têm grande interesse econômico por produzirem substâncias complexas para degradação do material orgânico, tendo como característica a produção de diversos antibióticos. Resultados semelhantes foram encontrados por PEREIRA *et al.* (2006) que verificaram um aumento populacional desse filo em solo intensamente cultivado em relação a um solo coberto por floresta, provavelmente devido a alterações do meio ambiente causados pelas práticas e cultivos agrícolas.

Já a quantidade de sequências agrupadas ao filo *Proteobacteria* observada no solo BAR 1N foi maior em relação a amostra de solo controle (Fig. 1), com valores de 24,3% e 8,6%, respectivamente (Tabela 2). Resultados semelhantes foram obtidos por TIEDJE (1999) e SANDAA *et al.* (1998) que relataram o predomínio desse filo em solos de cultivo e contaminados com metal pesado que geralmente têm um pH mais ácido. Neste trabalho, verifica-se que o solo BAR 1N apresentou maior acidez quando comparado com o solo controle, o que pode ter permitido melhor desenvolvimento de bactérias desse filo.

As análises de diversidade genética dos clones 16S rRNA heterólogos para as bibliotecas BAR 1N e teste resultaram em um valor estatisticamente significativo ( $P \leq 0.001$ ), sendo 1,231 para teste versus BAR 1N e 1,104 para BAR 1N versus teste na análise realizada pelo Libshuff. Essas análises sugerem que as áreas estudadas são distintas, mas que existe uma taxa relativa de similaridade entre os solos amostrados.

O índice de diferenciação genética ( $F_{ST}$ ) entre as duas comunidades bacterianas (BAR 1N e controle) foi significativo ( $F_{ST} = 0.01268$ , para  $P < 0.05$ ), sugerindo que, embora o valor seja relativamente baixo, as duas comunidades são geneticamente distintas. Por outro lado, um dado interessante foi a existência de uma maior diversidade genética em cada solo individualmente do que entre as comunidades presentes BAR 1N e controle, concordando com os resultados já obtidos que os filões se repetem havendo, entretanto, alteração das frequências genotípicas para os indivíduos. Os resultados da variação genética intra-populacional calculados pelo AMOVA apresentaram uma média de 98.73, ou seja, há uma grande variabilidade de organismos dentro de uma mesma comunidade, embora a maioria dos clones esteja presente em ambas as amostras dos solos.

O software Arlequin analisou sequências de DNA com 607 pares de bases de cada clone em ambos os solos calculando também a média das diferenças entre pares de bases, valores que foram de 74.35 e 88.614 para as bibliotecas lodo e controle, respectivamente.

Já o número de nucleotídeos polimórficos, em ambos os solos, apresentou valores de 537 e 566 nas bibliotecas lodo e controle, respectivamente. Estes valores indicam a existência de uma maior diversidade genética na amostra controle em relação a BAR 1N (Tabela 2).

## CONCLUSÕES

Ocorre uma diversidade bacteriana maior na amostra de solo controle em relação a BAR 1N a amostra com aplicação de lodo.

Um aumento na diversidade populacional do filo *Acidobacteria*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria* da biblioteca BAR 1N em relação à biblioteca controle que a utilização do lodo de esgoto em práticas agrícolas é promissora, ocorrendo microrganismos com grande capacidade de decomposição da matéria orgânica.

Existe uma maior diversidade genética em cada amostra de solo individualmente, do que entre as comunidades presentes nas amostras do solo com e sem aplicação do lodo.

## AGRADECIMENTOS

À Fapesp (nº 03/00851-9) pelo auxílio financeiro e à Capes pela concessão de bolsa ao primeiro autor. Aos bioinformatas Maurício Egídio Cantão e Dr. Luciano Kishi pela ajuda nas análises contidas neste trabalho e à Tehuni Orlando Gonzáles pela colaboração na elaboração deste artigo.

## REFERÊNCIAS

- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Review*, n.59, p.143-169, 1995.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. Microbial evolution and biodiversity: the origins of life. In: \_\_\_\_\_ (Ed.). *Microbial ecology: fundamentals and applications*. 4th. ed. Menlo Park: Book News, 1997. p.37-39.
- BARS, S.M.; CAIN, E.C.; SAMMERVILLE, L.; KUSKE, C.R. Acidobacteria phylum sequences in uranium-contaminated sediments greatly expand the known diversity within the phylum. *Applied Environmental Microbiology*, v.73, n.9, p.3113-3116, 2007.
- BETTIOL W.; CAMARGO O.A. *Lodo de esgoto: impacto ambientais na agricultura*. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2006. 349p.

- BORNEMAN, J. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, n.6, p.1935-1943, 1996.
- CANHOS, V.P.; MANFIO, G.P.; VAZOLLER, R.F.; PELLIZARI, V.H. Diversidade no domínio bactéria. In: JOLY, C.A.; BICUDO, C.E.M. (Org.). *Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX*. 1. Microorganismos São Paulo: Fapesp, 1997. v.1, p.1-13,
- COSTANZA, R.; D'ARGE, R.; DE GROOT, R.; FABER, S.; GRASSO, M.; HANNON, B.; LIMBURG, K.; NAEEM, S.; O'NEILL, R.V.; PARUELO, J.; RASKIN, R.G.; SUTTON, P.; BELT, M. van den. The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature*, v.387, p.253-260, 1997.
- DUNBAR, J.; BARNES, S.M.; TICKNOR, L.O.; KUSKE, C.R. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, n.6, p.3035-3045, 2002.
- FAORO, H. *Determinação da biodiversidade da Archaea e Bactéria da Mata Atlântica Paranaense*. 2006. 183 p. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- FELSENSTEIN, J. PHYLIP: phylogeny inference package (Version 3.2). *Cladistics*, v.5, p.164-166, 1989.
- HILL, T.C.J.; WALSH, K.A.; HARRIS, J.A.; MOFFETT, B.F. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, v.43, p.1-11, 2002.
- HIRASHI, A.; KISHIMOTO, N.; KOSAKO, Y.; WAKAO, N.; TANO, T. Phylogenetic position of the menaquinone-containing acidophilic chemoorganotroph *Acidobacterium capsulatum*. *FEMS Microbiology Letters*, v.132, p.91-94, 1995.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, v.16, n.2, p.111-120, 1980.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B.; NEI, M. Mega2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, v.17, p.1244-1245, 2001.
- LEE, S.Y. Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p.3787-3793, 1996.
- MELO, V.P.; BEUTLER, A.N.; SOUZA, Z.M.; CENTURION, J.F.; MELO, W.J. Atributos físicos de Latossolos adubados durante cinco anos com biossólidos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.39, n.1, p.67-72, 2004.
- NASCIMENTO, C.W.A.; ARAÚJO, J.C.T. Redistribuição entre frações e teores disponíveis de zinco em solos incubados com lodo de esgoto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.29, n.4, 2004.
- OLIVEIRA, F.C.; MARTIAZZO, M.E.; MARCIANO, C.R.; ROSSETO, R. Efeitos de aplicações sucessivas de lodo de esgoto em um Latossolo Amarelo distrófico cultivado com cana-de-açúcar, carbono orgânico, condutividade elétrica, pH e CTC. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.26, p.505-519, 2002.
- PEREIRA, R.M.; DA SILVEIRA, E.L.; SCAQUITTO, D.C.; PEDRINHO, E.A.N.; VAL-MORAES, S.P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES, L.M.; LEMOS, E.G.M. Molecular characterization of bacterial populations of different soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.4, n.37, p.439-447, 2006.
- QUASEIR, A.; OCHSENREITER, T.; LANZ, C.; SCHUSTER, S.C.; TREUSCH, A, H.; ECK, J.; SCHLEPER, C. Acidobacteria form a coherent domain; evidence from environmental genomics, *Molecular Microbiology*, v.50, 563-575, 2003.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution*, v.4, p.406-425, 1987.
- SANDAA, R.A.; ENGER, O.; TORSVIK, V. Rapid methods for fluorometric quantification of DNA in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, v.30, n.2, p.265-268, 1998.
- SCHNEIDER, S.D.; FURLONG, M.A.; EXCOFFIER, L. *Arlequin version 2.000: a software for population genetics data analysis*. Geneva: Genetics and Biometry laboratory, University of Geneva, 2000.
- SILVEIRA, E.L.; PEREIRA, R.M.; SCAQUITTO, D.C.; PEDRINHO, E.A.N.; VAL-MORAES, S.P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES, L.M.; LEMOS, E.G.M. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, n.9, p.1507-1516, 2006.
- SINGLETON, D.R.; FURLONG, M.A.; RATHBUN, S.L.; WHITMAN, W.B. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, p. 4374-4376, 2001.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, v.25, p.4876-4882, 1997.
- TIEDJE, J.M.; STEIN, J.L. Microbial Biodiversity: Strategies for its recovery. In: DEMAIN, A.L.; DAVIES, J. (Ed.). *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Washington, DC.: Amer. Soc. Microbiol., 1999. p.682-692.

Recebido em 15/5/08

Aceito em 19/5/09