

1 – INTRODUÇÃO

O azoto é o macronutriente mais abundante nas plantas, sendo também o mais exigido em relação aos demais. A sua função mais importante está relacionada com sua participação na constituição das proteínas. Além disso, participa também na formação de compostos indispensáveis às plantas, como purinas, pirimidinas, pafininas e coenzimas (Varenes, 2003).

A oliveira, cujo nome científico é *Olea europaea* L., pertence à família Oleaceae, ordem Lamiales, sendo que existem diferentes sub-espécies. É uma árvore de elevada longevidade, podendo atingir cerca de 300-400 anos, ou mais. O interesse no seu cultivo está relacionado com o valor do seu fruto, a azeitona, e a respectiva extracção de azeite. Por ser uma árvore rústica, encontra-se em solos pouco férteis e climas áridos. No entanto, sendo que o seu desenvolvimento depende da variedade/cultivar e do local onde se encontra, a produção aumenta em locais de maior pluviosidade e mais férteis (Guerrero, 1988).

De todos os nutrientes minerais, o azoto é o mais importante para o crescimento das plantas, influenciando o crescimento das folhas e, conseqüentemente, a disponibilidade de hidratos de carbono disponíveis para o crescimento, a taxa fotossintética por unidade de área da folha, bem como o número e tamanho de órgãos de armazenamento (Varenes, 2003). A sua absorção a partir do solo é efectuada maioritariamente sob a forma de amónio e nitrato. Por razões termodinâmicas a amónio, na forma de catião, não necessita de energia metabólica para a sua absorção, fluindo livremente através do gradiente electroquímico entre o apo- e o simplasma. Por seu lado, o nitrato tem que ser primeiramente reduzido a amónia, uma processo que requer muita energia. A amónia, por sua vez, é um elemento muito tóxico para as plantas, pois inibe a produção de ATP, quer na respiração, quer na fotossíntese, e por este motivo os iões de amónio formados são rapidamente utilizados na síntese de aminoácidos. Este processo é denominado aminação, sendo através deste que ocorre a transferência de um ião amónio para um cetoácido com formação de ácido glutâmico, o principal transportador de azoto na planta (Engels e Marschner, 1995).

1.1 – A fertilização biológica como alternativa à fertilização química

Sendo o azoto fundamental para o desenvolvimento vegetal, é de prática comum a sua adição aos terrenos agrícolas para aumentar a sua produtividade. No entanto, nos

últimos anos, têm vindo a ser procuradas alternativas à fertilização química em virtude da poluição provocada pela acumulação de nitratos nos solos (Varenes, 2003).

Assim, a exploração da fixação biológica de azoto molecular nos sistemas agrícolas poderá contribuir de modo significativo para a redução da utilização de fertilizantes químicos, que são necessários em grandes quantidades e são produzidos a partir de fontes de energia não renováveis, o que implica um elevado gasto anual de recursos. Contrariamente, a energia necessária à fixação biológica de azoto é obtida através da fotossíntese. Por outro lado, a libertação de azoto nos ecossistemas tem efeitos nocivos na saúde pública, através da contaminação das águas e também no aquecimento global e depleção da camada de ozono através da emissão de óxido nítrico. A fixação biológica de azoto parece contribuir menos para perdas deste elemento do que a utilização de fertilizantes químicos, devido ao mecanismo de feedback entre o azoto fixado e o azoto do solo. A fixação só ocorre quando os níveis de azoto do solo são baixos, enquanto a introdução artificial, em terrenos com herbívoros, por exemplo, aumenta as perdas através da excreção (volatilização da amoníaco) ou mesmo a libertação do excesso através das plantas. A fixação pode também contribuir para o aumento da estabilidade ecológica através da manutenção ou melhoramento da estrutura do solo, reduzindo a erosão. Uma solução para aumentar a fixação de azoto em solos ricos neste elemento poderá passar por alternar (ou juntar) a cultura de leguminosas com culturas que esgotam o azoto do solo como, por exemplo, o milho (Ledgard e Giller, 1995).

Por outro lado, um excesso de azoto tem efeitos nefastos nas plantas, uma vez que faz com que a parte aérea se desenvolva mais rapidamente que as raízes, tornando-as mais susceptíveis à seca e à deficiência de nutrientes minerais como o fósforo ou o potássio. A promoção do crescimento foliar pode resultar em sombra para outras plantas, o que altera o microclima e potencia as infecções fúngicas. Estas infecções são também promovidas pelo aumento da suculência dos tecidos vegetais, que permitem um rápido desenvolvimento dos agentes patogénicos. Elevados conteúdos de azoto nas folhas alteram a composição das plantas e atraem ainda uma grande variedade de insectos (Engels e Marschner, 1995).

1.2 – O ciclo do azoto

O azoto, tal como todos os outros elementos biologicamente importantes está sujeito a transformações cíclicas, de modo que pode ser utilizado e restituído

constituindo-se, assim, o ciclo do azoto através do qual um átomo de azoto passa do estado orgânico ao inorgânico e vice-versa, numa sequência de processos que implicam a participação de organismos vivos e conversões químicas (Figura 1.2.1).

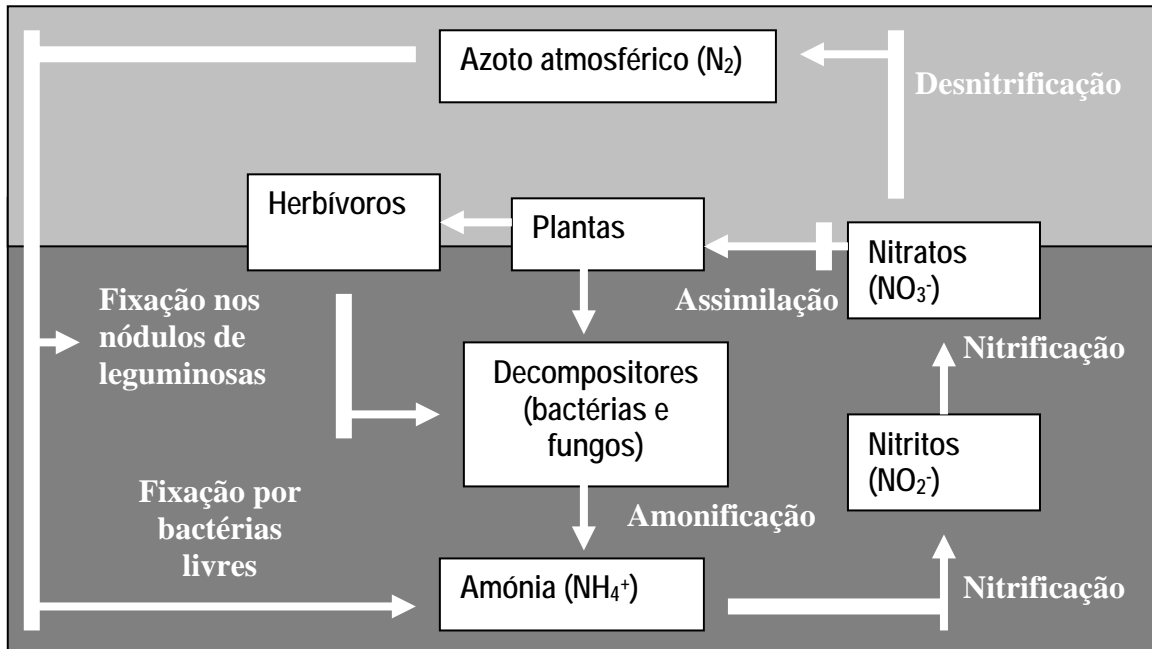


Figura 1.2.1 – Ciclo do azoto

O ciclo do azoto compreende um conjunto de transformações que se processam em várias etapas, de entre as quais se pode destacar:

- a) Formação de azoto inorgânico, como amoníaco, nitrito e nitrato, a partir de azoto orgânico resultante da decomposição de organismos e das suas excreções, através da mineralização.
- b) O azoto inorgânico pode ser absorvido por plantas e microrganismos e voltar a entrar na composição da matéria viva podendo assim circular, de novo na cadeia alimentar.
- c) O azoto inorgânico pode ser transformado em azoto molecular e óxidos de azoto que se libertam para a atmosfera, através da desnitrificação.
- d) O azoto molecular atmosférico pode passar para a forma combinada através da fixação.

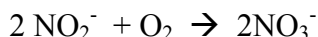
A mineralização inclui dois processos: a amonificação e a nitrificação. A primeira consiste na formação de compostos amoniacais e é realizada por microrganismos heterotróficos entre os quais se destacam muitas bactérias e fungos. A

segunda é a oxidação da amónia (NH_4^+) a nitrato em duas fases realizadas por dois géneros de bactérias que obtêm, assim, a energia necessária ao seu crescimento.

Na 1ª fase da nitrificação as bactérias do género *Nitrosomonas* oxidam a amónia a nitrito, de acordo com a reacção:



Na 2ª fase as bactérias do género *Nitrobacter* realizam a conversão do nitrito de acordo com a reacção:



A nitrificação nos solos dá-se com relativa rapidez. O nitrato constitui a principal fonte de azoto para a maioria das plantas. É importante salientar que enquanto a amónia é facilmente retida no solo, o mesmo não acontece com o nitrato, facilmente lixiviado para zonas inacessíveis ao sistema radicular das plantas, em condições de forte pluviosidade e de solo permeável. Estas perdas de azoto para as plantas podem atingir, durante as chuvas de Inverno em climas mediterrânicos cerca de 50% (Varenes, 2003).

A mineralização e retenção do azoto no solo dependem muito da relação carbono/ azoto dos resíduos orgânicos. Se esta relação for superior a 30, o azoto produzido por amonificação é rapidamente assimilado pelos microrganismos e incorporado nas suas proteínas, entrando assim em competição com as plantas superiores. Quando esta relação é inferior a 15, há azoto em excesso ao utilizado pela microbiota do solo, intervindo assim as bactérias específicas nitrificantes, sendo os nitratos produzidos facilmente utilizados pelas plantas superiores e incorporados nas suas proteínas (Correia, 1986).

No solo algumas bactérias como *Pseudomonas fluorescens* e *Micrococcus denitrificans* realizam a redução dos nitratos a óxidos de azoto e azoto molecular denominando-se este processo de desnitrificação. Estas perdas são bastante significativas visto os óxidos de azoto e azoto molecular serem libertados para a atmosfera.

No ciclo do azoto a restituição deste elemento é realizada essencialmente por três vias: a restituição pela precipitação, a fixação industrial do N_2 e a fixação biológica do N_2 .

A fixação industrial do azoto molecular compreende a produção de amoníaco e fertilizantes industriais azotados a partir do azoto atmosférico, contudo a preços de produção muito elevados e com prejuízos ambientais igualmente devastadores (destruição da camada de ozono).

A precipitação é um processo natural através do qual os óxidos de azoto e mesmo amoníaco são infiltrados no solo.

A fixação biológica do N₂ consiste na conversão de azoto atmosférico e é realizada por microrganismos em vida livre ou em simbiose. Estes microrganismos foram designados de diazotróficos (azoe – azoto; trofos – alimentação) (Madigan *et al.* 2002; Prescott *et al.*, 1996)

1.3 – A importância da comunidade bacteriana diazotrófica para a agricultura biológica

Embora o azoto esteja presente em grande percentagem na atmosfera, na forma elementar (N₂), poucos são os organismos que o assimilam nessa forma. Apenas alguns grupos de bactérias e cianobactérias podem retirá-lo do ar na forma de N₂ e incorporá-lo nas suas moléculas orgânicas. Como consequência, os demais seres vivos dependem desses organismos para a fixação do azoto ambiental. Este processo é particularmente importante na prática da agricultura biológica, na qual não são utilizados fertilizantes químicos (Varenes, 2003; Ledgard e Giller, 1995).

As bactérias diazotróficas vivem próximas da superfície do solo. Ao morrer e ser degradadas, libertam azoto no solo, na forma de moléculas de amónia. Outros tipos de bactérias transformam a amónia em nitratos, sendo nesta forma que as plantas absorvem o azoto do solo, através das raízes. Algumas destas bactérias diazotróficas são de vida livre no solo (p. ex. *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Clostridium* e *Methanococcus*) enquanto outras, como as do género *Rhizobium*, vivem no interior dos nódulos das raízes de plantas leguminosas, como a soja ou o feijão. Existem ainda as cianobactérias (*Nostoc* e *Anabaena*), bactérias autotróficas, que também possuem esta capacidade (Prescott *et al.*, 1996). Na tabela 1.3.1 apresentam-se alguns géneros bacterianos diazotróficos e a sua relação com o oxigénio e a luz.

Tabela 1.3.1 – Relação de alguns géneros bacterianos com o oxigénio e a luz (adaptado de Madigan *et al.*, 2002)

Relação com o oxigénio e luz	Género
Anaeróbios estritos	<i>Clostridium, Desulfovibrio, Methanococcus</i>
Facultativos (aeróbios quando não fixam N ₂)	<i>Klebsiella, Enterobacter</i>
Microaerofílicos	<i>Azospirillum, Bradyrhizobium</i>
Aeróbios	<i>Azotobacter, Beijerinckia, Derrxia</i>
Fototróficos (anaeróbios)	<i>Chromatium, Chlorobium</i>
Fototróficos (facultativos)	<i>Rhodospirillum</i>
Fototróficos (microaerofílicos)	<i>Oscillatoria, Spirulina</i>
Fototróficos (aeróbios)	<i>Anabaena, Nostoc</i>

As bactérias simbiotes pertencentes ao género *Rhizobium* penetram nas raízes das leguminosas através dos pêlos radiculares e atingem as células corticais, provocando o enrolamento do pêlo radicular culminando na formação de um nódulo. Cada leguminosa encontra-se associada a espécies distintas de *Rhizobium* (Tabela 1.3.2) sendo que, por exemplo, nos trevos existe uma proteína, a trifoliina, responsável pela ligação do *Rhizobium trifolii* aos trevos (Ledgard e Giller1995). A amónia formada pela fixação é assimilada e transformada em amidas ou ureidas, antes de serem transportadas pelo o xilema para várias partes da planta, onde são sintetizadas as proteínas. Esta associação é simbiótica porque a planta fornece carbono que fixou através da fotossíntese ao organismo diazotrófico que, em troca, proporciona azoto numa forma assimilável (Ledgard e Giller1995).

Embora uma das simbioses mais comuns e eficazes seja a de leguminosa/*Rhizobium*, é necessário que ambas as espécies sejam compatíveis, sendo que ou a planta introduzida é compatível com as espécies de bactérias nativas do solo, ou deverão ser inoculadas, caso contrário os nódulos nas raízes não se desenvolvem, ou mesmo que se desenvolvam a eficácia da fixação biológica é nula. No entanto, a população indígena é difícil de substituir. Além da presença e compatibilidade de simbiotes, para que ocorra a formação de nódulos, outras condições são necessárias, como a presença de nutrientes essenciais. O cobalto é importante para que se inicie a nodulação, enquanto o boro é mais importante no crescimento e desenvolvimento dos

nódulos, uma vez que está implicado no crescimento da planta. O molibdénio e o ferro são importantes para o funcionamento do nódulo, uma vez que entram na constituição da enzima nitrogenase (Ledgard e Giller1995).

Tabela 1.3.2 – Diferentes espécies do género *Rhizobium* e seus simbiosites (Varenes, 2003; Correia, 1986)

Espécie de <i>Rhizobium</i>	Simbionte	Novo género
<i>R. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i> spp.	<i>Sinorhizobium</i>
<i>R. fredii</i>	<i>Glycine max, Glycine soja</i>	
<i>R. medicae</i>	<i>Medicago</i>	
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	<i>Vicia fava, Pisium sativa, Lathyrus</i> spp.	
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i> spp.	
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris,</i> <i>Leucoena</i> spp. <i>Macroptilium</i> spp.	<i>Mesorhizobium</i>
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
<i>R. galegae</i>	<i>Galega officinalis, G.orientalis</i>	
<i>R. loti</i>	<i>Lotus</i> spp.	
<i>R. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	
<i>R. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	
<i>Rhizobium</i> sp. estirpe NGR234	<i>Parasponia, leguminosas tropicais</i>	

Outro factor determinante da presença de bactérias diazotróficas e respectivos simbiosites é o pH do solo. A acidez do solo actua principalmente via alumínio e/ou manganês, sendo que as leguminosas dependentes da fixação de azoto são mais susceptíveis à toxicidade por estes metais do que outras plantas que retiram o azoto directamente do solo (Ledgard e Giller1995).

Elevadas concentrações de azoto inorgânico podem inibir os processos de infecção das raízes, crescimento e desenvolvimento do nódulo e fixação de azoto molecular. No entanto, em solos pobres em azoto, a aplicação de uma pequena quantidade de fertilizante contendo azoto pode promover a nodulação através de um rápido desenvolvimento da planta e respectivo sistema radicular. Este processo é denominado efeito iniciador (Varenes, 2003; Ledgard e Giller1995).

As bactérias fixadoras de azoto não simbióticas mais importantes para a agricultura são o *Azotobacter* e *Beijerinckia*, largamente disseminados na água e no solo e que possuem uma vigorosa respiração. A inoculação do solo com *Azotobacter* pode,

em condições favoráveis, promover a fixação de cerca de 10kg de azoto/hectare/ano (Correia, 1986). As espécies anaeróbias não fotossintéticas (a maioria pertencente ao género *Clostridium*) encontram-se muito disseminadas no solo, ao passo que as anaeróbias fotossintéticas (como os géneros *Chromatium* e *Chlorobium*), embora também abundantes, estejam limitadas pela luz (Correia, 1986). Os microrganismos fixadores de azoto mais importantes para a agricultura encontram-se esquematizados na tabela 1.3.3.

Tabela 1.3.3 – Organismos fixadores de azoto que contribuem para a agricultura (Ledgard e Giller 1995)

Estado do organismo	Microrganismo diazotrófico	Simbionte
Heterotróficos		
Vida livre		
Anaeróbicos	<i>Clostridium</i>	
Microaerofílicos	<i>Frankia</i> , <i>Bradyrhizobium</i>	<i>Azospirillum</i> ,
Aeróbicos	<i>Azotobacter</i> , <i>Dexia</i>	
Associados a raízes		
Microaerofílicos	<i>Azospirillum</i>	
Endofíticos	<i>Herbaspirillum</i> , <i>Acetobacter</i>	<i>Saccharum</i> spp.
Simbióticos	<i>Frankia</i> <i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> <i>Azorhizobium</i>	<i>Casuarina</i> spp., <i>Alnus</i> spp. Diferentes leguminosas <i>Sesbania rostrata</i>
Autotróficos		
Vida livre		
Microaerofílicos	<i>Rhodospirillum</i> , <i>Bradyrhizobium</i>	
Aeróbicos	Cianobactérias	
Simbióticos	Nostoc Anabaena azollae Nostoc	Fungos (líquenes) <i>Azolla</i> spp. Cícaras

1.3. 1 – A enzima nitrogenase e a fixação biológica de azoto

A enzima nitrogenase, proteína-chave na fixação do azoto, consiste em duas proteínas componentes. O componente I (proteína que contém molibdénio e ferro) é constituído por quatro subunidades, cada uma delas com uma hélice simples de aminoácidos contendo vinte e quatro átomos de ferro, dois átomos de molibdénio e cerca de 28 átomos de enxofre ácido lábil. O componente II (proteína que contém ferro) é constituído por duas subunidades e inclui quatro átomos de ferro e quatro átomos de enxofre ácido lábil. Na composição em aminoácidos da proteína de ferro-molibdénio predominam ácidos acíclicos, possuindo todos os aminoácidos comuns. A proteína do componente II não contém triptofano. O molibdénio parece estar implicado no centro activo do componente I e ambos os componentes são desnaturados irreversivelmente pelo oxigénio. As bactérias que fixam o azoto em ambiente de aerobiose, como as pertencentes ao género *Azotobacter*, possuem enzimas que reduzem o oxigénio para formar água logo que este entra na célula. Na simbiose de *Rhizobium* e plantas leguminosas, a barreira contra o oxigénio é mais sofisticada, sendo este retirado antes de atingir as bactérias, por uma proteína que fixa oxigénio denominada leghemoglobina (Correia, 1986; Prescott *et al.*, 1996).

A enzima nitrogenase apresenta variantes sem molibdénio, só com ferro, ou ainda com vanádio, em *Azotobacter* spp. e, possivelmente, em outros organismos fixadores de azoto (Pau, 1989). Esta enzima é regulada pela quantidade de azoto fixada, que reprime a expressão do gene (*nifH*) e conseqüente síntese da nitrogenase, o que suprime a fixação de mais azoto. Em diversas espécies bacterianas a glutamina sintetase tem um papel importante no metabolismo do azoto, pois catalisa a primeira reacção da síntese de aminoácidos, ao fazer reagir a amónia com o glutamato para a produção de glutamina, sendo os outros aminoácidos, em geral, sintetizados por transaminação. Concentrações elevadas de glutamina e alguns outros aminoácidos diminuem a actividade da glutamina sintetase, suprimindo a produção de mais aminoácidos e a fixação de azoto, pela acumulação deste (Peters *et al.*, 1995).

Globalmente, a fixação de azoto atmosférico representa um *input* de azoto de cerca do dobro dos fertilizantes, tendo sido estimado que a fixação de azoto livre por organismos simbioses e em associação ou de vida livre seja de 120 e 50 megatoneladas/ano, respectivamente, e por fertilizantes seja 80 megatoneladas/ano (Ledgard e Giller 1995).

A fixação do azoto implica a transferência de átomos de hidrogénio dos glúcidos para o azoto, que se opera através da nitrogenase, existente apenas em procariontes. Os electrões provenientes dos glúcidos são transferidos para o componente II e depois para o componente I, onde ocorre a redução de azoto a amónia, sendo os protões removidos do meio aquoso da célula. O funcionamento dos dois componentes necessita de ATP (Prescott *et al.*, 1996) (Figura 1.3.1.1).

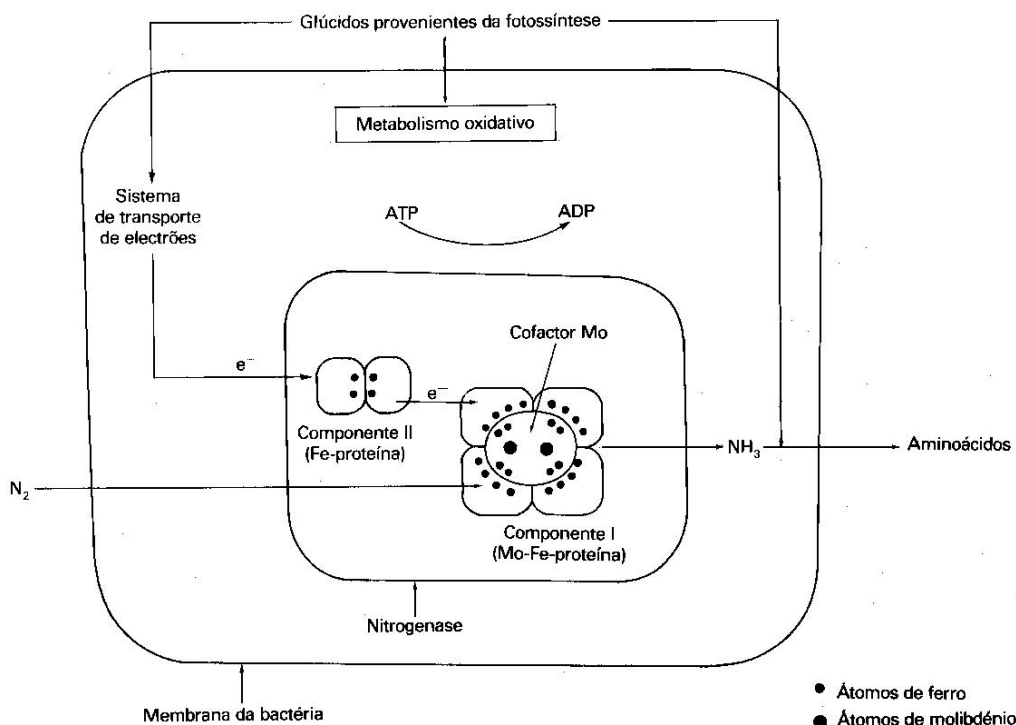


Figura 1.3.1.1 – Fixação de azoto através da nitrogenase (Adaptado de Correia, 1986)

O azoto molecular reduzido a amónia (NH_4^+) pode posteriormente ser assimilado e usado pelas plantas (Ledgard e Giller1995).

Nesta reacção, pelo menos dois protões são reduzidos a hidrogénio por cada molécula de azoto fixada, sendo uma reacção com um elevado custo energético devido à grande estabilidade da tripla ligação que une os dois átomos de azoto (Ledgard e Giller1995; Prescott *et al.*, 1996):



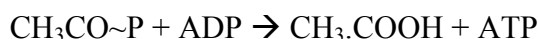
Os electrões provêm da ferredoxina, que pode ser reduzida de diversas formas, de acordo com o organismo de proveniência: através da fotossíntese nas bactérias, processos respiratórios em fixadores de azoto aeróbios ou fermentações em organismos anaeróbios. Por exemplo, o *Clostridium pasteurianum* reduz a ferredoxina durante a

oxidação do piruvato, enquanto o *Azotobacter* usa electrões do NADPH (Pescott *et al.*, 1996).

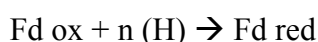
Nas bactérias do género *Clostridium* o ácido pirúvico tem um papel fundamental no metabolismo da fixação do azoto, pela sua quebra em acetilfosfato, poder redutor e dióxido de carbono:



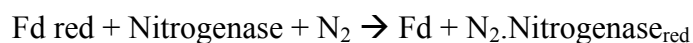
O acetilfosfato pode transferir a ligação de alto nível energético



Enquanto o poder redutor gera ferredoxina reduzida (Fd red) a partir da forma oxidada (Fd ox)



O azoto atmosférico é activado pela nitrogenase e o complexo de azoto e da nitrogenase é reduzido pela ferredoxina



O complexo reduzido é então activado pelo ATP formado anteriormente, produzindo-se a amónia



A fixação simbiótica de azoto nos nódulos radiculares requer vestígios de molibdénio, cobalto, e leghemoglobina (uma hemoglobina dos nódulos das raízes, em que a parte heme é sintetizada pelo microrganismo e a globina é sintetizada pela planta hospedeira) (Correia, 1986).

Na avaliação de processos, quer aqueles que possam promover o estabelecimento das bactérias diazotróficas quer os que eventualmente venham a causar o seu declínio, torna-se fundamental avaliar a constituição desta comunidade bacteriana. Os métodos disponíveis para a avaliação desta microbiota podem ser divididos em métodos clássicos e métodos moleculares.

1.4 – A descrição das comunidades microbianas através de métodos culturais versus moleculares

A metodologia aplicada na identificação e caracterização dos microrganismos baseia-se nas diferentes características destes: i) as características nutricionais, ou seja os nutrientes necessários ao crescimento das espécies que se pretendem estudar e às condições físicas do ambiente que proporcionam o seu crescimento, ii) as morfológicas, através das quais se abordam a forma e dimensões da célula, o seu agrupamento e

diferenciação, iii) as características metabólicas, onde se explora o conjunto de processos químicos vitais levados a cabo pelos microrganismos de interesse, iv) a composição química da célula microbiana, v) as suas características genéticas e por fim vi) as suas características ecológicas onde se examina a sua ocorrência no meio ambiente e as suas relações com os outros microrganismos (Madigan *et al.* 2002).

Em relação às necessidades energéticas do grupo das diazotróficas, é requerida uma fonte exógena de energia: as autotróficas utilizam a luz ou a oxidação de um ou mais elementos orgânicos (p. ex., o género *Nitrobacter* oxida nitritos a nitratos), enquanto as heterotróficas oxidam ou dissimilam compostos de carbono reduzidos. Existem ainda algumas bactérias capazes de fazer ambos, de acordo com a disponibilidade do meio. Os principais elementos utilizados para a síntese da parede celular são o carbono, o azoto e o enxofre. As bactérias autotróficas utilizam o dióxido de carbono como fonte de carbono, enquanto as heterotróficas usam compostos orgânicos de carbono. As bactérias fixadoras de azoto e as sulfúricas assimilam, respectivamente, azoto e enxofre na forma elementar, ao passo que a maior parte das bactérias obtém estes três elementos de fontes exógenas. O carbono pode funcionar simultaneamente como fonte de energia e carbono para a função e estrutura celular. As bactérias dos géneros *Azotobacter* e *Rhizobium* (quando em simbiose) conseguem assimilar azoto elementar, enquanto as outras não. Desta forma, é necessário adicionar uma fonte de azoto como, por exemplo, a peptona, ao meio de cultura, sendo que há espécies que necessitam de elementos essenciais específicos, como iões minerais, metais, aminoácidos, vitaminas e outros factores de crescimento orgânicos ou inorgânicos (Cole e Gherna, 1994).

Tendo em conta os factores necessários ao desenvolvimento de cada organismo ou conjunto de organismos (nutricionais, térmicos, oxigenação, entre outros), é possível isolá-los em cultura, fornecendo-lhes as condições ideais de crescimento. Seguidamente, a sua identificação é efectuada através da observação macroscópica e microscópica e vários testes bioquímicos.

Um meio de enriquecimento é aquele que promove o crescimento de um determinado microrganismo ou grupo de microrganismos de uma comunidade mista através da inibição do crescimento de outros ou da adição de elementos que favorecem organismos com determinados requerimentos. As bactérias fixadoras de azoto, por exemplo, requerem meios específicos (anexo I). Como já foi referido, a ausência/presença de oxigénio é fundamental para as bactérias diazotróficas. As

espécies do género *Azospirillum* são microaerofílicas obrigatórias, enquanto fixadoras de azoto, ao passo que as pertencentes ao género *Azotobacter* possuem mecanismos de protecção da nitrogenase, conseguindo por isso fixar azoto em aerobiose. Desta forma, as condições de oxigénio fornecidas à cultura bacteriana influenciam as funções das bactérias, bem como o crescimento de determinadas espécies. Para seleccionar as bactérias do género *Azotobacter*, os meios de cultura contêm manitol como fonte de carbono e ausência de uma fonte de azoto, uma vez que muito poucos microrganismos conseguem metabolizar e crescer nestas condições. Os organismos fixadores de azoto utilizam fontes de carbono pouco comuns (Tabela 1.4.1), pelo que podem ser facilmente seleccionados (Holt e Krieg, 1994).

Tabela 1.4.1 – Fontes de carbono pouco comuns utilizadas por fixadores de azoto livres (Holt e Krieg, 1994)

Espécie	Fonte de carbono
<i>Azotobacter vinelandii</i>	L-ramnose
	Etilenoglicol
	D-arabitol
	Eritritol
<i>Azotobacter beijerinckii</i>	L-tartarato
	O-hidroxibenzoato
	D-glucuronato
	D-galacturonato
<i>Azotobacter armeniacus</i>	Caprilato
<i>Azomonas</i> spp.	Benzoato
<i>Beijerinckia indica</i>	Citrato
<i>Beijerinckia mobilis</i>	Fumarato
	Benzoato
<i>Derxia gummosa</i>	Metano
	Metanol

A descrição da diversidade da população diazotrófica pelos métodos culturais, quer devido à própria diversidade fisiológica deste grupo quer à difícil recuperação de muitos deles em cultura torna-se uma tarefa com algumas limitações, nomeadamente quando se quer realizar a caracterização de comunidades bacterianas de uma série de amostras de solo num período de tempo relativamente curto.

Para ultrapassar estas dificuldades, actualmente têm sido desenvolvidos e aplicados outros métodos não dependentes de cultura, como a análise dos ácidos gordos fosfolipídicos (Bai *et al.* 2000; Bossio *et al.* 1998), a análise dos ácidos nucleicos e a sua expressão no solo (revisão por Saleh-Lakha *et al.* 2005) e através de sondas como a técnica de hibridação *in situ* de fluorescência (FISH), (Herschkovitz *et al.*, 2005; Schallmach *et al.*, 2000), que são bastante mais rápidos e sensíveis, permitindo uma melhor caracterização das comunidades através das sequências de genes ou simplesmente o *fingerprint* de cada amostra.

1.4.1 - Métodos de obtenção de ácidos nucleicos a partir de amostras de solo

O passo crítico para o sucesso da abordagem molecular consiste na obtenção de ácidos nucleicos íntegros, livres de nucleases e inibidores da reacção da polimerase em cadeia (PCR).

A origem das enzimas do solo, que incluem entre muitas outras, nucleases, reside nos microrganismos em proliferação ou na degradação dos animais e plantas após a morte. Estas enzimas são geralmente mais resistentes aos inibidores do que as enzimas estudadas *in vitro*, sendo libertadas e adsorvidas pelas partículas de argila, mantendo a sua actividade e mesmo quando libertadas destes complexos pouca actividade perdem (Correia, 1986).

Por sua vez, na camada superficial do solo é comum existir húmus, um material amorfo, de composição variada, muito poroso, de baixa densidade, muito higroscópico e por isso varia de volume consoante o teor em água. Os colóides húmicos têm capacidade de permuta catiónica, e têm poder tamponizante. Há, portanto, uma certa semelhança entre as propriedades do húmus e as da argila. Pode haver também a formação de complexos argilo-húmicos tendo um núcleo constituído por minerais (partículas de argila) recobertas por materiais húmicos (Correia, 1986). Estes complexos de matéria orgânica contêm inibidores da reacção de PCR, que não são facilmente separados durante o processo de extracção de ácidos nucleicos (Chaudhuri *et al.*, 2006).

Para que ocorra lise celular do maior número de bactérias, incluindo aquelas com uma parede mais resistente, estão disponíveis vários métodos, divididos em distintas categorias. Existem métodos de lise mecânica, através de (1) compressão com um cilindro ("*French pressure cell*"), (2) ultrasons, (3) desintegração balística (através da adição de esferas de vidro), (4) maceração com limalhas de alumínio num almofariz, (5) choque térmico combinado com maceração (bastante usado por libertar DNA de

elevado peso molecular); lise química, com (1) detergentes iônicos (SDS) ou não iônicos (Triton X, Tween), (2) sais biliares (colato de sódio, desoxicolato, taurocolato), apenas eficazes em algumas arqueobactérias e eubactérias, (3) DTT (ditiotreitól), para algumas bactérias metanogénicas, em determinadas condições; lise osmótica, com água destilada, como para algumas bactérias que necessitam de elevadas concentrações de sais (p. ex., do género *Halobacterium*) e lise enzimática, sendo mais utilizada a lisozima (Sprott *et al.*, 1994). Um método eficaz será aquele que combine alguns tipos de lise distintos, de forma a cobrir um leque abrangente de formas de quebrar paredes celulares com propriedades diferentes.

1.4.2 – A técnica de PCR e polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP)

A aplicação da clonagem e polimorfismos de fragmentos de restrição em ecologia microbiana tem por base a amplificação de uma região de um determinado gene por PCR, a partir de DNA total extraído de amostras em estudo, mais propriamente é aplicada a técnica de PCR-RFLP. O resultado é uma mistura de fragmentos, a partir do genoma dos diferentes microrganismos presentes na amostra. Estes produtos são então clonados, para que exista uma separação e individualização de cada fragmento e, posteriormente, são seleccionadas colónias, cujo gene seleccionado anteriormente é de novo amplificado e sujeito a digestão com enzimas de restrição. De acordo com a sequência, os vários locais de restrição têm localizações e frequências diferentes, resultando, assim, em diferentes padrões de restrição (polimorfismos nos fragmentos de restrição). Cada padrão corresponde a uma espécie ou estirpe diferente, que será posteriormente identificada através da sequenciação do fragmento amplificado (Liu *et al.*, 2003).

1.4.3 – Electroforese em Gradiente Térmico (TGGE)

Outra forma de caracterizar uma comunidade microbiana consiste em efectuar a mesma amplificação inicial da amostra mista por PCR e separar os produtos da amplificação em géis de gradiente desnaturante químico (DGGE) ou térmico (TGGE), tendo como resultado um perfil de bandas cada uma das quais correspondendo a uma sequência/organismo diferente.

A electroforese convencional permite a separação de moléculas em função da sua massa molecular ou carga. O TGGE e o DGGE tiram partido de outro parâmetro, a cinética de desnaturação de uma molécula, que depende das estruturas primária,

secundária e terciária dessa mesma molécula. Estas técnicas permitem, assim, a separação de fragmentos com o mesmo tamanho e sequências diferentes num gel de acrilamida, ao qual é aplicado um gradiente térmico linear. A desnaturação dos fragmentos de DNA processa-se em domínios de desnaturação, que correspondem a zonas da molécula com a mesma temperatura de desnaturação. Quando num dado ponto do gel é atingida a temperatura de desnaturação do domínio com a temperatura mais baixa, ocorre a transição da forma helicoidal da molécula de DNA para uma forma semi-desnaturada. Neste ponto, a migração é retardada, sendo quase nula. Diferenças nas sequências dos diferentes fragmentos de DNA traduzem-se na sua paragem em diferentes posições no gel, o que permite a sua separação (Meyers *et al.*, 1985; Riesner *et al.*, 1991).

Por se ter revelado uma técnica potente, o TGGE tem vindo a ser bastante utilizado em estudos de diferente natureza, como ecologia microbiana e monitorização de processos industriais de base microbiana (Muyzer e Smalla, 1998; Manzano *et al.*, 2005).

Jones e Ties (2007) desenvolveram um método aparentemente ainda mais eficaz do que o DGGE, o T-RFLP (RFLP da zona terminal) ou a análise automatizada das sequências dos espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal (ITS), que consiste na aplicação da electroforese em gel bidimensional de poliacrilamida (2D-PAGE) de DNA genómico amplificado e digerido ao estudo de comunidades microbianas ambientais. Foi possível separar as sequências espaçadoras internas transcritas em centenas de unidades taxonómicas operacionais (OTUs) no gel 2D-PAGE, obtendo um maior número de manchas que pelos outros métodos e padrões distintos entre comunidades. Estes padrões têm correspondência com os obtidos pelos outros métodos, mas a sequenciação das manchas deu origem a uma diversidade bacteriana muito maior. Esta ferramenta terá, então, grande utilidade na detecção de diferenças entre comunidades muito semelhantes, evitando também a co-migração de sequências similares, como por vezes acontece nos métodos de *fingerprinting*.

1.4.4 – Estudos de filogenia com genes estruturais *versus* genes funcionais

Os genes mais usados para estudos de diversidade são os que codificam a subunidade 16S de RNA ribossomal, com *primers* universais, capazes de amplificar potencialmente este gene de todos os organismos presentes na amostra (Stevenson, *et*

al., 2004; Dhillon *et al.*, 2003). Esta abordagem é bastante útil na caracterização geral de populações, devido às inter-relações que se estabelecem nas comunidades. Por outro lado, o controlo e manipulação de processos no solo e outros ambientes requerem informações acerca de populações específicas. Desta forma, tem havido um interesse crescente em genes e transcritos de enzimas metabólicas (Sharma *et al.*, 2007). Assim, podem também ser definidos *primers* para um grupo fisiológico específico como, por exemplo, bactérias capazes de fixar o azoto atmosférico. Neste caso, trata-se de um gene funcional, o *nifH*, que tem como vantagem ser específico para a população que se pretende estudar, favorecendo a sua detecção, mesmo que não sejam os organismos mais abundantes nas amostras. Dhillon *et al.* (2003), verificaram que os *primers* direccionados para o 16S ribossomal, por serem tão gerais, não permitiram a detecção de um novo grupo de procariotas redutores de sulfato, tendo este sido revelado com um par de *primers* específicos para o gene *dsr* (dissimilatory sulfite reductase).

Existem também alguns estudos com *primers* definidos para o gene *rpoB*, que codifica para a subunidade beta da RNA polimerase. Esta estratégia tem sido utilizada na tentativa de eliminar alguns problemas associados à existência de cópias múltiplas dos genes de RNA ribossomal, que levam à identificação de vários ribotipos do mesmo indivíduo, uma vez que no genoma dos procariotas o gene *rpoB* é de cópia simples (Dahllof *et al.*, 2000; Peixoto *et al.*, 2002).

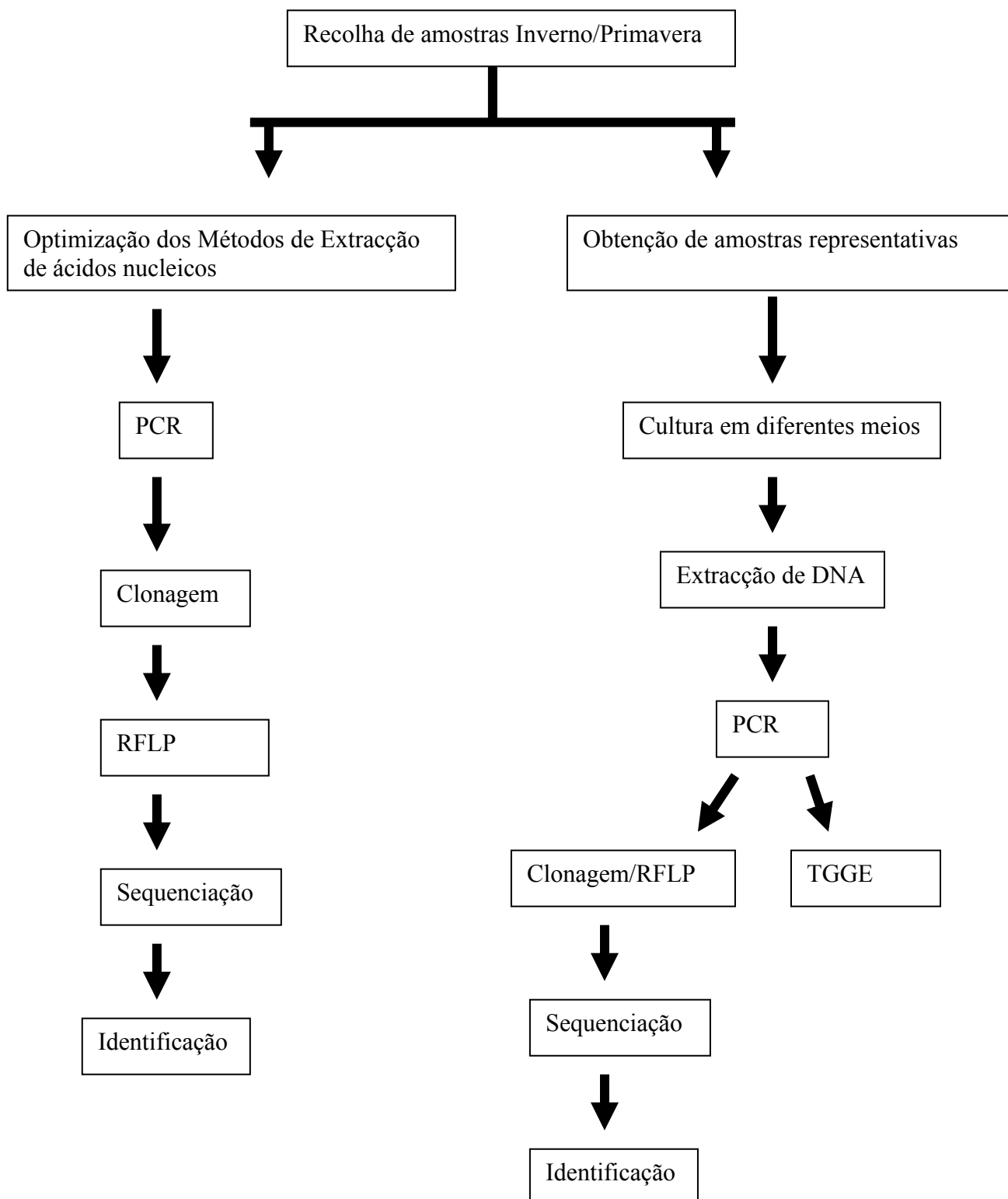
1.5 – Objectivos

Este estudo teve como objectivo principal a avaliação do impacto das práticas de manuseamento de solos em regime de exploração biológica sobre a população microbiana diazotrófica através de métodos mais expeditos, como os de biologia molecular.

Uma vez que a obtenção de ácidos nucleicos de qualidade a partir de solo é de extrema dificuldade, a primeira meta consistiu na optimização da extracção de DNA a partir das amostras de solo recolhidas em olivais sob agricultura biológica e em solos sob agricultura tradicional que foram considerados como controlo.

Após a obtenção dos ácidos nucleicos, pretendeu-se caracterizar a diversidade da comunidade microbiana com especial destaque para a comunidade diazotrófica, avaliando também a especificidade e o valor filogenético dos *primers* e dos genes seleccionados para o efeito.

FLUXOGRAMA



2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Recolha das amostras de solo e caracterização dos locais de amostragem

Foram recolhidas, com sondas metálicas, amostras de solo de olivais sob agricultura biológica no sudeste de Portugal em Amareleja, Serpa e Santa Iria, juntamente com amostras-controlo de solo mobilizado adjacente aos olivais (Figura 1, anexo II). A recolha decorreu durante dois períodos: Inverno (Dezembro de 2006) e Primavera (Abril de 2007), tendo sido recolhidas amostras dos primeiros 25cm da camada de terreno e, para as amostras de Amareleja, foram ainda efectuadas recolhas de solo de 25-50cm de profundidade (tabela I, anexo II). Para as amostras de Amareleja, simultaneamente, foram colectadas amostras de solo para análises físico-químicas, ao passo que para as outras duas localidades já haviam sido efectuadas amostragens para esse efeito num período anterior. Os dados físico-químicos apresentados na tabela II do anexo II são relativos a amostras representativas dos terrenos. Não foram recolhidos dados físico-químicos do controlo de Serpa.

No âmbito do projecto AGRO 802, em 2005, os terrenos em estudo foram semeados com plantas inoculadas com misturas comerciais de bactérias fixadoras de azoto. No olival de Amareleja foi introduzida uma cobertura vegetal anual constituída pelas leguminosas tremocilha (*Lupinus luteus*), serradela (*Ornithopus sativus*) e trevo (*Trifolium incarnatum*) e uma cobertura vegetal de crescimento lento (permanente) composta por leguminosas (*Trifolium subterraneum*, *T. vesiculosum*, *T. incarnatum*, *T. resupinatum*, *T. balansae*, *Biserrula pelecinus*, *Ornithopus sativus* e *O. compressus*) e gramíneas (*Lolium multiflorum*). Em Serpa foi semeada uma cobertura vegetal de crescimento lento (permanente), constituída por leguminosas, como trevos (*Trifolium subterraneum*, *T. resupinatum* e *T. hirtum*) e luzernas (*Medicago truncatula*, *M. polymorpha*, *M. scutellata* e *M. rugosa*) e gramíneas (*Lolium perenne* e *Dactylis glomerata*). Em Santa Iria foram semeadas essencialmente luzernas (*Medicago polymorpha*) e trevos (*Melilotus sp.*, *Trifolium resupinatum* e *T. balansae*).

No período de Inverno (de 2006) no olival de Amareleja foi registada a presença de certas leguminosas, tais como tremocilha (*Lupinus sp.*) e ervilhaca (*Vicia sativa*) e algumas gramíneas. Nesta localidade foram recolhidas amostras de três locais. O local de amostragem 1 encontra-se num terreno com ligeira inclinação, sendo exposto a Sul. O local de amostragem 2, adjacente ao local 1, tem uma inclinação contrária, ficando exposto a Norte. Ainda neste local de amostragem, foi recolhida uma amostra numa

vertente exposta a Este. Como controlo, foram recolhidas amostras de solo de um terreno de agricultura tradicional ao lado do local 1, separados por uma passagem. O olival de Serpa, onde foi estabelecido um local de amostragem, apresentava bastantes trevos (*Trifolium* sp.) distribuídos por todo o terreno, plano e de aspecto homogéneo. Não se verificou a presença de gramíneas. Em contraste, o campo adjacente, do qual foram recolhidas as amostras controlo, encontrava-se coberto essencialmente por gramíneas. O solo de Santa Iria, onde foram definidos dois locais de amostragem de solo sob agricultura biológica e um controlo, exibia uma vegetação variada espontânea e introduzida, com a presença de algumas leguminosas. Na Primavera o solo do olival biológico de Amareleja encontrava-se totalmente preenchido por um denso coberto vegetal espontâneo, com muitas gramíneas, como aveia (*Avena fatua*) e outras espécies, como a soagem (*Echium plantagineum*) tendo, portanto, havido perda da sementeira. Em Serpa houve a aplicação de herbicida e em Santa Iria as plantas já se encontravam muito secas na altura da recolha das amostras no período de Primavera, pelo que foi impossível a sua identificação (Figura 1, anexo II). Em cada local de amostragem foram recolhidas cinco réplicas e nos controlos duas.

As amostras recolhidas foram colocadas em sacos plásticos devidamente identificados, transportadas numa mala térmica e armazenadas a -20°C. As réplicas de cada local foram homogeneizadas, de forma a obter amostras representativas.

2.2 – Extracção simultânea de DNA e RNA

Para a extracção de ácidos nucleicos a partir de amostras de solo, foi escolhido o método descrito por Hurt *et al.* (2001), que permite a extracção simultânea de DNA e RNA e posteriormente foi modificado. Note-se que todas as soluções utilizadas neste trabalho se encontram descritas em detalhe no anexo III.

Deste modo, de acordo com o método referido acima, pesou-se 1g de solo de cada amostra para um tubo de 15 ml, adicionou-se 1 ml de etanol a 96%, homogeneizou-se no vórtex (L46, Labinco) e centrifugou-se a 4332xg (Megafuge 1.0R, Heraeus Instruments), durante 5 min, a 4°C. O sobrenadante foi eliminado. Seguidamente, adicionou-se 1 ml de solução desnaturante (4M de isotiocianato de guanidina, 10 mM de Tris-HCl a pH7, 1mM de EDTA e 0,5% (v/v) de 2-mercaptoetanol), homogeneizou-se no vórtex, colocaram-se os tubos em azoto líquido durante 2 min. e em seguida em banho-maria (BTG, Bunsen), a 42°C, durante 5 min. Este procedimento foi repetido por duas vezes. Posteriormente, adicionaram-se 2ml de

tampão de extracção (10 mM de fosfato de sódio a pH7, 100 mM de Tris-HCl a pH7, 100mM de EDTA a pH8, 1.5M de NaCl, 1% (p/v) de CTAB e 2% (p/v) de SDS) e incubaram-se os tubos a 65°C, durante 30 min, com ligeira agitação manual de 10 em 10 min. Procedeu-se à centrifugação dos tubos a 1800xg, durante 10 min, a 4°C e transferiram-se os sobrenadantes para novos tubos de 15ml pré-arrefecidos em gelo, contendo 6 ml de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) (v/v). O conteúdo foi homogeneizado e centrifugou-se a 1800xg, durante 20 min, a 4°C. As fases aquosas (fase superior) foram transferidas, cuidadosamente, para tubos de 1.5 ml (aproximadamente 700 µl de sobrenadante por cada tubo) e o DNA foi precipitado com 0.6 volumes de isopropanol previamente arrefecido a -20°C. Para uma maior eficácia da precipitação, esta foi efectuada durante a noite, a -20°C. A solução foi seguidamente centrifugada a 16 000xg (Mikro 22R, Hettich Zentrifugen), durante 20 min, a 4°C. O sobrenadante foi eliminado e os *pellets* secos com posterior ressuspensão em 40 µl de água estéril livre de DNases (Sigma). As amostras obtidas foram distridas em alíquotas e armazenadas a -80°C, para protecção do RNA contra a acção das RNases, que são ubíquas e bastante activas (Gause e Adamovicz, 1995).

Os produtos da extracção (DNA e RNA) foram visualizados num transiluminador sobre luz UV (Uvitec), em gel de agarose 1%, corado com SYBRGreen DNA Safe (Invitrogen), em tampão TAE 1x, sujeito a uma corrente contínua de 120V, durante 35 min. Para esta visualização foram colocados nos poços do gel 5µl de cada amostra, misturados com 2µl de tampão de aplicação, tendo sido colocado um marcador de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) no primeiro poço.

Para otimizar as condições de PCR e verificar o bom funcionamento da reacção, foi utilizado como controlo positivo o DNA das bactérias *Rhizobium leguminosarum* DSM N 30132 e *Azotobacter vinelandii* DSM N 2289 (da colecção Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ).

As bactérias liofilizadas foram recuperadas em 1ml de soluto de Ringer (Biokar Diagnostics) e posteriormente inoculados 250µl em meio específico para *Azotobacter* (composição descrita no anexo III) ou manitol-levedura (composição descrita no anexo III), para o caso da bactéria *Rhizobium leguminosarum*.

É importante referir que as culturas acima mencionadas após a sua recuperação foram sujeitas a testes de identificação como:

a) Coloração de Gram

A coloração de Gram é uma técnica diferencial bastante importante. Resumidamente, as células foram coradas com violeta cristal (Merck) e foi adicionada uma solução mordente de lugol (Merck). Seguidamente, as células foram lavadas com etanol. As bactérias denominadas Gram-positivas retêm o corante, ao passo que as Gram-negativas não. Isto deve-se ao facto de existirem diferenças na arquitectura da parede celular, principalmente ao nível da camada de peptidoglicano. O violeta cristal penetra nas células bacterianas mas, ligado ao lugol, apenas consegue sair através das células Gram-negativas, que possuem uma parede mais simples e frágil, ficando retido nas Gram-negativas, que adquirem a cor do corante. Para uma melhor visualização das bactérias Gram-negativas, foi adicionado um corante de contraste, a safranina (Merck), pelo que estas apresentam uma coloração rosada (Murray *et al.*, 1994).

b)Actividade da catalase

Para avaliar a actividade da catalase (enzima que converte o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio) utilizou-se um método bastante simples, que consistiu em transferir, com um objecto não metálico, como uma zaragatoa, uma porção de uma cultura e colocá-la sobre uma lâmina de vidro. Seguidamente, colocou-se uma gota de peróxido de hidrogénio a 3% (Salvitas) sobre as bactérias. Observou-se, a olho nu e ao microscópio, a libertação ou não de oxigénio (Simbert & Krieg, 1994).

c)Actividade da oxidase

Para avaliar a actividade da oxidase (grupo de enzimas que oxidam diversos substratos, tendo como aceitador de electrões o oxigénio) colocou-se (na *hotte*) numa caixa de petri um filtro de 0.2µm (Pall), que se impregnou com 0.5ml de uma solução a 1% (em DMSO (Sigma)) de tetrametil-p-fenilenediamina (Merck). Seguidamente, retirou-se uma porção da cultura com uma zaragatoa e passou-se várias vezes pelo filtro. Observou-se a formação ou não de uma coloração azul-roxa na zaragatoa (Simbert & Krieg, 1994).

d) Fluorescência

A bactéria *Azotobacter vinelandii* produz um péptido amarelo esverdeado fluorescente (o-dihidroxi quinolina) que foi descrito pela primeira vez em 1962 (Bulen e LeComte, 1962) e que pode ser utilizado no processo de identificação.

Para a verificação desta característica uma placa com o crescimento de *Azotobacter vinelandii* DSM N 2289 foi exposta à luz UV e foi verificada, por observação directa (com o respectivo material de protecção), a emissão de fluorescência por parte da cultura.

A extracção do DNA das bactérias *Rhizobium leguminosarum* DSM N 30132 e *Azotobacter vinelandii* DSM N 2289 foi realizada através do método Guanidina, EDTA e Sarcosil (GES) que se passa a descrever.

2.3 – Extracção de DNA pelo método Guanidina, EDTA e Sarcosil (GES)

Uma vez que as bactérias seleccionadas como controlos positivos se encontravam sob a forma de culturas puras e sem contaminantes, não foi necessário usar um protocolo de extracção tão complexo e moroso como o descrito em 2.2 para extracção de ácidos nucleicos das bactérias do solo. Deste modo, o método seleccionado foi o descrito por Pitcher *et al.*, (1989).

O procedimento inicia-se com a suspensão de uma ansada de cultura em 100µl de tampão de lise (composição descrita no anexo III) suplementado com 25µl de lisozima (100mg/ml) (Sigma). Deixou-se repousar durante 45 min a 35°C. Adicionaram-se 500µl de tampão GES (composição descrita no anexo III), agitou-se no vórtex e colocou-se no gelo durante 5 min, após os quais se adicionaram 250µl de acetato de amónia 10M, homogeneizou-se e permaneceu em gelo durante 10 min. Decorrido este tempo, foram adicionados 500µl de uma solução clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). De seguida misturou-se por inversão e procedeu-se à centrifugação a 18 890xg rpm durante 10 min., a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi recolhido e transferido para um novo tubo ao qual foi adicionado metade do volume em isopropanol frio (Sigma, Madrid, Espanha). Procedeu-se à homogeneização e realizou-se uma nova centrifugação (18 890xg, 4°C, 1 min.). O DNA precipitado foi lavado com 800 µl de etanol frio a 70% por três vezes. Após as lavagens o DNA obtido foi seco ao ar. Após a evaporação de todo o etanol, ressuspendeu-se o DNA obtido em 35 µl de água isenta de DNases (Sigma, Madrid, Espanha).

2.4 – Purificação de DNA e RNA das amostras

O DNA e o RNA foram sucessivamente purificados com o kit All Prep DNA/RNA (Quiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, a amostra resultante do procedimento anterior foi colocada na coluna de purificação de DNA e centrifugada. Guardou-se a coluna para mais tarde se proceder à recuperação do DNA e prosseguiu-se com a purificação do RNA contido na amostra que passou pela coluna após a centrifugação. A coluna foi lavada várias vezes e o RNA eluído em água estéril (Sigma). Procedeu-se da mesma forma para purificar o DNA, com as soluções adequadas do kit. Novamente, as amostras de DNA foram sujeitas a electroforese, como descrito acima. A electroforese para a visualização do RNA foi realizada num gel desnaturante de formaldeído. Para tal, para cada amostra, juntaram-se 5µl de amostra de RNA com 17µl de tampão de amostra (18% de formaldeído, 59% de formamida e MOPS1x) e incubou-se a 65°C durante 5min., para desnaturar o RNA. Seguidamente, colocou-se em gelo durante 2min., adicionaram-se 2µl de tampão de aplicação e transferiram-se para cada poço do gel 10µl de cada amostra, que foi sujeito a uma corrente contínua de 120V, durante 35 min (Sambrook *et al.*, 1989).

2.5 – Quantificação dos ácidos nucleicos

Para quantificar os ácidos nucleicos, fez-se uma diluição das amostras de 1:100 em água MilliQ e utilizou-se o espectrofotómetro (Ultrospec 1100 Pro, Amersham Biosciences) que, além das concentrações de RNA de DNA, fornece o valor das razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} , úteis para verificar a contaminação com proteínas e inibidores do PCR típicos do solo, respectivamente. Os valores recomendados para a razão A_{260}/A_{280} são entre 1.8 e 2 (Sambrook *et al.*, 1989) e para a razão A_{260}/A_{230} são acima de 2 (Chaudhuri, *et al.*, 2006).

A qualidade do DNA extraído foi ainda avaliada por electroforese em gel de agarose (1% p/v).

2.6– Reacção de amplificação por reacção em cadeia da Polimerase (PCR)

A reacção em cadeia da polimerase (PCR) é actualmente o método mais sensível e expedito na detecção de DNA. De forma geral, o PCR processa-se em quatro etapas distintas: inicia-se com uma desnaturação inicial prolongada, a 94°C e, seguidamente, de forma cíclica, há uma desnaturação, a 94°C, seguida da ligação dos *primers* ao DNA de interesse, a uma temperatura óptima, definida com um gradiente de temperatura e,

finalmente, um passo de extensão do fragmento de interesse entre os dois *primers*, a 72°C (tabela 2.6.2.2). A quantidade de produtos de PCR vai aumentando de forma exponencial a cada ciclo (Cha e Thilly, 1995).

2.6.1 – Os *primers*

Para este trabalho, foram utilizados *primers* universais direccionados para a subunidade 16S ribossomal de bactérias, o que permite a caracterização da comunidade bacteriana presente em cada amostra. Seguidamente, uma vez que o principal objectivo é a identificação da comunidade diazotrófica, foram usados *primers* universais, direccionados para o gene *nifH* e, de forma ainda mais específica, foram utilizados *primers* para o gene *nifH* dos géneros *Azotobacter* e *Rhizobium*, conforme se pode observar na tabela 2.6.1.1.

O par de *primers* para o 16S ribossomal (8F e 1492R) amplifica um produto de 1600pb. O par de *primers* específico para o *nifH* de *Azotobacter* (nifHg1Fw e nifHg1Rv) amplifica um produto de 372 pb. Para a execução da técnica TGGE, descrita no ponto 2.15, foi adicionada uma *clamp* GC à extremidade 5' do *primer* a montante, conferindo assim um domínio de difícil desnaturação, necessário à realização da técnica. Este par de *primers* (nifHg1FwGC e nifHg1Rv) amplifica um produto de 412 pb. Para a amplificação do gene *nifH* de *Rhizobium* ou *nifH* em geral, foram efectuados PCRs *nested*, ou seja, dois PCRs consecutivos, sendo que no segundo é utilizado o produto do primeiro. Para o gene *nifH* de *Rhizobium*, para a primeira reacção, foi utilizado o par nifHa1A e nifHa1Rv, cujo produto tem 461pb e para a segunda reacção foi utilizado o par nifHa1B e nifHa1Rv, cujo produto tem 367pb. Para a primeira reacção de amplificação do gene *nifH* em geral foi utilizado o par nifHUnivA e nifHUnivRv e, na segunda reacção, o par nifHUnivB e nifHUnivRv, que amplificam produtos de 464 e 372 pb, respectivamente.

Tabela 2.6.1.1 – Primers utilizados para a caracterização da comunidade microbiana presente em cada amostra de solo

Primer	Abreviatura	Sequência	Referência	Gene
8F	16S	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	Dhillon <i>et al.</i> (2003)	16S (universal)
1492R		5'-GGTACCTTGTACGACTT-3'		
nifHg1Fw	g1	5'-GGTTGTGACCCGAAAGCTGA-	Burgmann <i>et al.</i> (2004)	<i>nifH</i> (<i>Azotobacter</i>)
nifHg1FwGC	g1GC	5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCA CGGGGGGGTGTGACCCGAAAGCTGA - 3'		
nifHg1Rv	-	3'5'-GCGTACATGGCCATCATCTC-3'		
nifHUnivA	UA1	5'-GC5*(AT)T5TA(CT)GG(AGCT)AA(AG)GG(AGCT)GG-3'	Widmer <i>et al.</i> (1999)	<i>nifH</i> (universal)
nifHUnivB	UA2	5'-GG5TG(CT)GA(CT)CC(AGCT)AA(AGC)GC(AGCT)GA-3'		
nifHUnivRv	-	5'-GC(AG)TA5A(GCT)(AGCT)(GCC)ATCAT(CT)TC-3'		
nifHa1A	a1A	5'-GC(AG)TT(CT)TACGG(CT)AA(AG)GG(GC)GG-3'	Burgmann <i>Et al.</i> (2004)	<i>nifH</i> (<i>Rhizobium</i>)
nifHa1B	a1B	5'-GG(AC)TGCGA(CT)CC(GC)AA(AG)GC(GC)GA-3'		
nifHa1Rv	-	5'-GCATAGAGCGCCATCATCTC-3'		

5* - modificação com inosina

2.6.2 – Optimização das reacções de PCR

Antes de executar os PCRs com as amostras de solo, foi necessário um passo de optimização das condições de temperatura óptima de emparelhamento dos *primers*, bem como alguns ajustes nas concentrações dos reagentes. Para tal, as reacções foram optimizadas utilizando DNA dos controlos positivos correspondentes a cada conjunto de *primers*, extraído pelo método GES. Esta optimização foi efectuada num termociclador de gradiente térmico (TGradient, Biometra), em que para cada par de primers são testadas simultaneamente doze temperaturas diferentes, cuja amplitude é escolhida em função da temperatura de emparelhamento teórica individual de cada *primer*. Assim, todos os tubos de PCR têm exactamente o mesmo conteúdo, submetido a diferentes condições térmicas.

De forma geral, cada reacção de PCR foi efectuada para um volume total de 50µl, contendo 5µl de cloreto de magnésio (Promega) a 25mM, 5µl de tampão da Taq 5x (Promega), 1µl de dNTPs (Promega) a 10mM cada um, 1µl de cada *primer* (eurofins MWG GmbH) a 10mM, 35.75µl de água MilliQ estéril e 0.25µl de GoTaq®DNA polimerase (Promega) (tabela 2.6.2.1).

Para evitar variações e erros associados a pipetagens, efectuou-se a mistura de todos estes reagentes correspondentes ao número de amostras a usar no PCR e distribuíram-se 49µl desta mistura por cada tubo de PCR, numa câmara de fluxo laminar apropriada à preparação de reacções de PCR (Mini-V/PCR, Telstar). Adicionou-se posteriormente a cada tubo de reacção 1µl de DNA.

Após a definição das temperaturas óptimas de emparelhamento para cada par de *primers*, foram efectuadas as respectivas reacções de PCR para as amostras de solo. Em cada série de reacções foi incluído um controlo positivo (DNA de *Rhizobium leguminosarum* DSM N 30132 ou de *Azotobacter vinelandii* DSM N 2289), bem como um controlo negativo (DNA de *E. coli*). As condições para cada PCR encontram-se descritas na tabela 2.6.2.2. Os produtos de PCR foram sujeitos a electroforese e visualizados no transiluminador, conforme já descrito. Note-se que, devido à contaminação com inibidores da reacção de PCR, nas diferentes amostras foi necessário recorrer a diluições do DNA de 1:25, 1:50 ou 1:75, como sugerido por Chaudhuri *et al.* (2006).

Tabela 2.6.2.1 – Composição de cada reacção de amplificação

Par de primers	16S	g1	g1GC	a1A	a1B	UA1	UA2
Concentração primer (pmol/μl)	0.2	0.2	0.2	1	0.2	0.2	0.2
Concentração MgCl ₂ (mM)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Concentração Tampão da Taq	0.5x	0.5x	0.5x	1x	0.5x	0.5x	0.5x
Concentração dNTPs	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Concentração Taq DNA Polimerase	0,025U	0,025U	0,025U	0,025U	0,025U	0,025U	0,025U

Tabela 2.6.2.2 – Condições das reacções de amplificação por PCR

Par de primers	16S	g1	g1GC	a1A	a1B	UA1	UA2
Desnaturação inicial	94°C, 2 min.	94°C, 3 min.	94°C, 3 min.	94°C, 3 min.	94°C, 3 min.	94°C, 3 min.	94°C, 3 min.
Desnaturação	94°C, 1 min.	94°C, 1 min.	94°C, 1 min.	94°C, 1 min.	94°C, 1 min.	94°C, 1 min.	94°C, 1 min.
Emparelhamento	39.0°C, 1 min.	58°C, 1 min.	65.8°C, 1 min.	55.9°C, 1 min.	60°C, 1 min.	54.4°C, 1 min.	62.0°C, 1 min.
Extensão	72°C, 90s	72°C, 25s	72°C, 30s	72°C, 30s	72°C, 25s	72°C, 30s	72°C, 25s
Extensão final*	72°C, 5 min.	72°C, 5 min.	72°C, 5 min.	72°C, 5 min.	72°C, 5 min.	72°C, 5 min.	72°C, 5 min.

* Esta extensão final foi realizada quando o objectivo da reacção foi obter produtos de PCR para a ligação em gGem-T easy.

2.7 – Purificação dos produtos de PCR

Uma vez otimizados os PCRs e amplificadas todas as amostras necessárias, para os genes em estudo, foi necessário proceder à purificação dos produtos de PCR, para posterior clonagem.

Os produtos de PCR foram purificados com o Jetquick PCR Product Purification Spin Kit (Genomed), acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, foi adicionada uma solução de ligação à coluna ao produto de PCR. Posteriormente, coluna foi lavada e o DNA eluído em água MilliQ estéril.

2.8 – Purificação de bandas a partir do gel de agarose

Em alguns casos, quando apresentavam bandas inespecíficas, os produtos de PCR foram purificados partir do gel, procedendo-se primeiramente à excisão da banda específica e posterior purificação. As bandas do gel de agarose 1% (p/v) foram cortadas com uma lâmina de bisturi, sobre luz UV, e purificadas com o Jetquick Gel Extraction Spin Kit (Genomed), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, a agarose foi solubilizada a 50°C, a coluna foi lavada e o DNA purificado foi eluído em água MilliQ estéril.

2.9 – Clonagem

2.9.1 – Preparação de células competentes para transformação

Ao final da tarde, plaquearam-se 100 µl do *stock* de bactérias *E. coli* DH5-α em placa de LB com agar e incubou-se durante a noite a 37°C (16-20h). Guardaram-se a placas no frigorífico até ao passo seguinte.

Uma ansada de cultura de *E. coli* DH5-α foi transfeirida para 10ml de LB líquido e incubou-se durante anoite a 37°C (16-20h) com agitação (150 rpm).

Retirou-se 1 ml dessa cultura pura, inoculou-se em em 100 ml de meio LB líquido e em seguida permitiu-se o crescimento a 37°C e com agitação, até a cultura atingir uma DO (600nm) de 0,5. Dividiu-se a cultura em 2 tubos de 50 ml e centrifugou-se a 3500xg, durante 5 min., a 4°C. Ressuspendeu-se o pellet em 1/10 do volume inicial de tampão de cloreto de cálcio (15% de glicerol, 5mM de Tris-HCl a pH 7.5, 5mM de cloreto de magnésio e 100mM de cloreto de cálcio) (~5ml) pré-arrefecido em gelo, seguido de incubação em gelo por 5 min. Posteriormente procedeu-se à centrifugação, de acordo com as condições referidas acima. Ressuspendeu-se de novo em tampão de cloreto de cálcio em 1/25 do volume inicial (~2ml), deixando a incubar por 20 min. em

gelo. Pipetaram-se alíquotas de 100µl para tubos de 1,5 ml previamente arrefecidos a -20°C. As alíquotas foram rapidamente introduzidas em azoto líquido e seguidamente conservadas, a uma temperatura de -80°C.

Após uma permanência de 24h a -80°C, as culturas foram sujeitas a verificação da pureza e teste de recuperação. Para isso foram plaqueadas duas alíquotas de células competentes, uma em meio LB e outra em LB suplementado com ampicilina (cf = 100µg/ml) (Sigma).

2.9.2 – Reacção de Ligação

Para a ligação da sequência alvo amplificada ao vector seleccionado (pGem-T easy), procedeu-se à preparação da mistura dos componentes: 1µl de tampão de ligação 10x (Promega), 1µl de pGem-T easy (50 ng/µl) (Promega), 1µl T4 ligase (3U/µl) (Promega), um volume não superior a 7µl de produto de PCR, de forma a ter aproximadamente 150ng de DNA e água MilliQ estéril, caso necessário, para perfazer um volume final de 10µl. A mistura foi homogeneizada e em seguida colocada a incubar a 4°C durante a noite. No início, deve também fazer-se um controlo negativo com água em vez da amostra e um controlo positivo utilizando uma amostra de DNA altamente compatível com o plasmídeo (fornecido pelo fabricante).

2.9.3 – Transformação das células competentes

A uma alíquota de 100µl de bactérias competentes juntaram-se 5µl da mistura da reacção de ligação. Em seguida, colocou-se a incubar durante 20 min. em gelo. Procedeu-se depois a um choque térmico a 42°C durante 1 min. em banho seco e colocou-se em gelo durante 2 min. Adicionaram-se 400µl de meio SOC mantido à Tamb. A incubação decorreu por 90 min. a 37°C com agitação (150 rpm). Cerca de 60 min. depois do início da incubação espalharam-se 60µl de X-Gal (Fermentas) a 20mg/ml (para uma concentração final de 80 µg/ml). No final do período de incubação plaquearam-se 100µl de células transformadas (em duplicado) em meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/ml) contendo X-Gal (80 µg/ml). As placas inoculadas foram colocadas a incubar a 37°C (Binder), durante 12-16h.

2.10 – PCR-colony

Foram seleccionadas cinco colónias brancas de cada amostra para confirmação da transformação, a realizar por PCR cuja versão é denominada de PCR *colony*. A

técnica baseia-se na preparação de uma suspensão que consiste em 5µl de tampão da Taq (Promega), 2,5µl de lisozima (10mg/ml, Sigma) e 42,5µl de água MilliQ estéril, à qual se adicionam as células de uma colónia a testar. A suspensão foi depois colocada a incubar a 37°C, durante 15 min., de modo a se processar a lise celular. Seguidamente, adicionaram-se 0,8-1µl de proteinase K (15mg/ml, Sigma) e incubou-se a 56°C durante 15 min. O processo termina com um tratamento térmico a 100°C, durante 2 min., para inactivação da proteinase K. Os tubos foram de seguida colocados em gelo durante 30s e um volume de cerca de e ~0,8µl foi utilizado na reacção de PCR conforme descrito no ponto 2.6.2. Os produtos da amplificação foram sujeitos a electroforese e observados sobre luz UV conforme descrito acima.

2.11 – Análise dos polimorfismos dos fragmentos de restrição dos produtos de PCR (RFLP)

A técnica de RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) baseia-se na hidrólise do DNA com enzimas de restrição e posterior separação, por electroforese, dos fragmentos obtidos pela digestão enzimática, que correspondem a padrões de restrição específicos. Estes padrões podem ser característicos quer ao nível da espécie quer ao nível da estirpe.

2.11.1 – Escolha das enzimas de restrição

Para a escolha apropriada das enzimas de restrição a ser utilizadas obteve-se, em primeiro lugar, a partir da a base de dados do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.org) uma sequência dos genes em estudo para as bactérias utilizadas como controlos positivos (sequência parcial do gene 16S ribossomal de *Azotobacter vinelandii* estirpe ISSDS-436 (EF620452), sequência parcial do gene 16S ribossomal de *Rhizobium leguminosarum* estirpe CCBAU 73064 (EU170565), sequência parcial do gene *nifH* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolado RP422 (DQ413015) e sequência parcial do gene *nifH* de *Azotobacter vinelandii* isolado ISSDS-428 (EF620496)) e fez-se uma digestão virtual (www.restrictionmapper.org), para seleccionar duas enzimas de corte muito frequente às quais correspondam vários locais de restrição na sequência que se pretende analisar, de forma a obter um número elevado de fragmentos. As enzimas seleccionadas foram a *HaeIII* e a *AluI*.

2.11.2 – Digestão enzimática

Para a digestão enzimática, por amostra, foram pipetados 2µl de tampão 10x (Promega), 0,2µl de BSA (Promega), 0,5µl de enzima de restrição (Promega), 1µg de produto de PCR-*colony*, até um volume máximo de 17,3µl e água MilliQ estéril, caso necessário, para perfazer um volume total de 20µl. A mistura foi homogeneizada e incubou-se a 37°C, durante 2h. Seguidamente, os produtos da digestão foram sujeitos a uma electroforese. Para isto, utilizaram-se 11µl de cada digestão com 2µl de tampão de aplicação em gel de agarose (2%, p/v) em TAE1x, a 120V, durante 40 min. Os produtos da digestão foram observados sobre luz UV. Após análise, foi escolhida uma amostra representante de cada perfil de RFLP, da qual foi extraído o DNA plasmídico para sequenciação.

2.12 – Extração do DNA plasmídico por lise alcalina

Para a obtenção do DNA plasmídico, primeiramente, transferiu-se uma colónia para 3ml de meio LB com ampicilina (100 µg/ml) e incubou-se durante a noite, a 37°C, com agitação (150rpm). Um volume de 1,5ml da suspensão foi depois colocado num tubo de 2ml e centrifugou-se a 16000xg, durante 5min., a 4°C. Os *pellets* obtidos foram ressuspenso em 200µl de tampão GTE (composição em anexo) e 10µl de RNaseA a 10mg/ml (USB). Após homogeneização, a mistura foi colocada a incubar à T_{amb.}, durante 10 min. Seguidamente adicionaram-se 400µl de uma solução de 0,2M NaOH/ 1% SDS preparada de fresco. Misturou-se por inversão e incubou-se durante 5min. em gelo. Adicionaram-se 300µl de acetato de sódio 3M, pH5,2, agitou-se vigorosamente e incubou-se no gelo durante 30min. Após este tempo, centrifugou-se a 12000 rpm, durante 15 min., a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 1ml de etanol 96% frio (mantido a -20°C), em seguida procedeu-se à homogeneização e as amostras foram centrifugadas por 15min., a 16000xg, a 4°C. O *pellet* foi lavado duas vezes com 500µl de etanol a 70%. O álcool remanescente foi eliminado por incubação à temperatura ambiente e em seguida a DNA plasmídico foi dissolvido em 50µl de água MilliQ estéril.

2.13 – Método de extração de ácidos nucleicos a partir amostras de solo, segundo o método utilizado por Miller *et al.* (1999)

Após algum tempo de armazenamento das amostras obtidas com o método descrito em 2.2, verificou-se a degradação do DNA e RNA. Para resolver este

problema, testaram-se outros métodos de extracção de DNA, nomeadamente o kit de extracção de DNA a partir de fezes (DNA Stool kit, Quiagen), o kit de extracção de DNA a partir de solo da Omega Biotek (E.Z.N.A. Soil DNA extraction Kit) e o método descrito por Miller *et al.* (1999), conforme se descreve em seguida.

Num tubo de 2ml colocaram-se 200mg de solo e 1ml de soluto de Ringer. Agitou-se vigorosamente, sendo a fase líquida transferida para novo tubo. Em seguida procedeu-se à centrifugação (16000xg, durante 5 min, a 4°C). Ao *pellet* obtido adicionaram-se 300µl de tampão de lise/ SDS (composição em anexo) e 300µl de tampão fosfato 100mM pH8. A amostra foi congelada em azoto líquido e depois mantida a 37°C durante 5 min. Este passo foi repetido por duas vezes. Seguidamente, adicionaram-se 300µl de clorofórmio/ álcool isoamílico (24:1) e procedeu-se à homogeneização por inversão. Em seguida foi feita uma centrifugação a 16000xg, durante 10 min., a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, ao qual se adicionou 1 volume de isopropanol. A incubação decorreu a -20°C por 20 min. e posteriormente foi feita nova centrifugação, nas mesmas condições. O *pellet* foi lavado com 500µl de etanol a 70% e após eliminação do excedente por incubação à temperatura ambiente foi ressuspensão em 30µl de água MilliQ estéril.

2.14 – Obtenção de culturas mistas a partir de amostras de solo

Os métodos de extracção de ácidos nucleicos testados, a partir directamente do solo, não se revelaram eficazes na obtenção de amostras íntegras de DNA e RNA ou sem inibidores da reacção de PCR, pelo que se procedeu à inoculação das diferentes amostras de solo em diferentes meios de modo a se recuperar a maior diversidade possível da comunidade microbiana presente.

Os meios seleccionados foram o meio PCA (Oxoid), um meio geral bastante rico, que permite o crescimento de uma grande diversidade de microrganismos e o meio manitol-levedura, específico para o crescimento de bactérias diazotróficas (Holt e Krieg, 1994).

De cada amostra foi preparada uma diluição de 10g de solo em 90ml soluto de Ringer (Biokar Diagnostics), que foi sujeita a forte agitação manual. A partir desta suspensão, foi efectada a sementeira nos meios de cultura seleccionados. A incubação decorreu durante a noite, a 30°C.

Os crescimentos microbianos foram recolhidos por lavagem com soluto de Ringer. Em seguida foi realizada uma centrifugação para a recolha das células a 2000xg

durante 10 min., a 4°C. Seguidamente, procedeu-se à extracção dos ácidos nucleicos com o método GES uma vez que, em cultura, já não existiam os contaminantes do solo. Após a extracção o DNA foi analisado em gel de agarose (1%, p/v) e a sua pureza foi verificada por espectrofotometria (como descrito acima, na secção 2.5). Em seguida procedeu-se à clonagem e análise de polimorfismos dos fragmentos de restrição (RFLP) dos genes alvo amplificados (16S rRNA a partir das amostras cultivadas em PCA e *nifH* a partir das amostras cultivadas em manitol-levedura), conforme descrito nas secções 2.6 a 2.11.

2.15 – Electroforese em gradiente térmico (TGGE)

Uma forma alternativa à clonagem para de identificar a diversidade microbiana ou o *fingerprint* de uma comunidade de uma determinada amostra, consiste em sujeitar o produto de PCR que contém fragmentos dos diferentes organismos dessa comunidade a electroforese com gradiente térmico, que permite a separação das moléculas de DNA de acordo com a sua sequência. Esta técnica é denominada por Electroforese em gradiente térmico (Temperature Gradient Gel Electrophoresis).

2.15.1 – Definição do gradiente térmico e corrida das amostras

Primeiramente, foi necessário estabelecer o gradiente de temperatura a aplicar à electroforese. Para tal, realizou-se uma reacção de PCR de 100µl com o par de primers *nifHg1FwGC* e *nifHg1Rv* do controlo positivo e duas amostras aleatórias. Efectuou-se uma mistura destas três reacções e 15µl do respectivo tampão de amostra (anexo III), para ter uma ideia mais exacta dos limites do gradiente de acordo com o tipo de amostras, e colocaram-se num gel acrilamida 6% (anexo III) aproximadamente 300µl desta mistura, ao longo de um poço único em quase toda a largura do gel. Ao lado do poço grande, no início do gel, foram colocados num pequeno poço 5µl de um marcador de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen). Foi aplicado um gradiente térmico linear perpendicular alargado (20-60°C), durante 6h, a 300V, num aparelho de TGGE (TGGE Maxi, Biometra). Esta electroforese não se processa com o gel submerso em tampão, mas com uma tina com TAE 1x no ânodo e outra no cátodo, onde um papel de filtro embebido em cada uma, é colocado por cima do gel, cobrindo apenas as extremidades. Depois de revelar o gel conforme descrito no ponto 2.16.2, escolheu-se a gama de temperaturas adequada às amostras, que se estende desde o início ao final da

curva sigmoidal descrita pelas amostras em diferentes graus de desnaturação. O intervalo escolhido foi de 38-50°C.

Uma vez determinado o gradiente térmico, fez-se um novo gel de acrilamida 6%, desta vez com um poço por amostra. Colocaram-se no primeiro poço 5µl do marcador de peso molecular e em cada um dos restantes 5µl de amostra e 2µl de tampão de aplicação. Foi aplicado um gradiente térmico linear paralelo ao sentido da electroforese, de 38-50°C, durante 20h, a 200V (TGGE Maxi, Biometra). Posteriormente, o gel foi revelado conforme se descreve em seguida.

2.15.2 – Coloração com nitrato de prata

Cairns & Murray (1994) desenvolveram um método rápido para a revelação de géis com nitrato de prata, que foi utilizado, como a seguir se descreve:

O gel foi colocado num recipiente de plástico e sequencialmente imerso em diversas soluções (anexo III). Primeiramente, foi imerso em etanol 10%, durante 10 min. Seguidamente, em ácido nítrico 0,15% (v/v), durante 5 min., nitrato de prata 0,202% (v/v) (solução de impregnação) durante 20 min. e carbonato de sódio 3% (p/v) (solução de revelação) até revelar. Depois, foi fixado com ácido acético 10% (v/v) durante 10min. e lavado duas vezes em água ultrapura durante 5-10 min. Foi fotografado sobre luz branca (Uvitec, EDAS 290, Kodak).

2.16 – Sequenciação

A sequenciação automática dos fragmentos foi realizada através do método de Sangers, utilizando marcação por fluorescência (ABI Genetic Analyzer 3130XL, Applied Biosystems), no Centro de Ciências do Mar (CCMAR) da Universidade do Algarve.

2.17 – Análise dos polimorfismos dos fragmentos de restrição dos produtos de PCR

Os perfis de PCR-RFLP obtidos foram transformados em matrizes binárias de presença/ausência e posteriormente importados para o NTSYSpc 2.0, através do qual se obtiveram árvores filogenéticas com base nos perfis de RFLP, utilizando o método de análise de clusters UPGMA e o coeficiente de Dice.

2.18 – Análise *in silico*

As sequências obtidas foram submetidas na base de dados do NCBI, no programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Estas sequências foram igualmente alinhadas (www.ebi.ac.uk/clustalw) e analisadas no MEGA4, através do qual se obtiveram árvores filogenéticas pelo método de Neighbourhood-Joining.

2.19 – Cálculo de índices de diversidade

Com base no número de perfis de RFLP, foram calculados os índices de diversidade de Shannon e de Simpson, através das expressões (Ludwig & Reinolds, 1988):

Índice de Shannon:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

, em que S = número total de espécies na comunidade e
pi = proporção de indivíduos pertencentes à espécie i

Cálculo da equidade, com base no índice de Shannon:

$$EH = H' / H_{\max} = H' / \ln S$$

Índice de Simpson:

$$D = \frac{\sum_{i=1}^S n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

, em que S = número total de espécies na comunidade,
ni = número de indivíduos pertencentes à espécie i e
n = número de indivíduos analisados

3 – RESULTADOS

3.1 – Optimização do método de extracção de ácidos nucleicos

Um passo fundamental na caracterização de comunidades microbianas através de métodos moleculares consiste na obtenção de material genético íntegro, livre de contaminantes e representativo dessas mesmas comunidades. Assim, a escolha e adaptação do método de extração de ácidos nucleicos reveste-se da maior importância. Os vários métodos testados encontram-se esquematizados na tabela 3.1.1.

Tabela 3.1.1 – Comparação do rendimento em DNA, RNA e a respectiva pureza obtidos através dos diferentes métodos utilizados para extrair ácidos nucleicos do solo. A negrito encontram-se realçados os melhores resultados para cada parâmetro.

Método	[DNA] (ng/μl)	[RNA] (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
Modificado a partir de Hurt <i>et al.</i> (2001) e Costa <i>et al.</i> (2004), descrito em 2.1	41.2 -526.8	56.9-194.7	1.720-3.875	0.084-0.376
Purificação com o kit <i>All Prep DNA/RNA</i> (Quiagen)	14.72-56.63	12.24-14.32	1.827-2.164	0.367-0.603
Método de Miller <i>et al.</i> (1999), descrito em 2.13	67.68-102.94	ND	5.438 -12.72	1.213-1.746
Extracção e purificação com o <i>DNA Stool kit</i> (Quiagen)	56.96-72.48	NA	1.625-2.463	0.243-0.454
Extracção e purificação com o <i>E.Z.N.A. Soil DNA extraction Kit</i> (Ómega Biotek)	36.4-41.9	NA	1.853-2.743	0.854-1.672

ND – não detectado; NA – não se aplica.

O método modificado a partir do método descrito por Hurt *et al.* (2001) foi o que permitiu um rendimento superior em ácidos nucleicos, com valores aceitáveis para a razão A₂₆₀/A₂₈₀, que deve ser entre 1.8 e 2 (embora algumas amostras apresentassem alguma contaminação com proteína, com esta razão acima de 2) (tabela 3.1.1). No entanto, verificou-se (evidente pela coloração castanha-escura dos *pellets*) que não foi possível eliminar os contaminantes do solo. A sua concentração foi, pois, bastante elevada, reflectida pelos valores baixos da razão A₂₆₀/A₂₈₀ (cujo valor para uma solução

pura deve ser superior a 2). Depois de purificar as amostras resultantes do procedimento anterior com o kit *All Prep DNA/RNA* (Quiagen), verificou-se um aumento na pureza, tanto para as proteínas, como para os contaminantes do solo (embora os valores para este último parâmetro ainda não seja aceitável). No entanto, é acompanhado por uma perda elevada de ácidos nucleicos. O Método descrito por Miller *et al.* (1999) é bastante eficiente na remoção dos contaminantes do solo, que foi primeiramente detectado visualmente pela obtenção de um sobrenadante incolor. No entanto, não é adequado para a extracção de RNA e o rendimento em DNA é mais baixo do que o primeiro método, além de que parece ser ineficiente na remoção de proteínas, pois a razão A_{260}/A_{280} é bastante superior a 2 (entre 5.438 e 12.72). A extracção e purificação de DNA através dos kits *DNA Stool kit* (Quiagen) e *E.Z.N.A. Soil DNA extraction Kit* (Omega Biotek) resultou num rendimento baixo em DNA e não são adequados para obtenção de RNA. O baixo rendimento em DNA através destes kits foi ainda confirmado pela ausência de qualquer banda de DNA no gel de agarose 1% (p/v), bem como não ocorreu a amplificação de nenhum produto de PCR com o par de *primers* 16S.

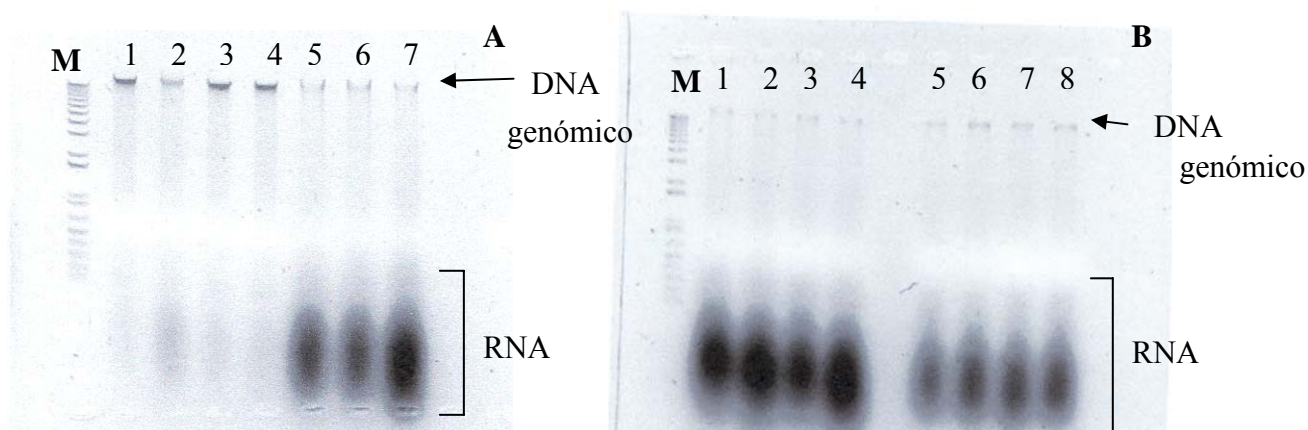


Figura 3.1.1 – DNA genómico e RNA extraídos de amostras de solo. O método de isolamento de DNA e RNA utilizado foi adoptado a partir do método descrito por Hurt *et al.* (2001) (A) e foi modificado (B) pela introdução de uma lavagem da amostra de solo com etanol 96% no início do processo, de acordo com o descrito por Costa *et al.* (2004). As amostras de DNA e RNA foram separadas num gel de agarose a 1% (p/v). M – marcador de peso molecular (1Kb Plus, Invitrogen); 1 – Amareleja 0-25cm; 2 – Amareleja 25-50cm; 3 – Amareleja (controlo); 4 – Serpa; 5 – Serpa (controlo); 6 – Santa Iria; 7 e 8 – Santa Iria (controlo). Todas as amostras representadas correspondem ao período de amostragem de Inverno.

Os investigadores Costa *et al.* (2004) verificaram que uma lavagem prévia da amostra de solo com etanol 96% aumentava o rendimento da extracção em RNA. Este facto pode ser observado através da Figura 3.1.1, onde em A as amostras de solo não foram previamente lavadas com álcool a 96% e em B foi introduzido o passo de lavagem. No entanto, o rendimento da extracção do DNA parece diminuir (visualizado pela diminuição da intensidade das bandas e verificado por espectrofotometria: antes da lavagem a quantidade de DNA era de 73.92 a 627.36 ng/ μ l e depois deste passo diminuiu para 41.2 -526.8 ng/ μ l).

3.2 – Utilização dos polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP) em filogenia

O perfil de fragmentos de restrição pode ser visto como o bilhete de identidade de cada indivíduo, pois este depende da frequência e da localização dos locais de restrição para as enzimas utilizadas. Através destes perfis, é possível construir árvores filogenéticas. As Figuras 3.2.1. a 3.2.4 representam as árvores filogenéticas construídas com base nos perfis de restrição obtidos a partir das diferentes amostras analisadas, com amplificação a partir do DNA extraído do solo e das culturas, quer para o período de Inverno, quer para o período de Primavera.

Com os fragmentos amplificados com os *primers* específicos para o gene 16S rRNA para as amostras de DNA extraídas directamente do solo (período de Inverno) foram obtidos dezassete perfis de RFLP diferentes. Utilizando esses perfis para construir árvores filogenéticas com foram obtidos dois grupos principais (coef. \sim 0.15) (Figura 3.2.1). Com o mesmo par de *primers*, para as amostras de DNA extraídas das amostras cultivadas em meio PCA foram obtidos oito perfis, dois dos quais de amostras do período de Primavera e seis do período de Inverno. A árvore filogenética obtida a partir destes perfis é constituída por três aglomerados principais (coef. \sim 0.84) (Figura 3.2.2). Para as amostras de DNA correspondentes às amostras de solo recolhidas no período de Primavera que foram cultivadas em meio manitol-levedura amplificadas com os *primers* específicos para o gene *nifH* foram obtidos onze perfis distintos de RFLP, agrupados em três conjuntos principais (coef. \sim 0.46) (Figura 3.2.3). Para os fragmentos obtidos com os *primers* específicos para o gene *nifH* de amostras do período de Inverno cultivadas em manitol-levedura foram igualmente obtidos onze perfis de RFLPs, distribuídos em quatro grupos (coef. = 0,50) (Figura 3.2.4).

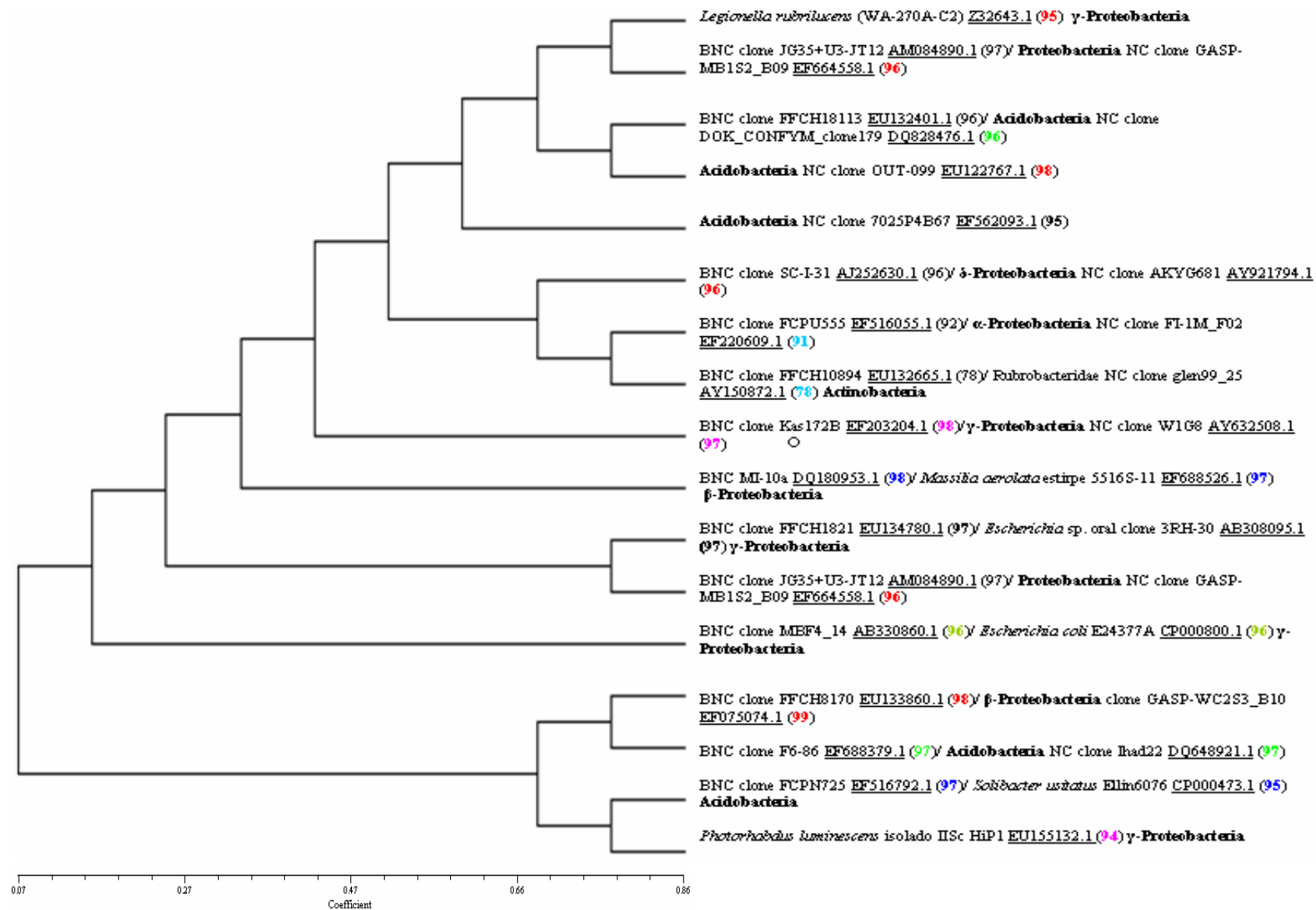


Figura 3.2.1 – Dendrograma com base nos RFLPs para o DNA amplificado com os *primers* 16S a partir de DNA extraído directamente do solo (amostras colhidas no período de Inverno). Foi usado o coeficiente de Dice. Para cada clone, são indicados os clones mais próximos (BNC) e/ou os clones afiliados (NC)/ espécies

cultivadas mais próximas. A percentagem de similaridade é indicada entre parêntesis. **Azul-claro** – Amareleja, 0-25cm; **Azul-escuro** – Amareleja, 25-50cm; Preto – Amareleja, 0-25cm (Controlo); **Vermelho** – Serpa; **Rosa** – Serpa (Controlo); **Verde-claro** – Santa Iria; **Verde-escuro** – Santa Iria (Controlo). A negrito encontra-se a referência à classe a que pertencem os clones identificados.

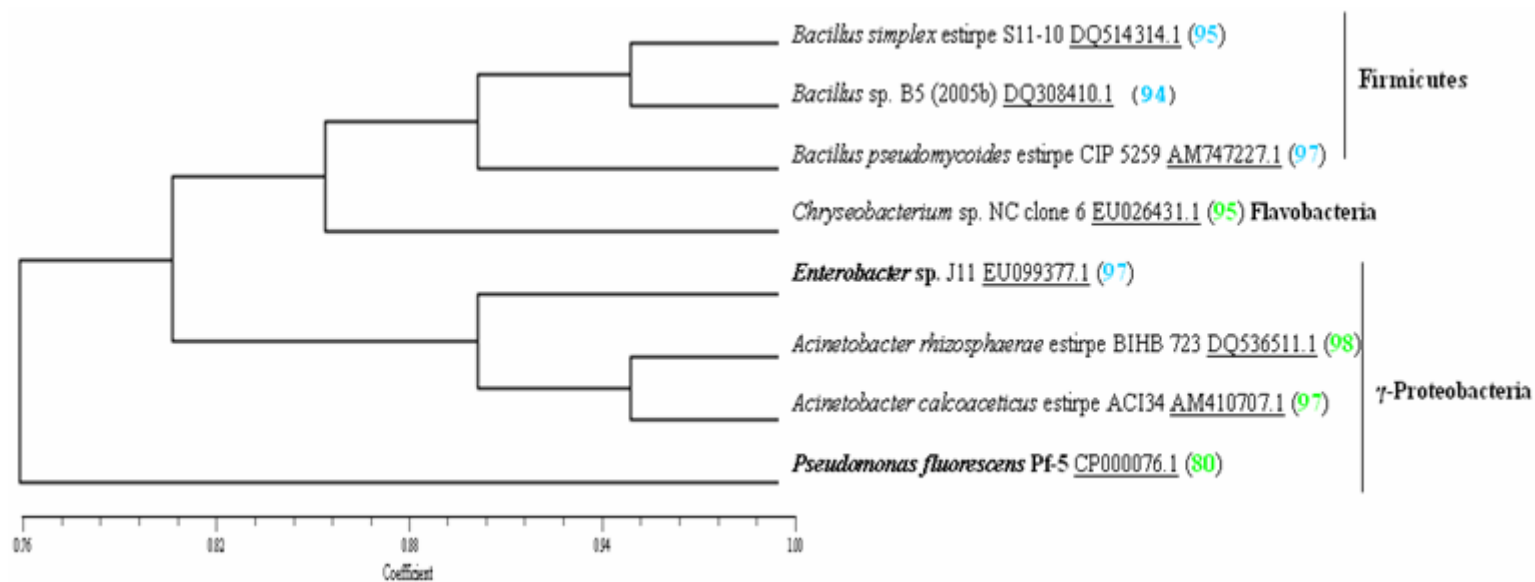


Figura 3.2.2 – Dendrograma baseado nos RFLPs para os clones obtidos a partir de cultura em meio PCA, utilizando o gene 16S rRNA (Inverno e Primavera, a negrito). **Azul-claro** – Amareleja (25-50cm); **Verde-claro** – Santa Iria. Foi usado o coeficiente de Dice. A percentagem de similaridade é indicada entre parêntesis. A negrito, à direita, encontra-se a referência à classe a que pertencem os clones identificados.

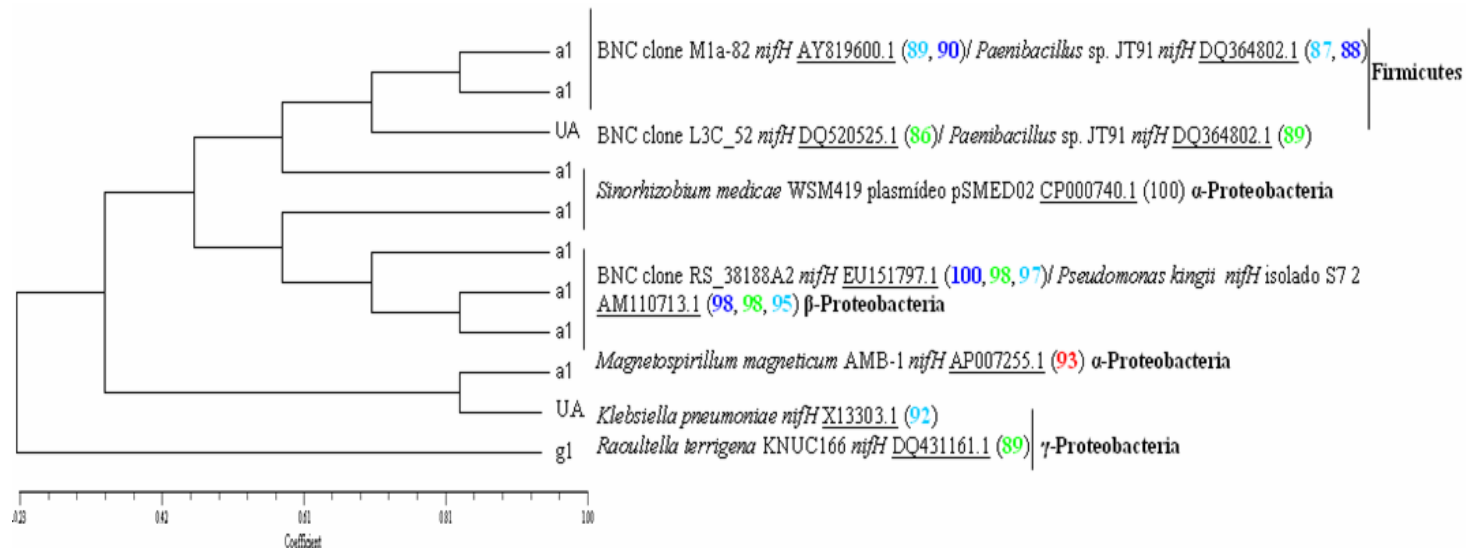


Figura 3.2.3 – Dendrograma baseado nos RFLPs para os clones obtidos a partir de cultura em meio manitol-levedura, utilizando os fragmentos obtidos com os *primers* para o gene *nifH* de *Rhizobium* (a1), *nifH* de *Azotobacter* (g1) e *nifH* universal (UA) (período de Inverno). **Azul-escuro** – Amareleja, 0-25cm; **Azul-claro** – Amareleja, 25-50cm; **Vermelho** – Serpa; **Verde-claro** – Santa Iria. Foi usado o coeficiente de Dice. Para cada clone, são indicados os clones mais próximos (BNC) e/ou as espécies cultivadas mais próximas. A percentagem de similaridade é indicada entre parêntesis. A negrito encontra-se a referência à classe a que pertencem os clones identificados.

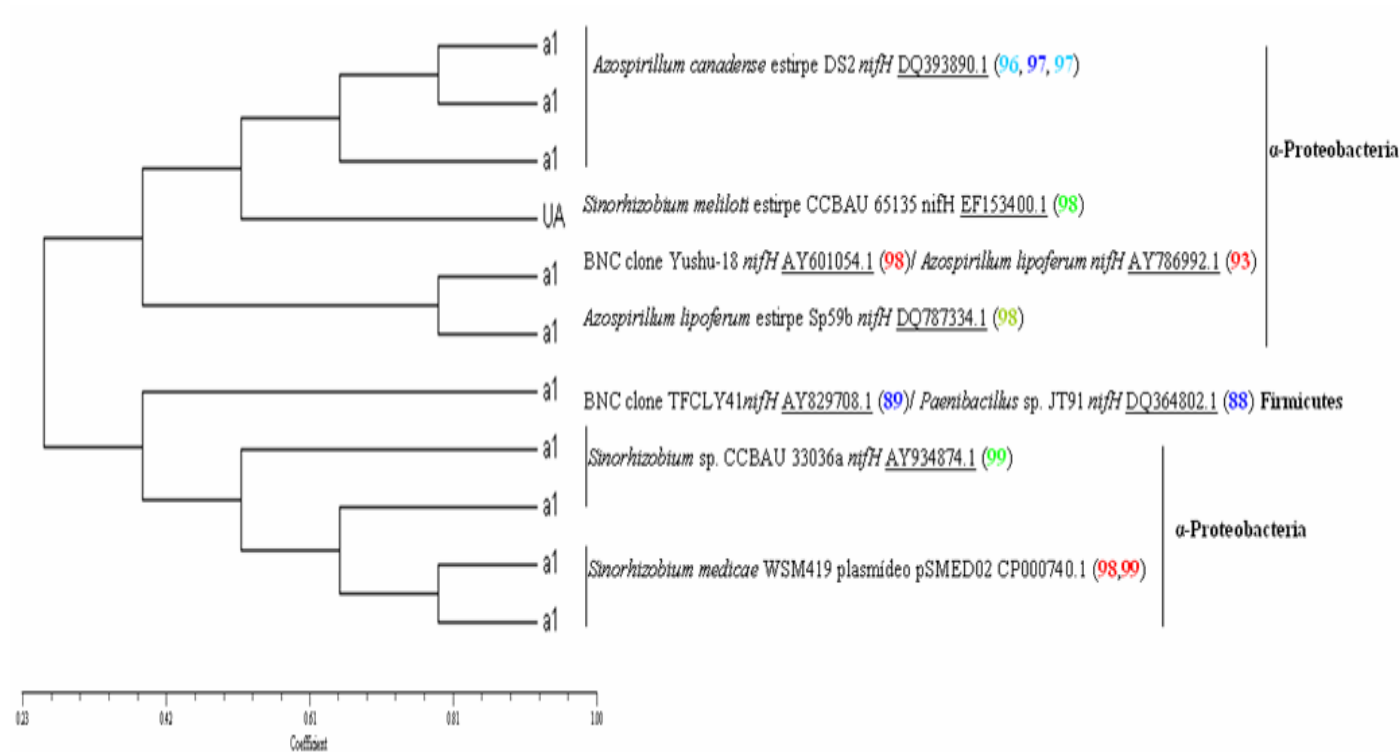


Figura 3.2.4 – Dendrograma baseado nos RFLPs para os clones obtidos a partir de cultura em meio manitol-levedura, utilizando os fragmentos obtidos com os *primers* para o gene *nifH* de *Rhizobium* (a1) e *nifH* universal (UA) (período de Primavera). **Azul-escuro** – Amareleja, 0-25cm; **Azul-claro** – Amareleja, 25-50cm; **Vermelho** – Serpa; **Verde-claro** – Santa Iria; **Verde-escuro** – Santa Iria (Controlo). Foi usado o coeficiente de Dice. Para cada clone, são indicados os clones mais próximos (BNC) e/ou as espécies cultivadas mais próximas. A percentagem de similaridade é indicada entre parêntesis. A negrito encontra-se a referência à classe a que pertencem os clones.

Os perfis de RFLP são bastante úteis para diferenciar os clones obtidos, permitindo assim ter uma ideia da diversidade de cada amostra, bem como seleccionar apenas um representante de cada perfil para sequenciar e posteriormente proceder à sua identificação, sem ser necessário sequenciar todas as colónias positivas. Estes perfis podem inclusivamente ser utilizados para estabelecer relações filogenéticas entre os clones, como se pôde verificar nas Figuras 3.2.1 a 3.2.4. No entanto, o mesmo tamanho de um dado fragmento entre dois clones diferentes não significa que estes possuam uma sequência similar. Desta forma, é mais exacto recorrer ao uso das sequências genéticas para determinar relações filogenéticas.

3.3 – Caracterização da diversidade das comunidades bacterianas através da amplificação do DNA directamente extraído do solo

A extracção directa de DNA a partir do solo e posterior amplificação dos fragmentos de interesse através de PCR, é uma das formas mais abrangentes de caracterizar comunidades bacterianas ambientais, uma vez que permite detectar, potencialmente, todas as espécies/ estirpes presentes, ultrapassando os problemas dos organismos não cultiváveis e o muito tempo necessário aos métodos clássicos. Assim, para as amostras onde foi possível a amplificação a partir do DNA extraído directamente do solo (apenas as correspondentes ao período de Inverno), os genes que codificam para o 16S rRNA e *nifH* do género *Azotobacter* foram amplificados e construída uma biblioteca de clones que foi posteriormente sujeita à análise de RFLP. Os clones com diferentes perfis de RFLP foram seleccionados para sequenciação. A identificação, bem como as relações filogenéticas desses clones, encontram-se representadas na Figura 3.3.1.

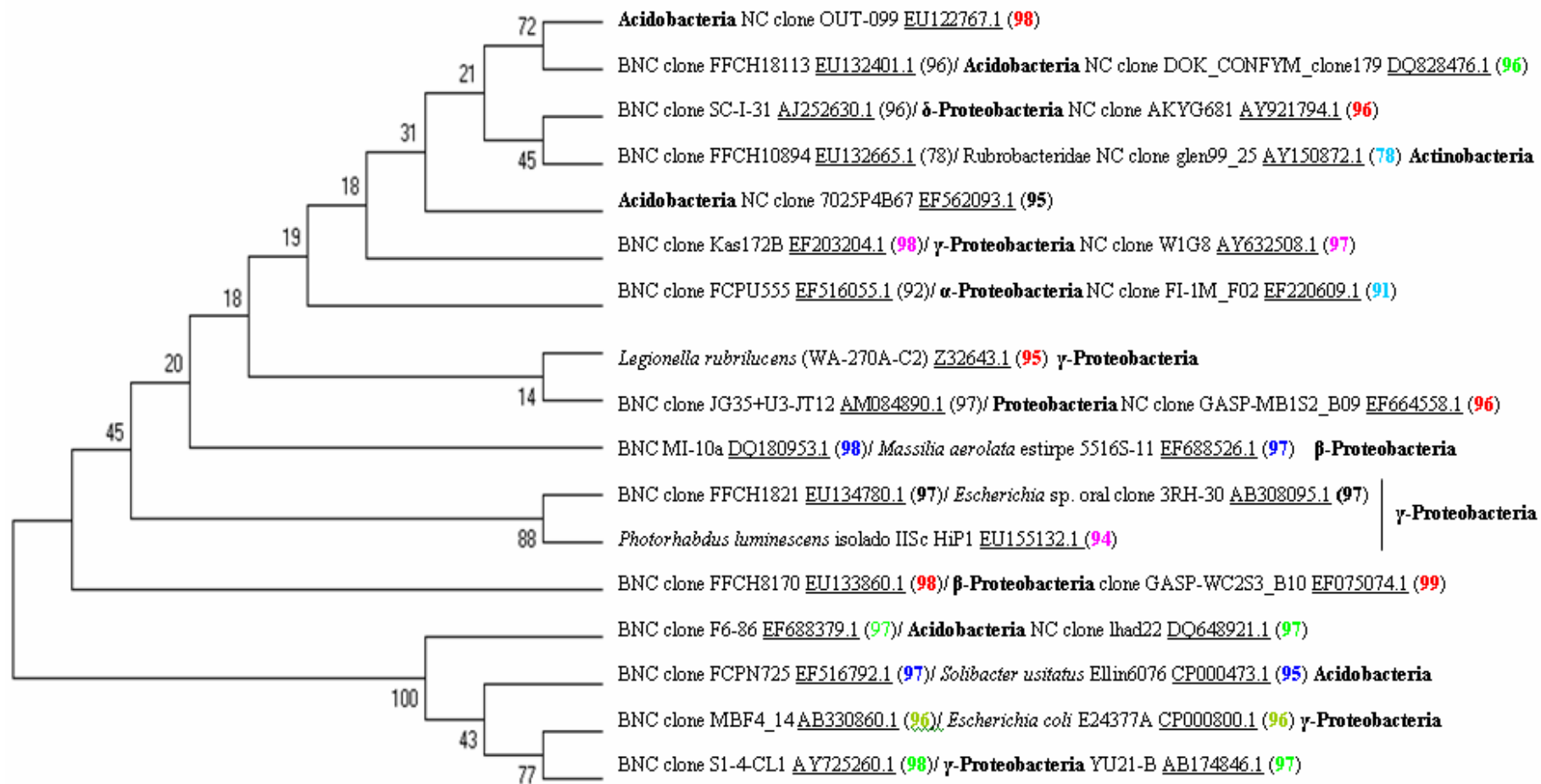


Figura 3.3.1 – Árvore filogenética para os clones obtidos (correspondentes ao período de Inverno), através da amplificação do gene 16S rRNA (a partir de DNA extraído directamente do solo). Foi usado o método de *Neighborhood-Joining* e os valores de *Bootstrap* encontram-se sobre os ramos. Para cada clone, são indicados os clones mais próximos (BNC) e/ou os clones afiliados (NC)/ espécies cultivadas mais próximas. A percentagem de similaridade é indicada entre parêntesis. **Azul-claro** – Amareleja, 0-25cm; **Azul-escuro** – Amareleja, 25-50cm; Preto – Amareleja, 0-25cm (Controlo); **Vermelho** – Serpa; **Rosa** – Serpa (Controlo); **Verde-claro** – Santa Iria; **Verde-escuro** – Santa Iria (Controlo). A negrito encontra-se a referência à classe a que pertencem os clones identificados.

A utilização do par de *primers* específico para amplificar o gene 16S rRNA permitiu a detecção de bactérias pertencentes a *taxa* muito diversos, como alfa, beta, gama e delta-Proteobacteria, Acidobacteria e Actinobacteria (Figura 3.3.1). O local mais diverso parece ser Serpa, com 5 clones diferentes, cada um pertencendo a uma classe distinta (beta, gama (*Legionella rubrilucens*) e delta-Proteobacteria e Acidobacteria). Em Amareleja, para profundidades diferentes, existem diferentes classes de microrganismos. Mais à superfície (0-25cm) é possível encontrar uma alfa-Proteobactéria e uma Actinobactéria pertencente à família Rubrobacteridade, enquanto a uma profundidade de 25-50 cm se encontra *Massilia aerolata* (beta-Proteobacteria) e *Solibacter usitaus* (Acidobacteria). Em Santa Iria apenas foram encontrados clones pertencentes às classes gama-Proteobacteria e Acidobacteria. Os controlos parecem apresentar uma biodiversidade microbiana mais baixa que os locais de amostragem, em solo sob agricultura biológica. No controlo de Amareleja foi encontrado um clone afiliado com a classe Acidobacteria e outro com a classe gama-Proteobacteria (*Escherichia* sp.). No controlo de Serpa foi possível identificar um dos dois clones pertencentes à classe gama-Proteobacteria, sendo este similar a *Photorhabdus luminescens*. No controlo de Santa Iria, apenas foi possível identificar um clone, afiliado com *E. coli* (gama-Proteobacteria).

É ainda possível verificar a existência de dois grupos distintos, um (na parte inferior) constituído por dois clones afiliados com a classe Acidobacteria (Santa Iria e Amareleja, 25-50cm) e outros dois afiliados com a classe gama-Proteobacteria (Santa Iria e respectivo controlo) e outro constituído pelos restantes clones (Figura 3.3.1). Este segundo grupo é maior e mais diverso que o outro, sendo que os ramos são maioritariamente constituídos por um clone, o que demonstra alguma distância entre os clones obtidos.

Com o par de *primers* específicos para o gene *nifH* do género *Azotobacter* (a partir de DNA extraído directamente das amostras de solo correspondentes à amostragem do período de Inverno), foi ainda possível identificar dois clones afiliados com *Azotobacter vinelandii* M20568.1 (98 e 91%) em Serpa e Santa Iria. Com este par de *primers*, não foram detectados clones com afiliação ao género *Azotobacter* em nenhum dos locais controlo.

3.4 – Caracterização da diversidade das comunidades bacterianas por amplificação do DNA extraído de culturas

Embora a extração do DNA directamente a partir das amostras de solo seja preferível aos métodos culturais, como já foi anteriormente referido, verificou-se que as amostras do DNA extraído directamente das amostras de solo sofreu uma degradação que inibiu as reacções de amplificação. Deste modo, recorreu-se à colheita da biomassa bacteriana crescida em dois meios de cultura: 1) *Plate Count Agar* (PCA), um meio recomendado para a contagem de microrganismos provenientes de amostras ambientais e produtos alimentares; 2) manitol-levedura, um meio específico para espécies fixadoras de azoto (*Azotobacter* sp. e *Rhizobium* sp.) (Holt & Krieg, 1994).

A biomassa obtida pelo crescimento em cada um dos meios de cultura foi sujeita à extração do DNA e posterior construção de bibliotecas de clones e respectiva análise de RFLP, sendo que nas amostras recolhidas do meio PCA foi pesquisada a população microbiana em geral, utilizando os *primers* para o gene 16S rRNA e nas amostras recolhidas a partir do meio manitol-levedura foi explorada a população diazotrófica, usando os *primers* específicos para o gene *nifH*. Os resultados obtidos estão representados nas Figuras 3.4.1 a 3.4.3.

Relativamente às amostras cultivadas no meio PCA, com os *primers* direccionados para o 16S rRNA foi possível analisar 8 clones diferentes. Na amostra de Amareleja (25-50cm, período de Inverno) identificaram-se três clones pertencentes à classe Firmicutes e afiliados com duas espécies distintas do género *Bacillus* (*B. pseudomycoides* e *B. simplex*) e uma espécie não identificada do mesmo género. Para este local, para o período de Primavera, foi obtido um clone semelhante a *Enterobacter* sp., uma gama-Proteobacteria diazotrófica (algumas espécies são diazotróficas como, por exemplo, *E. agglomerans* (Väsänen *et al.*, 1985)). Nas amostras de Santa Iria foram detectados clones principalmente pertencentes à classe gama-Proteobacteria. (duas espécies do género *Acinetobacter* na amostra de Inverno e *Pseudomonas fluorescens* na amostra de Primavera). Ainda na amostra de Santa Iria correspondente ao período de Inverno foi detectado um clone semelhante *Chriseobacterium* sp., da classe Flavobacteria (Figura 3.4.1). Para as restantes amostras, bem como nos controlos, não houve amplificação deste gene.

Através da árvore filogenética representada na Figura 3.4.1 é possível distinguir quatro grupos de clones diferentes: um constituído por espécies afiliadas com os géneros

Acinetobacter e *Enterobacter*, outro com o género *Bacillus*, um terceiro afiliado a uma espécie do género *Chryseobacterium* e, por fim, no último grupo está um clone com semelhanças a uma bactéria pertencente ao género *Pseudomonas*.

A amplificação realizada com os primers referentes ao gene *nifH* de *Rhizobium* (a1), *nifH* de *Azotobacter* (g1) e *nifH* universal (UA) resultou na identificação de 11 clones diferentes. A árvore filogenética obtida para estes clones é apresentada na Fig. 3.4.2. A maioria dos clones de Inverno (8) foi identificada com o par de *primers* específico para o gene *nifH* do género *Rhizobium*, embora este tenha detectado espécies diazotróficas de outros géneros (*Paenibacillus*, *Magnetospirillum* e *Pseudomonas*). Da mesma forma, os *primers* específicos para gene *nifH* do género *Azotobacter*, detectaram igualmente uma espécie diazotrófica pertencente ao género *Raoultella* (ou *Klebsiella*). Os *primers* universais para o gene *nifH* apenas detectaram dois clones, um afiliado com *Klebsiella pneumoniae* e outro com *Paenibacillus* sp (Figura 3.4.2).

Com a abordagem da cultura em manitol-levedura, o local mais diverso em espécies fixadoras de azoto no período de Inverno parece ser Amareleja (0-25cm), com 5 clones diferentes, afiliados com as classes Firmicutes (*Paenibacillus* sp.) e alfa (*Sinorhizobium medicae*), beta (*Pseudomonas kingii*) e gama-Proteobacteria (*Klebsiella pneumoniae*). Na mesma localidade, entre 25-50cm foram apenas detecados os géneros *Paenibacillus* e *Pseudomonas kingii*. Em Serpa foram detectados clones semelhantes a *Magnetospirillum magneticum* e *Sinorhizobium medicae* (alfa-Proteobacteria). Em Santa Iria foram encontrados clones semelhantes aos de Amareleja (25-50cm) e também *Raoultella terrigena* (anteriormente denominada por *Klebsiella terrigena* (Drancourt *et al.*, 2001)). Note-se que não foram detectadas bactérias diazotróficas nos controlos nesta época do ano (Figura 3.4.2).

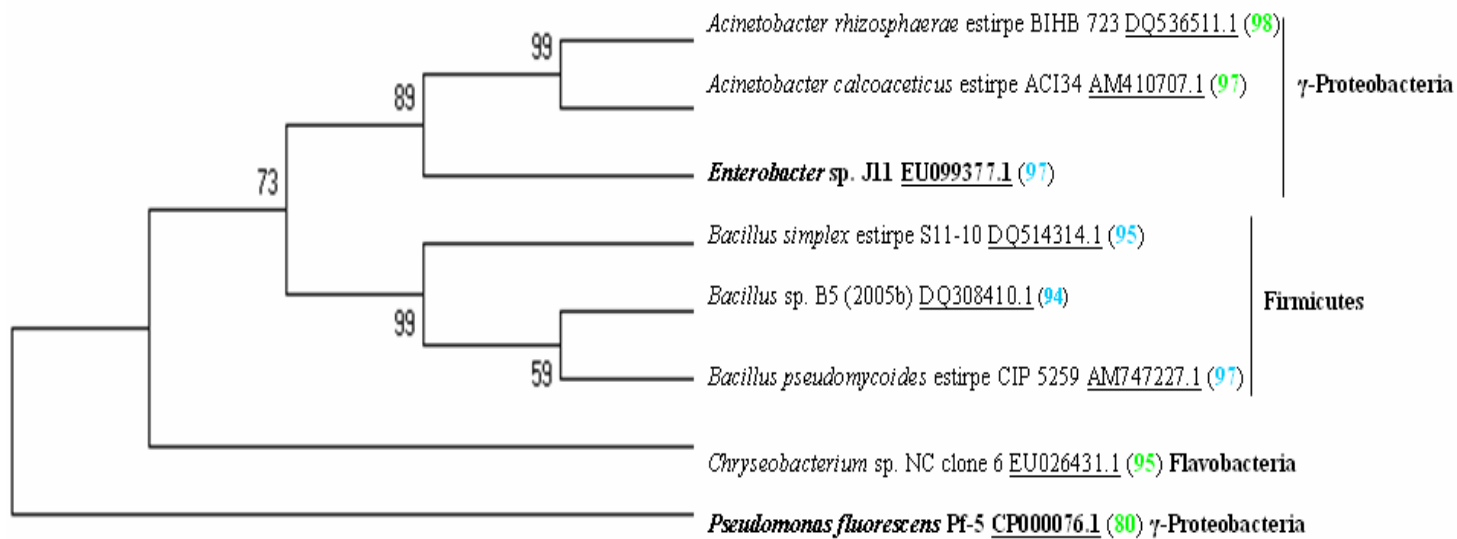


Figura 3.4.1 – Árvore filogenética para os clones obtidos a partir de cultura em PCA, com base nas sequências do gene que codifica o 16S rRNA (Inverno e Primavera, a negrito). **Azul-claro** – Amareleja (25-50cm); **Verde-claro** – Santa Iria. Foi usado o método de *Neighborhood-Joining* e os valores de *Bootstrap* encontram-se sobre os ramos. A percentagem de similaridade é indicada entre parêntesis. A negrito, à direita, encontra-se a referência à classe a que pertencem os clones identificados.

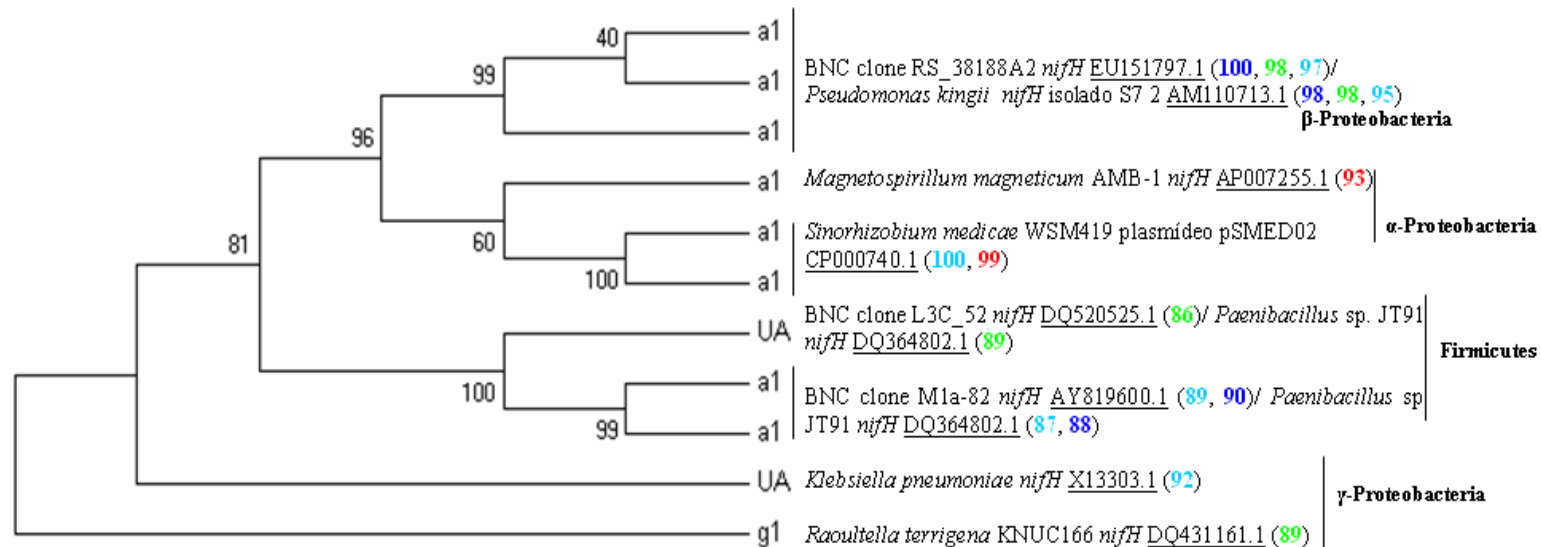


Figura 3.4.2 – Árvore filogenética construída com base nas sequências do gene *nifH* de *Rhizobium* (a1), *nifH* de *Azotobacter* (g1) e *nifH* universal (UA) para para os clones de organismos diazotróficos obtidos a partir de cultura em meio manitol-levedura, para as amostras colhidas no período de Inverno. Para cada clone, são indicados os clones mais próximos (BNC) e/ou as espécies cultivadas mais próximas. A percentagem de similaridade é indicada entre parêntesis. Azul-escuro – Amareleja, 0-25cm; Azul-claro – Amareleja, 25-50cm; Vermelho – Serpa; Verde-claro – Santa Iria. Foi usado o método de *Neighborhood-Joining* e os valores de *Bootstrap* encontram-se sobre os ramos. A negrito encontra-se a referência à classe a que pertencem os clones identificados.

Foi possível identificar cinco grupos de clones: um constituído por clones afiliados com *Pseudomonas kingii*, um segundo que contém clones semelhantes a *Magnetospirillum magneticum* e *Sinorhizobium medicae*, um outro composto pelo género *Paenibacillus* e ainda dois mais distantes que, embora ambos com clones afiliados ao género *Klebsiella* (ou mais propriamente ao género agora denominado por *Raoultella* (Drancourt *et al.*, 2001), não são suficientemente semelhantes para se encontrarem no mesmo ramo, sendo um de Amareleja (25-50cm) e o outro de Santa Iria (Figura 3.4.2).

No que se refere aos clones isolados das nas amostras colhidas no período de Primavera e obtidos a partir das culturas em meio manitol-levedura, foi possível analisar 11 clones distintos. A árvore filogenética obtida para estes clones é apresentada na Figura 3.4.3. Neste caso, a diversidade em termos de classes é bastante menor do que para as amostras colhidas no período de Inverno (Figura 3.4.2), pertencendo todos os organismos à classe alfa-Proteobacteria, excepto um dos clones, *Paenibacillus sp.*, que pertence à classe Firmicutes (Figura 3.4.3). Em Amareleja (0-25cm) apenas foi possível identificar um clone afiliado com *Azospirillum canadense*, enquanto na amostra do mesmo local para 25-50cm, além dessa espécie, foi encontrado também *Paenibacillus sp.* Em Serpa foram identificados *Sinorhizobium medicae* e *Azospirillum lipoferum*. Nas amostras de Santa Iria foram detectados clones com semelhanças ao género *Sinorhizobium*, sendo que no controlo foi também identificada uma espécie diazotrófica, o *Azospirillum lipoferum* (Figura 3.4.3).

Para este período de amostragem os grupos de clones identificados foram três, um número menor comparativamente com a mesma árvore relativa ao período de Inverno. O primeiro grupo é constituído por duas espécies do género *Azospirillum*, um segundo grupo é composto por várias espécies e estirpes do género *Sinorhizobium* e o último grupo contém apenas um clone, afiliado com o género *Paenibacillus*. É evidente a predominância do género *Sinorhizobium* nos locais de amostragem de Santa Iria e Serpa (Figura 3.4.3).

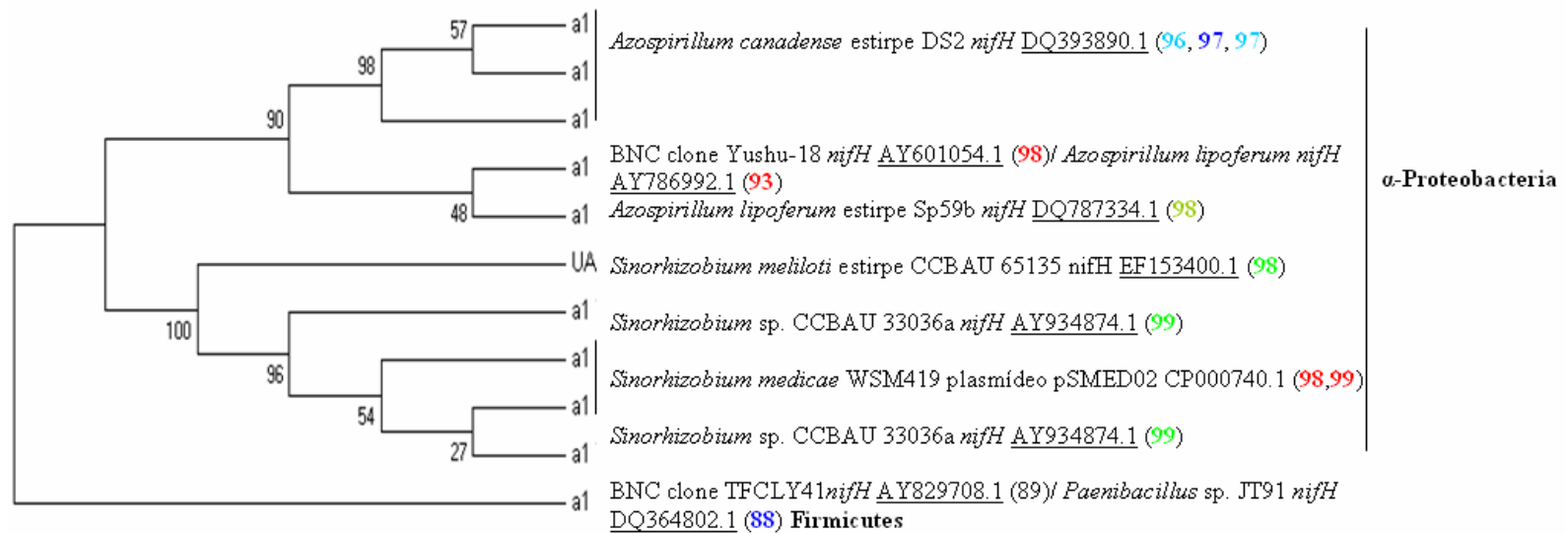


Figura 3.4.3 – Árvore filogenética construída com base nas sequências do gene *nifH* de *Rhizobium* (a1), *nifH* de *Azotobacter* (g1) e *nifH* universal (UA) para para os clones de organismos diazotróficos obtidos a partir de cultura em meio manitol-levedura, para as amostras colhidas no período de Primavera. Para cada clone, são indicados os clones mais próximos (BNC) e/ou as espécies cultivadas mais próximas. A percentagem de similaridade é indicada entre parêntesis. Azul-escuro – Amareleja, 0-25cm; Azul-claro – Amareleja, 25-50cm; Vermelho – Serpa; Verde-claro – Santa Iria; Verde-escuro – Santa Iria (Controlo). Foi usado o método de *Neighborhood-Joining* e os valores de *Bootstrap* encontram-se sobre os ramos. A negrito encontra-se a referência à classe a que pertencem os clones identificados.

Ainda para os organismos diazotróficos obtidos a partir de cultura em meio manitol-levedura, com base nas sequências do gene *nifH* de *Rhizobium* (a1) (Primavera), foi possível identificar mais dois clones, que não foram incluídos na árvore filogenética em virtude de o fragmento ser tão pequeno comparado com os outros (53 e 49pb), que o programa não os conseguia resolver. Estes clones têm afiliação com BNC clone X07 *nifH* AM746611.1 (91%) e BNC clone 35 *nifH* DQ995905.1 (91), pertencendo às amostras de Amareleja 0-25cm e Santa Iria (Controlo), respectivamente.

Para uma análise complementar às árvores filogenéticas apresentadas construiu-se a tabela 3.4.1, onde são indicados os géneros pertencentes a cada *taxum* para cada local e período de amostragem. Esta tabela permite observar, de forma integral e rápida, toda a informação que foi descrita para as figuras 3.3 e 3.4.

Tabela 3.4.1 – Taxa detectados com os diferentes pares de *primers*, a partir de cultura ou por extracção directa do DNA. Inv – Inverno; Prim – Primavera. 16S – *primers* direccionados para a subunidade 16S ribossomal (universais); UA – *primers* direccionados para o gene *nifH* (universais); g1 – *primers* direccionados para o gene *nifH* do género *Azotobacter*; a1 – *primers* direccionados para o gene *nifH* do género *Rhizobium*. a) Amareleja, 0-25cm; b) Amareleja, 25-50cm; c) Amareleja, 0-25cm (Controlo); d) Amareleja, 25-50cm (Controlo); e) Serpa; f) Serpa (Controlo); g) Santa Iria; h) Santa Iria (Controlo); 1) Obtidos por extracção directa do DNA

	Por cultura								Extracção directa
	16S		UA		g1		a1		16S
	Inv	Prim	Inv	Prim	Inv	Prim	Inv	Prim	Inv
Firmicutes									
<i>Paenibacillus</i> sp.			g				a, b	b	
<i>Bacillus</i> sp.	a								
<i>Bacillus pseudomycooides</i>	a								
<i>Bacillus simplex</i>	a								
Alfa- Proteobacteria									
Alfa- Proteobacteria									a, b
<i>Sinorhizobium</i> sp.							g		
<i>Sinorhizobium medicae</i>							a, e	e	
<i>Sinorhizobium meliloti</i>				g					
<i>Azospirillum canadense</i>								a,b	
<i>Azospirillum lipoferum</i>								e,h	
<i>Magnetospirillum magneticum</i>							e		
Beta- Proteobacteria									
Beta-Proteobacteria									e
<i>Massilia aerolata</i>									b
<i>Pseudomonas kingii</i>							a, b, g		
Gama- Proteobacteria									
Gama-Proteobacteria									f
<i>Escherichia</i> sp.									c
<i>Escherichia coli</i>									h
<i>Photorhabdus luminescens</i>									f
<i>Legionella rubrilucens</i>									e
<i>Raoultella terrigena</i>						g			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>				a					
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		g							
<i>Enterobacter</i> sp.		a							
<i>Acinetobacter rhizosphaerae</i>	g								
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	g								
<i>Azotobacter vinelandii</i>						f, g ¹⁾			
Delta-Proteobacteria									
Delta-Proteobacteria									e
Actinobacteria									
Rubrobacteridae									a, b, c
Bacteroidetes/Flavobacteria									
<i>Chriseobacterium</i> sp.	g								
Acidobacteria									
Acidobacteria									c, e, g
<i>Solibacter usitatus</i>									b

3.5 – Electroforese em gel com gradiente térmico

Um outro método bastante utilizado na caracterização de comunidades microbianas é a electroforese em gel com gradiente térmico (TGGE). As bandas excisadas podem ser posteriormente reamplificadas e sequenciadas para identificação dos indivíduos. No entanto, mesmo não executando esse passo, ou anteriormente a ele, é possível ver o *fingerprint* de cada comunidade, através do conjunto de bandas de cada uma.

Foi efectuada uma electroforese em gel com gradiente térmico das amostras obtidas por cultura em meio manitol-levedura onde foi possível detectar a presença do gene *nifH* com o par de *primers* específico para este gene em *Azotobacter*, com uma *clamp* GC (Figura 3.5.1).

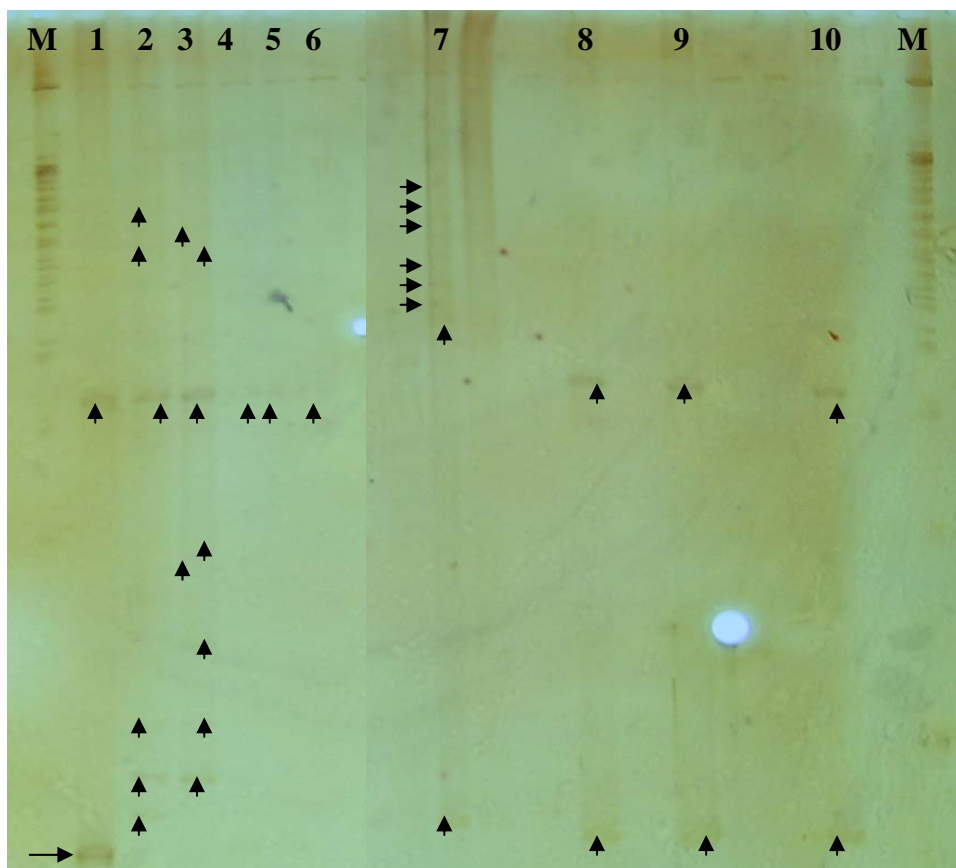


Figura 3.5.1 – Electroforese em gel com gradiente térmico das amostras amplificadas com o par de *primers* específico para o gene *nifH* do género *Azotobacter*, com *clamp* GC. M – marcador de peso molecular; 1 – Controlo positivo (*Azotobacter vinelandii* DSM N 2289); 2 – Amareleja, 0-25cm; 3 – Amareleja 25-50cm; 4 – Amareleja (Controlo, 25-50cm); 5 – Serpa; 6 – Serpa (Controlo) 7 – Santa Iria; 8 – Serpa; 9 – Serpa (Controlo); 10 – Santa Iria. 1 a 7: Inverno; 8 a 10: Primavera. As setas a preto têm como objectivo realçar a localização das bandas.

Através da observação do gel de poliacrilamida (Figura 3.5.1), pode verificar-se que as bandas têm um bom grau de separação, o que torna fácil a sua diferenciação. O controlo positivo deu origem a duas bandas, sendo os perfis das amostras de Amareleja (Controlo, 25-50cm), Serpa, Serpa (Controlo) (Inverno) e Serpa, Serpa (Controlo) e Santa Iria (Primavera) semelhantes a este, embora não seja possível observar a presença da banda de baixo nestas três primeiras amostras. As amostras 1 e 2 foram recolhidas no mesmo ponto de amostragem (Amareleja), a duas profundidades diferentes. Pode verificar-se que existem bandas comuns e bandas específicas para cada amostra, sendo que a amostra de profundidade parece ser mais diversa. A amostra de Santa Iria (Inverno) apresenta um perfil com bastante diversidade, sendo muito distinto dos restantes.

Não foi detectado o gene *nifH* com este par de *primers* no controlo de Santa Iria (em nenhuma das estações do ano) nem nas amostras de Primavera de Amareleja. Embora tenha sido amplificado um produto de PCR com estes *primers* em todas as amostras cultivadas em meio manitol-levedura excepto nas três supramencionadas, a clonagem apenas foi bem sucedida para um clone, de Santa Iria no período de Inverno (*Raoultella terrigena*), apresentado na secção 3.4 (Figura 3.4.2). Utilizando o TGGE para separar esses mesmos fragmentos de amplificação, foi possível a sua divisão. Desta forma, não é possível estabelecer uma comparação entre os resultados de diversidade obtidos utilizando a clonagem ou recorrendo ao TGGE, para as mesmas amostras, em termos de número de clones (clonagem) *versus* número de bandas (TGGE), o que seria bastante interessante.

Nas amostras em que o DNA foi extraído directamente a partir do solo apenas foi possível detectar, com estes *primers*, *Azotobacter vinelandii* em Serpa e Santa Iria (no período de Inverno) (secção 3.3). O resultado do gel de TGGE para Serpa parece efectivamente indicar um tipo de sequência (Figura 3.5.1), o que está de acordo com o verificado com a clonagem para a mesma amostra, utilizando DNA directamente extraído do solo. No entanto, para a amostra de Santa Iria (Inverno), onde só foi possível a identificação de um clone por extracção directa (*Azotobacter vinelandii*) ou um clone por cultura (*Raoultella terrigena*), o gel de TGGE apresenta uma grande diversidade de bandas.

3. 6 – Índices de diversidade e equidade

O conceito de diversidade de uma comunidade prende-se com o número de espécies que a constituem (riqueza) e também com a proporção em que os indivíduos se distribuem por estas espécies (equidade). O índice de Shannon mede a incerteza associada à previsão da espécie a que um determinado indivíduo pertence, enquanto o índice de Simpson dá um valor da probabilidade de dois indivíduos escolhidos aleatoriamente da comunidade pertencerem à mesma espécie. Assim, quanto maior o valor do índice de Shannon, maior a diversidade, enquanto para o índice de Simpson ocorre o contrário. Desta forma, é comum usar-se o seu recíproco ($1/D$) ou o seu complementar ($1-D$), correspondendo este à probabilidade de dois indivíduos pertencerem a espécies diferentes. O índice de Simpson atribui mais peso a espécies mais abundantes, sendo que a adição de espécies raras causa alterações pequenas ao valor de D . Com base no índice de Shannon, para qualquer dado número de espécies, existe um H' máximo possível, que ocorre quando todas as espécies estão presentes em igual número. Esta medida da distribuição dos indivíduos pelas várias espécies é chamada equidade. Assim, tende para o mínimo (0) à medida que uma espécie se torna dominante e para o máximo (1) quanto mais equitativa for a distribuição dos indivíduos pelas espécies (Ludwig & Reynolds, 1988). Com base nos perfis de RFLPs foram calculados os índices de diversidade de Shannon e Simpson ($1-D$) e a equidade, para cada amostra, como se pode observar nas Figuras 3.6.1 e 3.6.2.

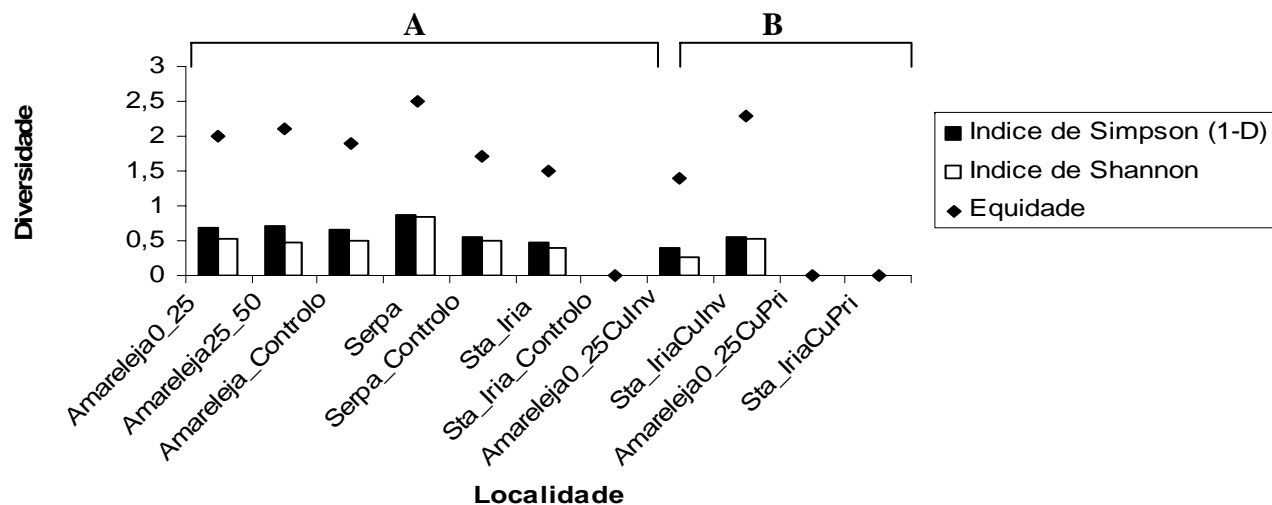


Figura 3.6.1 – Índices de diversidade de Shanon e Simpson (1-D) e equidade, para os clones obtidos com os *primers* direccionados para o gene 16S rRNA utilizando DNA directamente extraído das amostras de solo (A) e DNA extraído a partir da cultura das amostras em meio PCA (B). Todas as amostras de DNA obtidas directamente a partir do solo correspondem ao período de Inverno. As amostras de DNA provenientes de organismos cultivados em meio PCA correspondem aos períodos de Inverno (Inv) e Primavera (Pri).

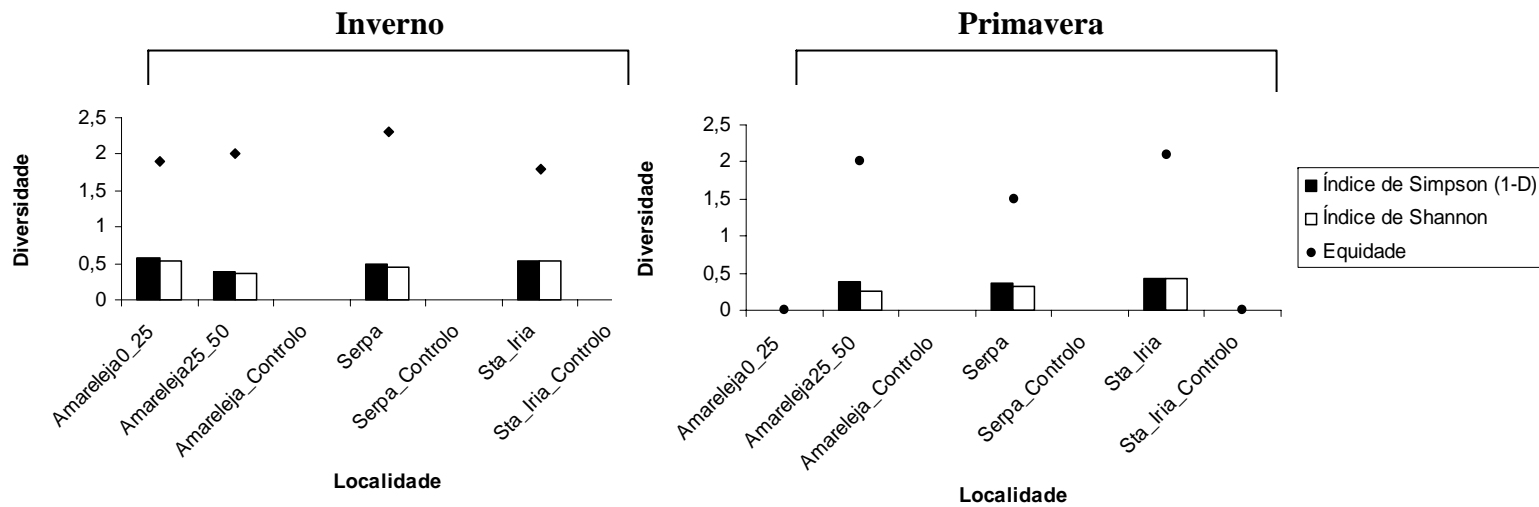


Figura 3.6.2 – Índices de diversidade de Shanon e Simpson (1-D) e equidade, para os clones obtidos com os *primers* direccionados para o gene *nifH* utilizando DNA extraído a partir da cultura das amostras em meio manitol-levedura.

Os índices de diversidade de Shannon e Simpson (1-D) variam da mesma forma para todas as amostras (Figuras 3.6.1 e 3.6.2). Para o controlo de Santa Iria (período de Inverno), com DNA extraído directamente a partir do solo apenas foi possível detectar, com o par de *primers* específico para o gene 16S rRNA um clone, afiliado com *E. coli* (Figuras 3.2.1 e 3.3.1), pelo que os índices de diversidade e equidade são zero (figura 3.6.1 – A). O mesmo ocorreu com as amostras de Amareleja e Santa Iria, cultivadas em meio PCA (correspondentes ao período de Primavera) (Figura 3.6.1 – B), em que apenas foram detectados um clone afiliado com *Enterobacter* sp. e outro semelhante a *Pseudomonas fluorescens*, respectivamente (Figuras 3.2.2 e 3.4.1). Com este mesmo par de *primers*, verificou-se que a amostra mais diversa é a de Serpa e as menos diversas são as de Santa Iria e respectivo controlo, para as amostras obtidas directamente a partir do solo. Relativamente às amostras cultivadas em meio PCA, correspondentes ao período de Inverno, a de Santa Iria é mais diversa que a de Amareleja (0-25cm), não tendo sido identificados clones em mais nenhuma amostra ou controlo (Figura 3.6.1 – B).

O gene *nifH*, nas amostras cultivadas em meio manitol-levedura, não foi detectado em nenhum dos controlos, nos períodos de Inverno e Primavera, excepto no controlo de Santa Iria (período de Primavera), onde foi identificado um único clone, afiliado com *Azospirillum lipoferum* (Figuras 3.2.4 e 3.4.3), pelo que a sua equidade e diversidade são zero (Figura 3.6.2). No período de Inverno, as amostras cultivadas em meio manitol-levedura mais diversas são Amareleja (0-25cm) e Santa Iria e a menos diversa é Amareleja (25-50cm) (Figura 3.6.2). No período de Primavera a amostra cultivada em meio manitol-levedura mais diversa é a de Santa Iria e as menos diversas são as de Amareleja (0-25cm) e Santa Iria (controlo) (Figura 3.6.1). Os dados das Figuras 3.6.1 e 3.6.2, em termos de diversidade, encontram-se de acordo com o observado nas figuras das secções 3.2 a 3.4. Em geral, verificou-se que quanto mais diversa é uma amostra, mais bem distribuídos se encontram os indivíduos pelas diferentes espécies, ou seja, o seu nível de equidade é maior, e vice-versa (Figuras 3.6.1 e 3.6.2).

4 – DISCUSSÃO

4.1 – Optimização do método de extracção de ácidos nucleicos

Para as amostras de solos em estudo foi optimizado um protocolo de extracção simultânea de DNA e RNA, modificado partir de Hurt *et al.*, (2001) e Costa *et al.* (2004). Embora o rendimento em DNA e RNA tenha sido da ordem dos 41.2 -526.8 e 56.9-194.7 ng/ μ l, respectivamente, as amostras de ácidos nucleicos continham muitos contaminantes, denotado pela baixa relação A_{260}/A_{230} (0.084-0.376) e pela cor acastanhada dos *pellets*, que indicou a presença de ácidos húmicos, inibidores da reacção de PCR, pelo que foi impossível utilizá-las directamente nesta reacção. Assim, o passo seguinte consistiu em eliminar os inibidores de PCR. O método mais fácil e mais frequentemente citado na bibliografia (Yates *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2004) consiste em diluir a amostra, até que os inibidores se encontrem a uma concentração tal que deixem de interferir com a reacção. Desta forma, foram efectuadas reacções de PCR com diluições do DNA, que variaram entre 1:10, 1:25, 1:50 e 1:75, dependendo das características de cada uma. Para as amostras correspondentes ao período de Inverno, para amplificações com os *primers* específicos para o gene 16S rRNA esta medida foi eficaz, tendo sido possível a identificação de 17 clones diferentes. No entanto, as amostras começaram a evidenciar sinais de degradação, até ao momento em que deixou de ser possível realizar a amplificação com sucesso. Esta degradação terá sido devida à presença de nucleases, sendo que as presentes nos solos são mais resistentes aos inibidores e mais activas que as enzimas estudadas *in vitro* (Correia, 1986). Outros compostos presentes no solo, que são extraídos conjuntamente com os ácidos nucleicos, poderão ter contribuído, de igual modo, para a inibição da reacção de PCR.

Os ácidos húmicos são compostos complexos, contendo grupos fenólicos. Estes estão presentes em grandes quantidades nos solos, sendo extraídos juntamente com o DNA, uma vez que têm carga semelhante a este. Uma vez que são fortes inibidores de enzimas, é necessário removê-los. A purificação por filtração em gel (ex. Sephadex G-200), juntamente com polivinilpirrolidona (PVP), tem sido referida com uma boa alternativa (Kuske *et al.*, 1998; Koonjul *et al.*, 1999). Uma outra opção que parece ter eficácia consiste na incorporação de PVP no gel de electroforese (Young *et al.*, 1993). Monteiro *et al.* (2001) removeram os inibidores de PCR das suas amostras produzindo blocos de agarose misturada com o DNA, que foram lavados em Tris-EDTA com agitação antes da amplificação.

O protocolo de extracção utilizado tem influência não só no rendimento em ácidos nucleicos obtido, como na composição bacteriana das amostras. Liphay *et al.*, (2004) compararam a lise celular por sonicação, maceração-congelamento-descongelamento e utilização de esferas de vidro, tendo verificado que cada método deu origem a diferentes padrões em análise por DGGE. O método utilizando esferas de vidro foi o que revelou um maior número de espécies bacterianas. O rendimento em ácidos nucleicos, no entanto, parece estar mais relacionado com as características do solo (nomeadamente o seu conteúdo em nucleases e outros compostos que promovam a degradação dos ácidos nucleicos ou que sejam extraídos simultaneamente com estes), do que propriamente com o método de lise celular. Com a sonicação e maceração-congelamento-descongelamento foi obtido DNA de maior peso molecular. Da mesma forma, Hurt *et al.* (2001) obtiveram DNA genómico com 4-9Kb utilizando esferas de vidro e maior que 23Kb com combinação de lise mecânica, física e química. Assim, o método de extracção influencia a diversidade e o tipo de comunidade funcional.

Hurt *et al.* (2001) combinaram uma baixa temperatura com uma solução desnaturante no início para prevenir a actividade das nucleases. As amostras do presente estudo, obtidas por extracção directa a partir do solo, começaram por ser trabalhadas num período em que a temperatura ambiente oscilava entre os 8 e os 14°C (dados obtidos a partir da página electrónica do Instituto de Meteorologia – www.meteo.pt), tendo o período de análise mais intensiva ocorrido a partir de Março-Abril de 2007, quando foram registadas temperaturas diurnas médias de 13-24°C (dados obtidos a partir da página electrónica do Instituto de Meteorologia – www.meteo.pt). Embora as amostras tivessem sempre sido armazenadas em alíquotas a -80°C e guardadas em gelo durante a sua manipulação, é possível que esta, combinada com temperaturas mais altas, tenha propiciado a actividade de nucleases, o que inviabilizou as amostras.

A extracção com tiocianato de guanidina é útil para a obtenção de RNA de boa qualidade, pois contribui para a sua estabilização, mas não é adequada para DNA de solo (Hurt *et al.*, 2001, Miller *et al.*, 1999). Uma vez que a mancha correspondente ao RNA observada nos géis em que foram corridas as amostras totais resultantes da extracção de ácidos nucleicos directamente a partir do solo era bastante forte, em algumas alíquotas, destinadas a PCR do DNA, procedeu-se à digestão do RNA com RNase, de modo a que este não interferisse na reacção. No entanto, este tratamento com não pareceu alterar a intensidade da mancha na parte inferior dos géis, o que significa que essas manchas

podem ser DNA degradado, uma vez que não foi observado RNA no gel desnaturante. Uma explicação alternativa pode ser que o RNA se tenha degradado no decorrer dos procedimentos.

Foram ainda testados outros métodos de extracção de DNA, como o baseado no método utilizado por Miller *et al.* (1999) e vários kits comerciais. No entanto, estes não se revelaram eficazes. Relativamente à baixa eficácia dos kits, esta poderá ser devida à inibição da ligação do material genético às colunas, pelos contaminantes do solo.

Uma análise programada foi a quantificação da expressão da nitrogenase específica para cada grupo diazotrófico encontrado, através de PCR em tempo real, utilizando o RNA extraído simultaneamente com o DNA. Com estes dados pretendia-se verificar a importância de cada *taxum* para a fixação de azoto livre em cada localidade. Uma vez que a presença das RNases é ubíqua (Gause e Adamovicz, 1995) e as amostras rapidamente se degradaram não foi impossível alcançar este objectivo.

Dos vários solos testados com diferentes métodos de extracção descritos na bibliografia (p. ex. Miller *et al.* 1999), os agrícolas são os que apresentam piores resultados, o que vem reforçar a ideia de que o trabalho com estas amostras é extremamente difícil. Miller *et al.* (1999) usaram CTAB e PVP para eliminar a contaminação das amostras de DNA com polissacarídeos e ácidos húmicos, respectivamente. No entanto, para cada tipo de solo tem que ser testado e adaptado um protocolo diferente.

Assim, na impossibilidade de continuar a utilizar amostras de DNA extraídas directamente do solo, recorreu-se a métodos culturais, em meios PCA e manitol-levedura, para a obtenção de DNA das espécies cultiváveis nessas condições. Uma vez que nestas culturas vão crescer apenas as espécies aeróbias, que conseguem utilizar os nutrientes fornecidos e que possuem uma elevada capacidade competitiva, não é viável a quantificação da expressão da nitrogenase, pois em cultura não serão reflectidas as proporções verdadeiras contidas nas amostras no momento da sua recolha. É, pois, urgente otimizar métodos que permitam a obtenção de RNA em boas condições e representativo das comunidades presentes nos solos. Burgmann *et al.* (2003) focam este problema, uma vez que a sua solução contribuiria para o estudo da regulação genética no solo, não só a nível da enzima nitrogenase, como de outras enzimas envolvidas nos ciclos dos elementos do solo.

Por outro lado, a razão RNA/DNA é útil para avaliar o estado das comunidades, uma vez que permite saber se a resposta a factores ambientais é devida a aumento/diminuição da população ou somente da actividade. Assim, é óbvia a vantagem da extracção simultânea de DNA e RNA (Hurt *et al.*, 2001).

4.2 – Caracterização da diversidade das comunidades bacterianas através da amplificação do DNA directamente extraído do solo *versus* DNA extraído de culturas bacterianas, por PCR-RFLP

A extracção directa do DNA a partir de amostras de solo é mais rápida e económica e permite ultrapassar os problemas relacionados com espécies não cultiváveis. No entanto, por vezes, essas amostras não são trabalháveis, uma vez que contêm elevadas quantidades de contaminantes que degradam o DNA e inibem a reacção de PCR. Nestes casos, é necessário recorrer a métodos culturais.

Fazendo um balanço geral da caracterização das comunidades microbianas através da clonagem, verificou-se que: (1) com as árvores filogenéticas construídas a partir dos perfis de RFLPs, embora sejam menos exactas, foram obtidos resultados semelhantes aos obtidos utilizando sequências nucleotídicas; (2) embora com par de *primers* dirigido à amplificação do gene 16S rRNA para amostras de DNA isolado directamente do solo se detecte uma maior diversidade em termos de classes, os clones são afiliados com outros para os quais não foi possível identificar a espécie ou género a que pertencem, apenas um *taxum* mais elevado, como a classe; (3) verificou-se que o par de *primers* 16S tem alguma capacidade de detectar espécies diazotróficas, embora esta seja muito limitada; (4) os *primers* específicos para o gene *nifH*, de facto, só detectaram espécies fixadoras de azoto, embora os específicos para os géneros *Azotobacter* e *Rhizobium* tenham detectado os genes *nifH* pertencentes a bactérias de outros géneros; (5) os clones detectados por cultura são diferentes dos detectados com DNA extraído directamente das amostras de solo; (6) existem mais espécies de bactérias diazotróficas nas amostras de solo sob agricultura biológica do que nos respectivos controlos, nos quais estas são praticamente inexistentes; (7) para os clones obtidos por cultura por amplificação do gene *nifH*, no período de Primavera, a diversidade foi menor do que no Inverno.

Com o par de *primers* 16S apenas foi detectado um clone afiliado com bactérias diazotróficas: *Enterobacter* sp., na amostra de Amareleja 0-25cm, correspondente ao período de Primavera. Note-se que, para a mesma amostra, este clone não foi detectado com os *primers* específicos para o gene *nifH*. Após análises *in silico*, utilizando o software disponibilizado pelo NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>), verificou-se que estes *primers* a jusante e a montante apenas apresentavam 65 e 70% de similaridade com a sequência do gene *nifH* de *Enterobacter* sp. EU0993771.1, respectivamente, dando origem a um fragmento inespecífico de 157 pares de bases (tendo o produto esperado um tamanho de 461pb). Utilizando o mesmo programa de alinhamento de sequências, não foi encontrada similaridade significativa entre as sequências dos genes *nifH* de *Enterobacter* sp. EU0993771.1 e *Klebsiella pneumoniae* X13303.1, uma espécie detectada com este par de *primers*.

Relativamente aos *primers* utilizados neste trabalho, para o gene *nifH*, seria de esperar que o par geral para este gene detectasse um maior número de espécies que *primers* mais específicos, como os direccionados para o *nifH* dos géneros *Azotobacter* e *Rhizobium*. No entanto, verificou-se o contrário, tendo o par UA apenas detectado um clone afiliado com *Klebsiella pneumoniae* e outro semelhante a *Paenibacillus* sp, para as amostras de Inverno de Amareleja (0-25cm) e Santa Iria, respectivamente e *Sinorhizobium meliloti*, para amostra de Santa Iria, correspondente ao período de Primavera. Por outro lado, os *primers* específicos para o género *Azotobacter* detectaram um clone afiliado com o género *Raoultella* e os *primers* específicos para o género *Rhizobium* detectaram clones semelhantes aos géneros *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Magnetospirillum* e *Azospirillum*. A sequência do gene *nifH* de *Raoultella terrigena* DQ431161.1 partilha 80% de homologia com a sequência deste gene de *Azotobacter vinelandii* M20568.1 (sequências alinhadas utilizando o programa de alinhamento de duas sequências disponibilizado pelo NCBI). A ineficiência do par de *primers* UA e a inespecificidade do par a1 pode dever-se ao facto de estes *primers* serem degenerados, pelo que dão origem a muitos produtos inespecíficos, que não foram seleccionados para sequenciação por não terem o tamanho esperado e, por outro lado, por se formarem estes produtos inespecíficos, a quantidade de produto específico diminui muito, o que pode impossibilitar a sua detecção. Burgmann *et al.* (2004) verificaram que o par de *primers*

UA não foi capaz de amplificar o gene *nifH* de várias espécies diazotróficas de referência.

Em relação ao par de *primers* gerais para o gene 16S rRNA, estes detectaram uma elevada diversidade de bactérias em termos de classes (alfa, beta, gama e delta-Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Firmicutes e Flavobacteria). A sua baixa especificidade para espécies diazotróficas poderá estar relacionada com o seu desenho, em que poderão não ter sido incluídas espécies pertencentes a este grupo fisiológico. Com o mesmo par de *primers* para o gene 16S rRNA, para uma fonte hidrotermal no Golfo da Califórnia, Dhillon *et al.* (2003) detectaram bactérias pertencentes às classes gama, épsilon e delta-Proteobacteria, Acidobacteria, Flavobacteria, bactérias verdes não sulfúricas, Verrucomicrobia, Espiroquetas, Mollicutes e Firmicutes.

Provavelmente devido a alguma degradação, com o DNA extraído directamente do solo (no período de Inverno), para a maior parte das amostras, com o par de *primers* 16S, apenas foi possível identificar as classes (nível taxonómico elevado) com as quais os clones são afiliados. Para as amostras obtidas por cultura em meio PCA, foi possível chegar à espécie, sendo que os clones similares ao género *Bacillus* detectados, pertencem à classe Firmicutes, uma classe não identificada nas amostras de DNA extraídas directamente a partir do solo, bem como a classe Flavobacteria. Em contrapartida, em cultura não foram detectados clones afiliados com as classes alfa, beta e delta-Proteobacteria, Actinobacteria e Acidobacteria. Este facto pode dever-se às características do meio, que não permitiram o seu crescimento, ou às características das próprias espécies, em que as mais bem adaptadas cresceram mais rapidamente, impedindo o crescimento das outras. Por outro lado, as diluições das amostras necessárias para que não ocorra inibição da reacção de PCR poderão ser de tal ordem, que não permitam a amplificação de fragmentos muito pouco abundantes, como poderá ser o caso dos pertencentes a espécies diazotróficas. Assim, se por um lado o método de extracção directa de DNA permite ultrapassar o problema dos organismos não cultiváveis, por outro, os métodos culturais com meios específicos poderão evidenciar espécies menos abundantes, eventualmente interessantes para determinados estudos.

No que diz respeito às características do meio de cultura, o *Azotobacter vinelandii* é uma bactéria pleomórfica, sendo que 5% (p/v) de peptona (nomeadamente o seu conteúdo em glicina) causa o aparecimento de formas de transição denominadas filamentosas, que são osmoticamente frágeis. Com a concentração utilizada neste

trabalho (1%, p/v), a fase lag do crescimento é prolongada e começam a haver algumas células alongadas e de maior volume (Vela & Rosental, 1972). Esta pode ser uma razão pela qual o género *Azotobacter* foi detectado em tão poucas amostras. Por a fase lag ser prolongada, outras espécies mais competitivas podem ter-se desenvolvido mais depressa, ocupando o espaço e utilizando os nutrientes. Para as amostras de DNA obtidas directamente a partir do solo (período de Inverno), com o par de *primers* específico para o gene *nifH* do género *Azotobacter* foram obtidas amplificações para Serpa (controlo) e Santa Iria. Estas foram clonadas e sequenciadas com sucesso. No entanto, obtiveram-se bandas também para as amostras de Serpa, que não foi possível recuperar, pois entretanto degradaram-se. Nas amostras cultivadas não foi detectado este género.

Pressupõe-se que as filogenias de 16S ribossomal reflectem a história evolutiva dos microrganismos (Woese, 1987). Se fosse possível a definição de uma árvore evolutiva única baseada no 16S ribossomal, esta definiria também a emergência de novas estratégias metabólicas. No entanto, por serem hoje reconhecidos fenómenos de transferência lateral na evolução dos microrganismos, há uma certa incerteza na interpretação destas relações filogenéticas (Woese, 1987). A vantagem da utilização de genes funcionais nos estudos de diversidade reside na ligação directa que estes estabelecem com o grupo fisiológico alvo. A filogenia baseada no gene *nifH* correlaciona-se bem com a estabelecida pelo 16S rRNA, embora existam nitrogenases alternativas e cópias múltiplas do gene (Burgmann *et al.*, 2004). Com o par de *primers* específico para o gene *nifH* do género *Azotobacter* Burgmann *et al.* (2004) detectaram clones afiliados com alfa, beta e gama-Proteobactérias e com o par específico para este gene do género *Rhizobium* detectaram clones similares à classe alfa-Proteobacteria. Na caracterização da comunidade diazotrófica da rizosfera de ervas marinhas num pântano salgado, utilizando métodos culturais, bioquímicos e moleculares (hibridação “*dot blot*”) Bagwell *et al.* (1998) detectaram *Vibrio diazotrophicus*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter diazotrophicus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Rhizobium meliloti* e *Rhizobium leguminosarum*.

Nas fontes hidrotermais, assim como em ambientes naturais ou de agricultura onde não é adicionada uma fonte externa de azoto fixado, este é limitante. Nestas condições, a comunidade diazotrófica assume um papel muito importante. Nas fontes hidrotermais de Juan de Fuca (na costa noroeste da América do Norte), com *primers* específicos para o gene *nifH* Mehta *et al.* (2003) identificaram clones afiliados com as

classes alfa, beta, delta e gama-Proteobacteria, e com cianobactérias, bactérias metanogénicas e diazotróficas com nitrogenases alternativas. Um aspecto interessante é que estas bactérias identificadas neste ambiente possuem sequências do gene *nifH* semelhantes às de bactérias encontradas, por exemplo, em solos de florestas tropicais (Mehta *et al.*, 2003), o que revela um elevado grau de conservação deste gene, independentemente das condições em que se encontram as espécies que o possuem.

4.3 – Electroforese em gel com gradiente térmico (TGGE)

O gene escolhido para o TGGE foi o *nifH* do género *Azotobacter*, uma vez que para este o PCR é simples e o fragmento gerado tem um tamanho menor que 500pb, o limite máximo de resolução do gel (Myers *et al.*, 1985). O par de *primers* utilizado foi o *nifHg1Fw* e *nifHg1Rv*, tendo sido adicionada uma *clamp* GC no terminal 5' do *primer Fw*, de modo a constituir um domínio de difícil desnaturação, o que permite uma transição lenta do estado nativo para o estado semi-desnaturado da molécula de DNA (Myers *et al.*, 1985).

A vantagem da utilização do TGGE relativamente ao DGGE reside na simplicidade, rapidez e reprodutibilidade do primeiro relativamente ao segundo, uma vez que a criação de um gradiente químico linear (normalmente com formamida) é morosa e difícil de reproduzir. As suas limitações são o poder de resolução (até 500pb), uma vez que quanto maior for uma sequência, mais específica se torna (Meyers *et al.*, 1985) e nem todas as regiões de um gene são separadas eficientemente, apesar da variação na sua sequência. Além disso, há formação de heterodúplexes e quimeras durante o PCR, que pode levar a uma estimativa exagerada da diversidade (Jackson *et al.*, 2000). Idealmente, a posição filogenética dos *taxa* deve ter como base a análise de sequências completas.

Curiosamente, parecem existir mais trabalhos sobre métodos de extracção de DNA e caracterização de comunidades do solo utilizando o DGGE, comparativamente com o TGGE. A maior parte destes estudos não identifica as espécies contidas nas amostras, apenas analisa e compara os *fingerprints* de cada comunidade em termos de diversidade (Smalla *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2004).

No presente estudo considerou-se que cada banda do perfil das amostras corresponde a uma espécie/estirpe diferente. Não foram calculados índices de diversidade, uma vez que a quantidade de produto de PCR foi suficiente para obter perfis

com nitidez aceitável numa pequena parte das amostras. Por este mesmo motivo, não se procedeu à excisão das bandas, para reamplificação e posterior sequenciação. Teria sido interessante repetir o processo até à sequenciação, para comparar a potência do TGGE *versus* clonagem/RFLP, uma vez que os resultados em termos de bandas obtidas por TGGE não correspondem à diversidade observada por PCR-RFLP. Os índices de diversidade poderiam ser calculados com base no facto de uma banda corresponder a uma espécie/estirpe diferente e utilizando a intensidade de cada banda, medida por densitometria (por exemplo com o *software* BioNumerics), como medida do “número” de indivíduos pertencentes a essa espécie.

Além das limitações da técnica já referidas, a coloração com nitrato de prata, embora mais sensível do que com brometo de etídeo, tem por vezes níveis elevados de background (Felske *et al.*, 1996). Apesar destas limitações, é uma técnica muito útil, que permite em simultâneo a determinação de *fingerprints* das comunidades microbianas e a identificação dos organismos representados pelas bandas desses perfis por sequenciação.

4.4 – Relação entre a diversidade da comunidade diazotrófica e as características do solo

Os parâmetros físico-químicos mais importantes na definição da fertilidade de um solo são o fósforo, o potássio e o azoto (Varenes, 2003). No entanto, estes só se encontram numa forma biodisponível quando agregados a colóides. Uma medida desta biodisponibilidade é a capacidade de troca dos solos em termos de bases (cálcio, magnésio, sódio, potássio e hidrogénio). O grau de saturação é calculado pela razão entre todas as bases excepto o hidrogénio e o total de bases presentes num dado solo, visto que o hidrogénio é trocado por elementos menos interessantes para as plantas, como o alumínio. Uma elevada salinidade do solo (que se traduz numa elevada condutividade) inibe o crescimento da maioria das espécies vegetais e bacterianas. O calcário inibe a absorção de ferro e do fósforo (Marscher, 1997).

No que diz respeito aos índices de diversidade e equidade, estes são muito superiores nos solos sob agricultura biológica comparativamente com solos mobilizados (controlos). Este facto pode dever-se à inibição do crescimento de certos microrganismos por parte dos compostos azotados introduzidos neste tipo de prática (Ledgard e Giller, 1995). Da mesma forma, Pereira *et al.* (2006) compararam a diversidade de comunidades

microbianas de um local de floresta não alterado pelo homem e um local bastante utilizado para o cultivo de tomate, feijão e milho, utilizando o gene 16S rRNA. Encontram uma maior diversidade de microrganismos no solo de floresta, sendo que as populações identificadas pertencem às classes Acidobacteria, Actinobacteria, Flavobacteria, Firmicutes, Proteobacteria e Verrucomicrobia, distribuídas em diferentes proporções em ambos os terrenos, de acordo com as condições do solo. Estes dados vêm reforçar a importância da comunidade diazotrófica para o sucesso da agricultura biológica.

De forma geral, as amostras mais diversas em termos de espécies diazotróficas são as de Santa Iria e as menos diversas são os controlos e as amostras de Amareleja. Verifica-se ainda que as comunidades são diferentes nas diferentes localidades: no período de Inverno, em Santa Iria e Amareleja predominam os géneros *Pseudomonas*, *Paenibacillus* e *Klebsiella* (*Raoultella*, em Santa Iria, que anteriormente estava englobada no género *Klebsiella*). Em Serpa foram detectados os géneros *Magnetospirillum* e *Sinorhizobium*. No período de Primavera, em Santa Iria predominam espécies simbióticas, do género *Sinorhizobium*, sendo também encontrada uma espécie deste género em Serpa. Em Amareleja, para ambas as profundidades, predomina o género *Azospirillum*, existindo ainda um clone afiliado com *Paenibacillus* sp., ambos de vida livre. O género *Azospirillum* foi igualmente detectado em Serpa e no controlo de Santa Iria. Estas diferenças poderão estar relacionadas com as características dos solos, que influenciam não só a ocorrência e abundância das espécies diazotróficas de vida livre, como são fundamentais para o estabelecimento de leguminosas e respectivas bactérias simbióticas.

Em termos de capacidade de troca, ambas as amostras de Amareleja (0-25cm e 25-50cm) e respectivo controlo apresentam valores uma ordem de grandeza inferior aos valores de Serpa e Santa Iria (5.25, 6.78, 5.64 e 15.23 e 11.41, respectivamente) (tabela II, do anexo II). O grau de saturação máximo em Amareleja não ultrapassa os 60%, enquanto Serpa e Santa Iria têm uma saturação de 86.9 e 80.7, respectivamente. O controlo de Santa Iria tem uma capacidade de troca e um grau de saturação um pouco mais baixos que os do local de amostragem (10 e 70%, respectivamente). De forma geral, todas as amostras e respectivos controlos possuem uma baixa carga de matéria orgânica e baixa condutividade (tabela II, do anexo II). Em termos de fósforo, potássio, carbono e azoto, bem como diversos metais (ferro, manganês, zinco e cobre), uma vez

mais, o solo de Amareleja é o mais pobre, bem como o controlo de Santa Iria (tabela II, do anexo II). Associando esta baixa fertilidade à perda da sementeira de leguminosas em Amareleja, ou a sua ausência nos controlos, pode explicar-se a menor biodiversidade microbiana em termos de espécies diazotróficas observada nestes locais. Os valores de pH dos solos de Amareleja são de 6.5 (0-25cm) e 6.7 (25-50cm) e 7.0 no controlo, enquanto o pH dos solos de Serpa e Santa Iria é 6.9 e 7.4, respectivamente. O controlo de Santa Iria tem um pH de 6.4. As bactérias pertencentes ao género *Azotobacter* conseguem ser activas a pH inferior a 6 (Correia, 1986). Desta forma, o pH não parece estar relacionado com a não detecção deste género em algumas amostras e controlos. Como já foi referido, não foram recolhidos dados físico-químicos do controlo de Serpa.

Relativamente à ocorrência de espécies diazotróficas simbióticas, verificou-se a presença de *Sinorhizobium medicae* nas três localidades, sendo que o seu simbiote (plantas pertencentes ao género *Medicago*) apenas foi introduzido em Serpa e Santa Iria, o que sugere que em Amareleja seja espontâneo. Além de clones afiliados com esta espécie, em Santa Iria foram também detectados clones semelhantes a *Sinorhizobium meliloti*, sendo que esta localidade foi a única onde foram introduzidos trevos do género *Melilotus*. Estes dados reiteram a importância da presença de leguminosas adequadas ao estabelecimento de simbioses com bactérias diazotróficas para o sucesso da fixação biológica do azoto em solos sob um regime de agricultura biológica.

O género diazotrófico *Azospirillum* (detectado nas amostras de Amareleja e Serpa), presente na rizosfera, é um importante promotor do crescimento de plantas, responsável pela sua regulação através da produção e secreção hormonal. Após a inoculação com *Azospirillum*, ocorrem alterações na morfologia da raiz das plantas, que lhes permitem uma tomada de minerais mais eficiente (Steenhoudt e Vanderleyden, 2000). Da mesma forma, as bactérias não diazotróficas *Chryseobacterium balustinum*, *Pseudomonas fluorescens* (ambas detectadas nas amostras de Santa Iria, correspondentes aos períodos de Inverno e Primavera, respectivamente, com os primers 16S) e *Serratia fonticola* habitam a rizosfera e promovem o crescimento das plantas o que, indirectamente, potencia a fixação biológica do azoto (García *et al.*, 2004).

O facto de os clones afiliados com a bactéria *Escherichia coli*, uma bactéria de origem indiscutivelmente fecal, (amplificação do gene 16S rRNA, correspondente a amostras recolhidas no período de Inverno, por extracção directa do DNA) terem sido

detectados apenas em solos controlados poderá estar relacionado com a utilização de estrumes como fertilizantes e/ou à presença de gado nestes locais.

No período de recolha de Inverno, na localidade de Amareleja, o solo encontrava-se parcialmente alagado, devido às chuvas recentes. A inundação cria um ambiente anaeróbio (excepto na interface com a superfície), o que favorece a fixação de azoto por microrganismos anaeróbios de vida livre no solo (como bactérias do género *Clostridium*). Na zona da rizosfera ocorre um fluxo de oxigénio destas para o solo, o que favorece a fixação de azoto por microrganismos microaerofílicos. As condições de inundação são também ideais ao desenvolvimento de fluorescências de cianobactérias (Ledgard e Giller, 1995). Não foram detectados clones afiliados com cianobactérias nesta localidade. Uma vez que a maior parte dos clones identificados proveio de cultura em aerobiose, e aqueles obtidos por extracção directa de DNA a partir de amostras de solo apenas foi possível identificar a classe a que pertencem, não é possível estabelecer uma relação entre o alagamento e a abundância e/ou predominância destas espécies. Clones semelhantes ao género *Azospirillum*, que é microaerofílico (Steenhoudt e Vanderleyden, 2000), foram identificados nestas amostras com os primers a1, mas apenas no período de Primavera.

Numa época em que a má utilização dos recursos tem vindo a levar a grandes problemas ambientais, é necessário desenvolver sistemas de produção ecologicamente viáveis, que visem a obtenção de produtos de qualidade e a manutenção da biodiversidade e dos recursos naturais. A produção de azeitona e azeite ocupa um lugar importante na economia portuguesa, pelo que a sua produção através de agricultura biológica terá como vantagens um menor custo em termos de fertilizantes químicos e uma maior qualidade ambiental. A utilização de bactérias diazotróficas e plantas leguminosas (hospedeiros para as bactérias simbióticas) parece ser uma boa opção à utilização de fertilizantes químicos, como se pôde verificar através dos resultados deste estudo. Por um lado, a cobertura vegetal protege o solo contra a erosão e melhora o nível de matéria orgânica, o que leva a um aumento de fertilidade e capacidade de infiltração da água. Em adição, as plantas leguminosas, cujos nódulos radiculares são colonizados por bactérias diazotróficas simbióticas permitem a fixação de azoto. Note-se ainda que até à data parecem não existir estudos nesta área, que evidenciem a importância da comunidade diazotrófica na fixação biológica do azoto em solos sob regime de agricultura biológica.

5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A qualidade do solo e a produtividade vegetal estão intrinsecamente ligadas à quantidade, actividade e diversidade microbiana do solo. É, pois, essencial que os métodos de avaliação das comunidades microbianas dos solos sejam eficazes traduzindo o mais fielmente possível a qualidade do solo. Os métodos tradicionais baseados em cultura, como já foi referido têm fortes limitações e, por esse facto a procura e a implementação de novos métodos que traduzam com maior fidelidade a diversidade, distribuição e comportamento dos diferentes grupos fisiológicos da microbiota do solo têm vindo a emergir. Entre eles estão as abordagens moleculares que foram aplicadas no presente trabalho em parte, contudo outros métodos poderão no futuro ser explorados como os perfis dos ácidos gordos dos fosfolípidos que podem traduzir a presença e correspondente abundância de alguns microrganismos em particular ou grupos de microrganismos para os quais são já conhecidos os perfis.

A avaliação da população bacteriana total num determinado solo é outro parâmetro que pode contribuir de modo significativo para a apreciação da qualidade do solo. A contagem directa através de métodos de microscopia tem-se revelado mais precisa que os métodos com etapas de crescimento, uma vez que ultrapassa os problemas de organismos não cultiváveis (Kepner e Pratt, 1994). Para esta avaliação sugere-se que sejam utilizados métodos que permitam uma distinção entre células viáveis e não viáveis sem necessidade de recorrer aos métodos culturais, como a coloração das células com corantes fluorescentes (p. ex. laranja de acridina ou DAPI ou ainda o sistema LIVE/DEAD da Molecular Probes) (Frischer *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 1995). Por outro lado, a hibridação *in situ* com sondas fluorescentes (FISH) direccionadas para uma determinada sequência de DNA ou RNA, veio tornar possível a detecção e contagem de bactérias de populações específicas. A combinação destes dois tipos de técnicas permite a identificação e quantificação de bactérias específicas, bem como a determinação da sua abundância na comunidade total (Neef *et al.*, 1998). Será, portanto, conveniente a quantificação da população total e a de grupos específicos.

O número de cópias do gene 16S rRNA reflecte as estratégias ecológicas de um dado organismo. Da mesma forma, o número de cópias dos genes funcionais pode variar, podendo encontrar-se tanto no cromossoma como em plasmídeos. Para avaliação de um determinado processo mediado por microrganismos do solo é importante a quantificação

das enzimas totais disponíveis para o executarem através, por exemplo, de PCR em tempo real com *primers* universais, uma vez que o mesmo processo pode ser executado por microrganismos de diferentes *taxa* (Sharma et al., 2007). No entanto, no contexto específico deste trabalho, pode ser mais importante definir que espécie ou grupos de espécies que estão a contribuir mais para a fixação do azoto, pelo que seria recomendável, após identificação da comunidade diazotrófica, desenhar *primers* para PCR em tempo real específicos para cada espécie. Desta forma seria, eventualmente, possível definir uma estratégia que privilegiasse o desenvolvimento destas espécies ou que consistisse na sua introdução, de forma a aumentar o fornecimento de azoto na forma assimilável pela cultura que se pretende desenvolver.

Uma vez que as espécies bacterianas nativas são difíceis de substituir, por se encontrarem adaptadas ao meio onde vivem (Ledgard e Giller 1995), seria interessante avaliar a eficácia da inoculação da mistura comercial de bactérias fixadoras de azoto nas leguminosas plantadas nas localidades estudadas. Se fosse possível obter amostras de DNA das bactérias introduzidas, este poderia ser comparado com aquele que foi identificado ao longo deste trabalho.

A utilização de métodos culturais mais expeditos na avaliação da comunidade microbiana de um solo será outro instrumento a explorar. Aquele que parece ter uma grande aceitação é o sistema BIOLOG (Calbrix *et al.* 2007; Liu *et al.* 2007; Monokrousos *et al.*, 2006; van Bruggen *et al.* 2006;) que se baseia na utilização de 95 fontes de carbono diferentes (Garland e Mills, 1991), sendo a detecção de cada uma é efectuada através da redução do corante cloreto de 1,2,3-trifenil-tetrazolio (TTC) que resulta numa mudança de cor que pode ser quantificada por espectrofotometria. O perfil dos substratos utilizados entre as diferentes amostras de solos é uma indicação das diferenças nos grupos fisiológicos funcionais de cada comunidade microbiana. É importante referir que a utilização deste método é, na maioria dos estudos referidos, acompanhado pela utilização de outros métodos não dependentes de cultura como o DGGE.

Uma vez que Amareleja revelou ser a localidade menos rica em espécies fixadoras de azoto e plantas leguminosas, provavelmente devido à baixa fertilidade do solo, algumas recomendações poderão ser tidas em conta para melhorar esta situação, como a introdução de plantas leguminosas adaptadas às condições específicas do solo inoculadas com bactérias fixadoras de azoto compatíveis. Para o estabelecimento destas leguminosas será útil também

proceder à fertilização com estrume combinado com minerais de origem natural e monitorizar o sucesso destas medidas através de mini-ensaios com diferentes leguminosas compatíveis com o solo, inoculadas com estirpes que à partida tenham maior possibilidade de se estabelecerem.

6 – REFERÊNCIAS

- Bagwell, C. E., Piceno, Y. M., Ashburne-Lucas, A e Lovell, C. R. (1998). Physiological diversity of the rhizosphere diazotroph assemblages of selected salt marsh grasses. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4276-4282.
- Bai, Q., Gattinger, A. e Zelles, L. (2000). Characterization of microbial consortia in paddy rice soil by phospholipids analysis. *Microbial Ecology* 39: 273-281.
- Bossio, D. A., Scow, K. M., Gunapala, N. e Graham, K. J. (1998). Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management, season and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microbial Ecology* 36: 1-12.
- van Bruggen, A. H. C., Semenov, A. M., van Diepeningen, A. D., Vos, O. J. e Blok, W. J. (2006). Relation between soil health, wave-like fluctuations in microbial populations and soil-borne plant disease management. *European Journal of Plant Pathology* 115: 105-122.
- Bulen, W. A. e LeComte, J. R. (1962). Isolation and properties of a yellow-green fluorescent peptide from *Azotobacter* medium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 9: 523-528.
- Burgmann, H., Widmer, F., Sigler, W. Von e Zeyer, J. (2003). mRNA extraction and reverse transcription-PCR protocol for detection of *nifH* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1928-1935.
- Burgmann, H., Widmer, F., Sigler, W. Von e Zeyer, J. (2004). New molecular screening tools for analysis of free-living diazotrophs in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 240-247.
- Cairns, M. J., e Murray, V. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separate on polyacrylamide gels. *BioTechniques* 17:915–919.

- Calbrix, R., Barry, S., Chabrerie, O., Fourrie, L. e Laval, K. (2007). Impact of organic amendments on the dynamics of soil microbial biomass and bacterial communities in cultivated land. *Applied Soil Biology* 35: 511-522.
- Cha, R. S. e Thilly, W. G. (1995). Specificity, efficiency and fidelity of PCR. In *PCR Primer: a Laboratory Manual*. Dieffenbach, C. W. e Dveksler, G. S. (Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. E. U. A. 714p.
- Chaudhuri, S. R., Pattanayak, A. K. e Thakur, A. R. (2006). Microbial DNA extraction from samples with varied origin. *Current Science* 91:1697-1700.
- Cole, R. J. e Gherna, R. L. (1994). Nutrition and Media. In *Methods for General and Molecular Microbiology*. Gerhardt, P. (Editor-in-Chief), Murray, R. G. E., Wood, W. A., Krieg, N. R. American Society for Microbiology. Washington, D. C. 791p.
- Correia, A. A. D. (1986). *Bioquímica nos Solos, nas Pastagens e Forragens*. Edições da Fundação Calouste Gulbenkian. Porto. 789p.
- Costa, R., Gomes, N. C. M., Milling, A., Smalla, K. (2004). An Optimized Protocol for Simultaneous Extraction of DNA and RNA from Soils. *Brazilian Journal of Microbiology* 35: 230-234.
- Dahllof, I., Bailie, H. e Kjelleberg, S. (2000). rpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology* 66:3376-3380.
- Dhillon, A., Teske, A., Dillon, J., Stahl, D. A. e Sogin, M. L. (2003). Molecular Characterization of sulphate-reducing bacteria in the Guaymas Basin. *Applied and Environmental Microbiology* 69:2765-2772.
- Drancourt, M, Bollet, C., Carta, A. e Rousselier, P. (2001). Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and

Raoultella planticola comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51: 925-932.

Engels, C. e Marschner, H. (1995). Plant Uptake and Utilization of Nitrogen. *In* Nitrogen Fertilization in the Environment. Bacon, Peter Edward (Ed.). Marcel Dekker, Inc. Sydney, Austrália. 608p.

Felske, A., Engelen, B., Nubel, U. e Backhaus, H. (1994). Direct Ribosome Isolation from Soil To Extract Bacterial rRNA for Community Analysis. Applied and Environmental Microbiology 62: 4162-4167.

Frischer, M.E., Danforth, J. M., Healy, M. A. N. e Saunders, F. M. (2000). Whole cell versus total RNA extraction for analysis of microbial community structure with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes in salt marsh sediments. Applied and environmental Microbiology 66: 3037-3043.

García, J. A. L., Probanza, A., Ramos, B., Barriuso, J. e Mañero, F. J. G. (2004). Effects of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) and *Sinorhizobium fredii* on biological nitrogen fixation, nodulation and growth of *Glycine max* cv. Osumi. Plant and Soil 267: 143-153.

Garland, J. L. e Mills, A. L. (1991). Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. Applied and environmental Microbiology 57: 2351-2359.

Gause, W. C. e Adamovicz, J. (1995). Use of PCR to quantitate relative differences in gene expression. *In* PCR Primer: a Laboratory Manual. Dieffenbach, C. W. e Dveksler, G. S. (Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. E. U. A. 714p.

Guerrero, A. (1988). Nueva Olivicultura. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 269p.

Herschkovitz, Y., Lerner, A., Davidov, Y., Rothballer, M., Hartmann, A., Okon, Y. e Jurkevich, E. (2005). Inoculation with their plant-growth-promoting

rhizobacterium *Azospirillum brasilense* causes little disturbance in the rhizosphere and rhizoplane of maize (*Zea mays*). *Microbial Ecology* 50: 277-288.

Holt, J. G. e Krieg, N. R. (1994). Enrichment and Isolation. *In* *Methods for General and Molecular Microbiology*. Gerhardt, P. (Editor-in-Chief), Murray, R. G. E., Wood, W. A., Krieg, N. R. American Society for Microbiology. Washington, D. C. 791p.

Hurt, R. A., Qiu, X., Wu, L., Roh, Y., Palumbo, A. V., Tiedje, J. M., Zhou, J. (2001). Simultaneous Recovery of RNA and DNA from Soils and Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4495-4503.

Jackson, C. R., Roden, E. E. e Churchill, P. F. (2000). Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Can Fail to Separate 16S rDNA Fragments with Multiple Base Differences. *Molecular Biology Today* 1: 49-51.

Jones, C. M. e Thies, J. E. (2007). Soil microbial community analysis using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of the bacterial ribosomal internal transcribed spacer regions. *Journal of Microbiological Methods* 69: 256–267.

Kepner, R. L. Jr. e Pratt, J. R. (1994). Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiological Reviews* 58: 603-615.

Koonjul, P. K., Brandt, W. F., Farrant, J. M. e Lindsey, G. G. (1999). Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of the polyphenolic contamination of RNA. *Nucleic Acids Research* 27: 915-916.

Kuske, C. R., Banton, K. L., Adorada, B. L., Stark, P. C., Hill, K. K. e Jackson, P. J. (1998). Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2463-2472.

Ledgard, S. F. e Giller, K. E. (1995). Atmospheric N₂ Fixation as an Alternative Nitrogen Source. *In* Nitrogen Fertilization in the Environment. Bacon, Peter Edward (Ed.). Marcel Dekker, Inc. Sydney, Austrália. 608p.

Lipthay, J. R., Enzinger, C., Johnsen, K., Aamand, J. e Sørensen, S. J. (2004). Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Biology and Biochemistry* 36:1607-1614.

Liu, X., Bagwell, C. E., Wu, L., Devol, A. H. e Zhou, J. (2003). Molecular diversity of sulfate-reducing bacteria from two different continental margin habitats. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 6073-6081.

Liu, B., Gumpertz, M. L., Hu, S. e Ristaino, J. B. (2007). Long-term effects of organic and synthetic soil fertility amendments on soil microbial communities and the development of southern blight. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 2302-2316.

Ludwig, J. A. e Reynolds, J. F. (1988). *Statistical Ecology: a primer on methods and computing*. John Wiley and Sons. New York. 352p.

Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. (2002). *Biology of Microorganisms*. 10ª Edição. Prentice Hall International Inc.. 986 p.

Manzano, M., Cocolin, L., Iacumin, L., Cantoni, C. e Comi, G. (2005). A PCR-TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) technique to assess differentiation among enological *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Microbiology* 101: 333-339.

Marscher, H. (1997). *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press. 2ª Edição. 889p.

Mehta, M. P., Butterfield, D. A. e Baross, J. A. (2003). Phylogenetic diversity of nitrogenase (nifH) genes in deep-sea and hydrothermal vent environments of the Juan de Fuca ridge. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 960-970.

Miller, D. N., Bryant, J. E., Madsen, E. L. e Ghiorse, W. C. (1999). Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4715-4724.

Monokrousos, N., Papatheodorou, E. M., Diamantopoulos, J. D. e Stamou, G. P. (2006). Soil quality variables in organically and conventionally cultivated field sites. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 1282-1289.

Monteiro, L., Gras, N. e Megraud, F. (2001). Magnetic immuno-PCR assay with inhibitor removal for direct detection of *Helicobacter pylori* in human feces. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 3778-3780.

Murray, R. G. E., Doetsch, R. N. e Robinow, C. F. (1994). Determinative and Cytological Light Microscopy. *In* *Methods for General and Molecular Microbiology*. Gerhardt, P. (Editor-in-Chief), Murray, R. G. E., Wood, W. A., Krieg, N. R. American Society for Microbiology. Washington, D. C. 791p.

Muyzer, G e Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73: 127-141.

Myers, R. M., Fischer, S. G., Maniatis, T. e Lerman, L. S. (1985). Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic acids research* 13: 3111-3129.

Neef, A., Amann, R., Schlesner, H. e Schleifer, K. H. (1998). Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology* 144:3257-3266.

Pau, R. N. (1989). Nitrogenases without molybdenum. *Trends in Biochemical Sciences* 14 (5): 183-186.

Peixoto, R. S., Coutinho, H. L. C., Rumjanek, N. G., Macrae, A. e Rosado, A. S. (2002). Use of rpoB and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. *Letters in Applied Microbiology* 35: 316-320.

Pereira, R. M., Silveira, E. L., Scaquitto, D. C., Pedrinho, E. A. N., Val-Moraes, S. P., Wickert, E., Carareto-Alves, L. M. e Lemos, E. G. M.(2006). Molecular characterization of bacterial populations of different soils. *Brazilian Journal of Microbiology* 37:439-447.

Peters, J. W., Fisher, K. e Dean, D. R. (1995). Nitrogenase structure and function: a biochemical-genetic perspective. *Annual Reviews of Microbiology* 49: 335-366.

Pitcher, D. G., Saunders, N. A., e Owen, R. J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology* 8: 151-156.

Prescott, L.M., Harley, J. P. e Klein, D. A. (1996). *Microbiology*. 3ª Edição. The McGraw-Hill Companies, Inc. E.U.A. 935p.

Riesner, D., Henco, K. e Steger, G. (1991). Temperature gradient gel electrophoresis: a method for the analysis of conformational transitions and mutations in nucleic acids and proteins. *In Advances in electrophoresis*. Chrambach A., Dunn, M. e Radola, B. J. (Eds). John Wiley & Sons Inc. Nova Iorque. 413p.

Rudi, K., Zimonja, M., Trosvik, P. e Naes, T. (2007). Use of multivariate statistics for 16S rRNA gene analysis of microbial communities. *International Journal of Food Microbiology* 120: 95–99.

Saleh-Lakha, S., Miller, M., Campbell, R. G., Schneider, K., Elahimanesh, P., Hart, M. M. e Trevors, J. T. (2005). Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges. *Journal of Microbiological Methods* 63: 1-19.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Volume 1. 3ªEdição. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 720p.

Sharma, S., Radl, V., Hai, B., Kloos, K., Fuka, M. M., Engel, M., Schauss, K., e Schloter, M. (2007). Quantification of functional genes from procaryotes in soil by PCR. *Journal of Microbiological Methods* 68: 445–452.

Smalla, K., Oros-Sichler, M., Milling, A., Heder, H., Baumgarte, S., Becker, R., Neuber, G., Kropf, S., Ulrich, A. e Tebbe, C. C. (2007). *Journal of Microbiological Methods* 69:470-479.

Smibert, R. M. e Krieg, N. R. (1994). Phenotypic Characterization. *In Methods for General and Molecular Microbiology*. Gerhardt, P. (Editor-in-Chief), Murray, R. G. E., Wood, W. A., Krieg, N. R. American Society for Microbiology. Washington, D. C. 791p.

Sprott, G. D., Koval, S. F. e Schnaitman, C. A. (1994). Cell Fractionation. *In Methods for General and Molecular Microbiology*. Gerhardt, P. (Editor-in-Chief), Murray, R. G. E., Wood, W. A., Krieg, N. R. American Society for Microbiology. Washington, D. C. 791p.

Steenhoudt, O. e Vanderleyden, J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 487-506.

Stevenson, B. S., S. A. Eichorst, J. T. Wertz, T. M. Schmidt, and J. A. Breznak. 2004. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (8): 4748–4755.

Varennes, A. (2003). *Produtividade dos solos e ambiente*. Escolar Editora. Lisboa. 485 p.

Väsänen, O., Haahtela, K., Bask, L., Kari, K., Salkinoja-Salonen, M. e Sundman, V. (1985). Diversity of *nif* gene location and nitrogen fixation among root-associated *Enterobacter* and *Klebsiella* strains. *Archives of Microbiology* 141: 123-127.

Vela, G. R. e Rosental, R. S. (1972). Effect of peptone on *Azotobacter* morphology. *Journal of Bacteriology* 111 (1): 260-266.

Woese, C. R. (1987). Bacterial Evolution. *Microbiology Reviews* 51 (2): 221-271.

Yates, C., Gillings, M. R., Davison, A. D., Altavilla, N. e Veal, D. A. (1998). Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biological Procedures Online* 1:40-47.

Young, C. C., R. L. Burghoff, L. G. Keim, V. Minak-Bernero, J. R. Lute, and S. M. Hinton. (1993). Polyvinylpyrrolidone-agarose gel electrophoresis purification of polymerase chain reaction-amplifiable DNA from soils. *Applied and Environmental Microbiology* 59:1972–1974.

Yu, W., Dodds, W. K., Banks, M. K., Skalsky, J. e Strauss, E. A. (1995). Optimal staining and sample storage time for direct microscopic enumeration of total and active bacteria in soil with two fluorescent dyes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3367-3372.