

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE BACTERIANA EM SOLOS, VINHAÇA E
SEMICOMPOSTAGEM RELACIONADOS AO CULTIVO DE
CANA-DE-AÇÚCAR**

**Wellington Pine Omori
Tecnólogo em Biocombustíveis**

JABOTICABAL/SP

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE BACTERIANA EM SOLOS, VINHAÇA E
SEMICOMPOSTAGEM RELACIONADOS AO CULTIVO DE
CANA-DE-AÇÚCAR**

Wellington Pine Omori

Orientador: Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza

Coorientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

**Dissertação (Mestrado) apresentada à
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – UNESP, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre em
Microbiologia Agropecuária**

JABOTICABAL/SP

2014

O84f Omori, Wellington Pine
Diversidade bacteriana em solos, vinhaça e semicompostagem relacionados ao cultivo de cana-de-açúcar / Wellington Pine Omori. – Jaboticabal, 2014
x, 84 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientador: Jackson Antônio Marcondes de Souza
Banca examinadora: Jackson Antônio Marcondes de Souza, Janete Aparecida Desidério, Luciano Takeshi Kishi
Bibliografia

1. Cana-de-açúcar. 2. Diversidade bacteriana. 3. Gene 16S rRNA.
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.34:631.54



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO: DIVERSIDADE BACTERIANA EM SOLOS, VINHAÇA E SEMICOMPOSTAGEM
RELACIONADOS AO CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR

AUTOR: WELLINGTON PINE OMORI

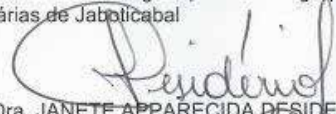
ORIENTADOR: Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS


Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MICROBIOLOGIA
AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA

Departamento de Biologia Aplicada À Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. JANETE APPARECIDA DESIDERIO

Departamento de Biologia Aplicada À Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. LUCIANO TAKESHI KISHI

Universidade Federal de São Carlos / São Carlos/SP

Data da realização: 28 de fevereiro de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

WELLINGTON PINE OMORI – nascido em 22 de Agosto de 1986, no município de Suzano – SP, formado em Tecnologia de Biocombustíveis pela Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal (FATEC-JB) em 2011. Em março de 2012 iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agropecuária na UNESP – FCAV, em Jaboticabal – SP, onde defendeu o Trabalho de Graduação em Dezembro de 2011.

Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.

Cora Coralina

Dedicatória

À mãe pais Antônio e Dina e outras pessoas importantes que partiram dela ainda acreditando em minha trajetória.

À minha esposa Joice Mariá B. A. Omori, que mesmo em momentos difíceis se manteve ao meu lado, auxiliando no meu bem estar e superação de problemas que estivessem acima da minha possibilidade de resolvê-los.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Jackson A. M. Souza pela orientação e amizade construídas ao longo desses anos de convivência que se iniciou na IC (segundo semestre de 2009).

À minha coorientadora Profa. Dra. Eliana G. M. Lemos pela gentileza em ceder o espaço físico de seu laboratório (Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos e Plantas, Departamento de Tecnologia) e equipamentos para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos amigos de laboratório pela compreensão e desabafos de assuntos gerais André Camargo, Karla Stropa, Lucas Ribeiro, Érica Lopes, Elisangela Soares, Gisele Rodrigues, Thaís Maester, Camila Fernandes, entre muitos outros, que se citados tornaria esta lista longa.

Aos amigos Fabrício Rabachini (compadre) e Flávia Rabachini (comadre) pelos conselhos relacionados a preocupação existente entre a integridade de minha pessoa, situação dos estudos e problemas pessoais.

Ao meu sogro Antônio Alves e sogra Aparecida Alves pelos conselhos, ajuda em momentos difíceis e naqueles dias em que cheguei mais tarde em casa por causa dos compromissos envolvendo o laboratório.

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Desenvolvimento do setor sucroenergético no Brasil.....	19
2.2 Vinhaça: características, vantagens e desvantagens.....	21
2.3 Torta de filtro, compostagem e semicompostagem	22
2.4 Versatilidade e diversidade das vias bioquímicas dos micro-organismos.....	24
2.5 Metagenômica aplicada a análise de metadados.....	26
2.6 Organização estrutural do gene 16S rRNA	28
2.7 Caracterização de comunidades microbianas voltadas a bioconservação	29
2.8 A bioinformática no estudo da diversidade microbiana	30
3 OBJETIVOS.....	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Descrição dos pontos de coleta e análises	32
4.2 Crescimento da cepa de <i>Rhizobium etli</i> LGM 17827.....	35
4.3 Extração de DNA genômico de <i>R. etli</i> LGM 17827	36
4.4 Extração e quantificação do DNA metagenômico	37
4.5 Amplificação do gene 16S rRNA.....	37
4.6 Seleção dos fragmentos de 300 pb de comprimento.....	38
4.7 Eluição dos fragmentos de 300 pb recuperados em gel	40
4.8 Clonagem dos produtos de 300 pb purificados	40
4.9 Cultivo dos clones para validação.....	41
4.10 Extração do DNA plasmidial para validação da biblioteca.....	41
4.11 PCR de validação dos clones.....	42
4.12 Cultivo dos clones validados.....	43
4.13 Extração do DNA plasmidial dos clones estocados em placas do tipo ELIZA	44

4.14 Sequenciamento do 16S rRNA dos clones bacterianos	45
4.15 Análise da qualidade das sequências e busca por estruturas quiméricas.....	47
4.16 Análises de α -diversidade, γ -diversidade, β -diversidade e teste de diferenças na estrutura das comunidades bacterianas.....	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 Perfil da eletroforese após amplificação do gene 16S rRNA do DNA metagenômico .	49
5.2 Táxons verificados em SV.....	51
5.3 Táxons observados na semicompostagem	56
5.4 Análise comparativa de 5 ambientes diferentes	60
5.5 Análise da diversidade, riqueza, UTOs e teste de hipóteses	69
6 CONCLUSÃO	73
7 REFERÊNCIAS	73

DIVERSIDADE BACTERIANA EM SOLOS, VINHAÇA E SEMICOMPOSTAGEM RELACIONADOS AO CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO – De maneira geral, resíduos industriais como vinhaça e torta de filtro, causam preocupação devido ao risco de impactos ambientais que podem ser causados quando utilizados na reposição de nutrientes em solos com cultivo de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Devido à falta de estudos que busquem desvendar os impactos destes resíduos na estrutura e composição de comunidades bacterianas, este trabalho teve como proposta utilizar o gene 16S rRNA para avaliar a diversidade bacteriana presente em 5 biomas com diferentes manejo de cana-de-açúcar e os resíduos vinhaça e torta de filtro. Foram analisados um total de 1.090 sequencias do 16S rRNA de bactérias, recuperadas de: *i*) solo com fertirrigação de vinhaça e plantio de cana-de-açúcar (SV), *ii*) solo depositado sobre o canal mestre da vinhaça (MC), *iii*) solo de mata nativa localizada próxima a áreas de plantio de cana-de-açúcar (MT), *iv*) solo com plantio de cana-de-açúcar sem a aplicação de vinhaça (CH) e *v*) semicomposto de torta de torta de filtro (CP). Com base na curva de rarefação e índice Richness, SV foi considerado o ambiente mais diverso, MT foi considerado como portador de diversidade intermediária e, com base nos outros índices, MC foi considerado o ambiente menos diverso. O filo Actinobacteria, relacionado com a degradação da biomassa vegetal e produção de antimicrobianos, dominou a população do ambiente CP, fato possivelmente relacionado a elevada quantidade de material lignocelulósico disponível na torta de filtro. CP também apresentou os filos Firmicutes e Proteobacteria, ambos presentes em diferentes estágios do processo de compostagem. Os ambientes de solos foram considerados como portadores de poucos táxons relacionados a gêneros bacterianos cultivados, além de apresentarem elevado número de clones afiliados a bactérias não classificadas. Os testes de variância molecular Unifrac e Libshuff demonstram que os cinco biomas apresentam variação na estrutura de comunidades bacterianas, onde SV e MC não aparentaram compartilhar espécies entre si. Estes resultados demonstram que os ambientes com presença de vinhaça e torta de filtro são diferentes de outros biomas com manejo de cana-de-açúcar, os quais atuam na seleção positiva de diversas espécies bacterianas, sem no entanto, causar aumento na frequência de táxons considerados patogênicos a plantas ou animais.

Palavras chave: Cana-de-açúcar, Diversidade bacteriana, Gene 16S rRNA

BACTERIAL DIVERSITY IN SOIL, VINASSE AND SEMICOMPOSTING RELATED TO THE PLANTING OF SUGARCANE

ABSTRACT - Generally, industrial wastes as vinasse and filter cake cause public apprehension due to the risk of environmental impacts caused by their use as nutrients replenishment in soils with cultivation of sugarcane (*Saccharum* spp.). Due to lack of studies that seek to unravel the impacts of these residues in the structure and composition of bacterial communities, this work aimed to apply the 16S rRNA gene to assess the bacterial diversity present in five biomes with different sugarcane crop management besides waste vinasse and filter cake. A total of 1,090 sequences of bacterial 16S rRNA were recovered and analyzed: *i*) soil under sugarcane crop fertilized by vinasse (SV); *ii*) soil from the master channel for vinasse distribution (MC), *iii*) soil under native forest located next to areas of sugarcane planting (MT), *iv*) soil under sugarcane crop without vinasse irrigation (CH), and *v*) filter cake semi-composting compound (CP). Based on Richness index and rarefaction curve, the SV is considered the most diverse, followed by MT as the intermediary, and MC as the least diverse environment. The Actinobacteria phylum related to the degradation of plant biomass and production of antimicrobials has dominated the population of the CP environment, that was possibly related to high amount of lignocellulosic material available on the filter cake. CP also presented the Firmicutes and Proteobacteria phyla, both present at different stages of the composting process. Soil environments showed few taxa related to cultured bacterial genera unlike the high number of clones affiliated to bacteria not classified. Unifrac and Libshuff tests for molecular variance show that the five biomass present variation in the structure of bacterial communities. In addition, SV and MC does not share species each other. These results demonstrate that the environments containing vinasse and filter cake are different from other biomes with management of sugarcane. These supplements are acting in the positive selection of bacterial species without promote increasing in frequency of taxa considered pathogenic to plants or animals.

Keywords: Sugarcane, Bacterial diversity, 16S rRNA gene

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análises das propriedades físico-químicas dos 4 biomas de solo estudados neste trabalho na profundidade de 0-20 cm.	55
Tabela 2. Análise da composição do material fibroso de CP coletado na profundidade de 0 a 20 cm.....	59
Tabela 3. Classificação dos gêneros bacterianos segundo o algoritmo <i>Seqmatch</i> do RDP II.....	60
Tabela 4. Distribuição de filotipos bacterianos identificados no 5 biomas relacionados ao manejo de cana-de-açúcar e resíduos vinhaça e torta de filtro. A classificação foi baseada no algoritmo <i>Classifier</i> do RDP II, com um corte de confiança de 80%.....	62
Tabela 5. Índices de diversidade e riqueza observados ^a para as cinco comunidades bacterianas.....	72

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Exemplo da organização estrutural básica do gene 16S rRNA. As regiões conservadas estão ilustradas em cinza (C1-C9) e as regiões variáveis (V1-V9) são as coloridas. Para fins comparativos, a região V4 destacada por círculos possui aproximadamente 106 pb.....28
- Figura 2.** Ilustração do gel da preparativa demonstrando a parte A (corada com brometo de etídeo) e a parte B (não corada com brometo de etídeo). Na canaleta 1 foi aplicado 6,0 µl do padrão GeneRuler™ 1 kb DNA ladder; na canaleta 2 foi aplicado 15,0 µl da amostra guia para identificação dos 300 pb após corar com brometo de etídeo; e por último, na canaleta 3, foi aplicado o volume restante da amostra a ser recuperada.39
- Figura 3.** Mapa do vetor mostrando a localização da extremidade cega. Nas duas figuras pode ser visualizado o local de inserção do produto de PCR e, em uma delas (abaixo), podem ser observadas as região do vetor que os *primers Forward e Reverse* pareiam.46
- Figura 4.** Perfil da eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) da amostra de DNA metagenômico obtida de SV. Na canaleta 1 foi aplicado 6,0 µl de padrão GeneRuler™ 1 kb DNA ladder (Fermentas); canaleta 2 foi aplicado 6,0 µl de padrão GeneRuler™ ladder, High Range (Fermentas); e no poço 3 foi aplicado 3,0 µl de DNA metagenômico acrescido de 5,0 µl de tampão de carregamento.49
- Figura 5.** Padrão dos produtos de PCR do solo SV antes e depois da purificação. Na canaleta 1 foi aplicado 3,0 µl de padrão; na canaleta 2 foi aplicado 5,0 µl dos produtos de PCR não purificados acrescido com 3,0 µl de tampão de carregamento; na canaleta 3 foi aplicado 5,0 µl dos produtos de PCR purificados acrescido com 3,0 µl de tampão de carregamento; na canaleta 4 foi aplicado 5,0 µl dos produtos de PCR obtidos da amplificação do DNA do controle positivo (*R. etli* LGM 17827) acrescido de 3,0 µl do tampão de carregamento; e na canaleta 5 foi aplicado 5,0 µl da reação do controle negativo (continha água no lugar do DNA) acrescidos de 3,0 µl de tampão de carregamento.50
- Figura 6.** Perfil eletroforético da validação por PCR dos 20 clones pertencentes ao bioma SV, coletados ao acaso. Nas canaletas 1 e 12 estão aplicados 3,0 µl de padrão. Nas demais canaletas foram aplicados 5,0 µl de cada um dos DNA's extraídos e, em seguida, houve o acréscimo de 3,0 µl de tampão de carregamento em cada uma das amostras. Além dos diferentes padrões obtidos depois da amplificação utilizando *primers Forward e Reverse* do vetor, foi possível concluir que os clones das canaletas 14 e 22 são possíveis falso positivos, pois o clone da canaleta 22 apresentou insertos maiores/menores que 300 pb e, o clone da canaleta 22, não apresentou nenhum inserto aparente.....51

Figura 7. Classificação em nível de filo para as 280 sequências de SV utilizando a ferramenta *Classifier* do RDP II com um corte de 80% de confiança. Na figura são mostrados os filios mais frequentes encontrados em SV, incluindo o grupo de bactérias não classificadas que apresentaram elevada abundância (aproximadamente 21%).52

Figura 8. Gêneros bacterianos identificados no bioma SV. Todas as 280 sequências foram identificadas utilizando um corte de confiança de 80% no *Classifier* do RDP II. Na figura são mostradas apenas as sequências em porcentagem que foram classificadas no nível taxonômico de gênero. Os gêneros identificados não estão descritos como os mais frequentemente isolados para RPCP, podendo ser uma evidência de que a vinhaça provoca efeito seletivo sobre as populações de bactérias não comumente identificadas em solos com plantio de cana-de-açúcar sem aplicação de vinhaça.55

Figura 9. Porcentagem de sequências afiliadas aos 4 táxons identificados no bioma CP. Em relação aos ambientes de solo (JANSSEN, 2006; PISA et al., 2011), a diversidade bacteriana em CP é muito baixa, evidenciando o domínio de apenas alguns poucos táxons neste processo. A baixa frequência de clones relacionados a bactérias não classificadas demonstra que uma grande parcela das sequências dos clones recuperados de CP possuem ótimo suporte dos dados disponíveis no banco de dados, ou seja, as bactérias identificadas nos diferentes níveis hierárquicos podem ser melhor exploradas quanto ao seu papel biológico desempenhado em CP.56

Figura 10. Porcentagem de Ordens bacterianas identificadas em CP. Estes dados foram recuperados do conjunto de 139 sequências classificadas no RDP II utilizando a ferramenta *Classifier* com um corte de confiança de 80%. Diferente do que foi mostrado para um processo de compostagem (MARTINS et al., 2013), no bioma CP, Actinomycetales foi a ordem mais abundante, fato que pode estar relacionado a produção de antimicrobianos e condições que diferem CP daquelas presentes na compostagem.58

Figura 11. Teste Unifrac utilizando Jackknife Environmental Cluster para aferir se as cinco comunidades bacterianas possuíam a mesma estrutura se comparadas ao acaso. CP apresentou comportamento de grupo externo na análise e MC foi classificado mais distante de SV do que CH e MT. MC = solo heterogêneo depositado sobre o canal mestre da vinhaça; CH = solo com plantio de cana-de-açúcar sem irrigação de vinhaça; MT = solo de mata nativa localizada próxima a áreas de plantio de cana-de-açúcar; SV = solo com cultivo de cana-de-açúcar e fertirrigação de vinhaça; CP = matéria orgânica de semicompostagem de torta de filtro.63

Figura 12. Dendrograma mostrando a classificação das Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) relacionadas ao filo Proteobacteria dos biomas SV, MC e CP. As sequências obtida neste estudo estão em negrito. Os números entre parênteses representam a quantidade de sequências deste estudo que foram afiliadas a um mesmo grupo taxonômico de Acidobacteria. Para a construção da árvore foi utilizada a matriz de substituições de nucleotídeos Jukes e Cantor, método *Neighbor-Joining* com *bootstrap* para 5.000 réplicas e opção deleção completa. Os nós mostram apenas valores de *bootstrap* acima de 50%. A escala indica que ocorrem 0,05 substituições de nucleotídeos a cada posição.66

Figura 13. Árvore ilustrando a classificação das Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) relacionadas aos filios Actinobacteria e Firmicutes recuperadas de CP, MC e SV. Curiosamente, a maioria das sequências do gene 16S rRNA pertencentes a CP foram agrupadas a gêneros bacterianos conhecidos. A escala mostra que a cada posição ocorrem de 0,05 substituições de nucleotídeos.....67

Figura 14. Árvore demonstrando as afiliações das Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) relacionadas ao grupo Acidobacteria, detectadas somente em SV e MC. Foram utilizadas para a construção da árvore somente sequências que apresentaram melhor classificação a nível de gênero no RDP II. A escala indica que ocorrem 0,05 substituições de nucleotídeos a cada posição.68

Figura 15. Curva de rarefação de solo sob fertirrigação (MTV), canal mestre da vinhaça (CN) e semicpomposto de torta de filtro (CP) considerando $D = 0,03$. A curva de CP demonstra uma sensibilidade maior que os outros dois ambientes, fenômeno este facilmente atribuído ao grande número de clones agrupados próximos a bactérias conhecidas no dendrograma e baixo número de filios na amostra. CN e MTV demonstram menos sensibilidade na curva, denotando a grande abundância de táxons diferentes nesses ambientes.....71

Figura 16. Dendrograma dos clusters da similaridade *pairwise* Jaccard utilizando um corte de 97% de similaridade. Os ambientes da agroindústria mostraram ser muito distintos entre si, conformando o que é mostrado pela análise Unifrac.71

LISTA DE ABREVIATURAS

km = quilômetros
m = metros
mm = milímetros
°C = graus Celsius
g/L = gramas por litros
CaCl₂ = cloreto de cálcio
mL = mililitros
µl = microlitros
p/v = peso por volume
mg/mL = miligramas por mililitros
µg/mL = microgramas por mililitros
h = horas
min = minutos
M = molar (exemplo, 3 M)
v/v = volume por volume
EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético
mM = milimolar
V = volts
ng/µl = nanogramas por microlitro
pb = pares de base
MgCl₂ = cloreto de magnésio
dNTPs = didesoxiribonucleotídeos trifosfatos
pmol/µl = picomol por microlitro
UV = ultra violeta
B.O.D. = Demanda Bioquímica de Oxigênio
rpm = rotações por minuto
NaOH = hidróxido de sódio
SDS = dodecil sulfato de sódio
g/kg = gramas por quilo

1 INTRODUÇÃO

Na metade da década de 1970, foi criado o Programa Nacional do Álcool (Proálcool) que tinha como objetivo ampliar a oferta de álcool combustível e reduzir a dependência da importação de petróleo. A busca por novas fontes para produção de combustíveis se fazia necessária, pois, no âmbito internacional, o mundo enfrentava a crise do petróleo, onde o preço do barril no mercado chegou a ter seu preço quadruplicado (MOURA et al., 2004). Por outro lado, no cenário nacional, o Brasil passava por uma crise açucareira e os usineiros precisavam diversificar a produção na tentativa de explorar novos mercados e contornar a crise. Devido a estes problemas, foi possível aliar os interesses do Brasil com as vantagens prometidas pelo Proálcool, que por consequência, culminou na modernização do parque produtivo nacional, que na época era composto por equipamentos defasados (PAULILLO et al., 2007).

A vinhaça é um dos subprodutos da destilação do álcool, apresentando elevada turbidez, pH ácido, altos teores de matéria orgânica (principalmente glicerol na fração carbono solúvel), potássio, cálcio e moderadas quantidades de nitrogênio e fósforo (MARIANO et al.; 2009). Na biorremediação de solos contaminado com borra oleosa, estudos apontam que a vinhaça ocasiona aumento da atividade microbiana, principalmente de bactérias heterotróficas e fungos (CRIVELARO et al., 2010). Isto pode ser um indicativo geral de que a vinhaça atua como um fator seletivo de grupos específicos de micro-organismos, além de participar no estímulo de seus metabolismos para degradação de moléculas complexas.

A compostagem é uma técnica que visa reciclar resíduos orgânicos em geral, como os produzidos na agroindústria (torta de filtro, restos culturais), obtendo ao final do processo um composto com propriedades fertilizante agrícola e/ou corretor de solos degradados. Durante o processo, vários micro-organismos atuam em um processo bioquímico complexo sendo que fatores como aeração, nutrientes e umidade, influenciam na eficiência da compostagem. Micro-organismos mesofílicos e termófilos, são encontrados nos diferentes momentos da compostagem, sendo que temperaturas de 70°C podem ser atingidas. Isto ocorre devido a degradação de

componentes como celulose, hemicelulose e pectina, cuja degradação requer ação conjunta de enzimas extracelulares (GOMES et al., 2007; VALENTE et al., 2009). Além disso, a compostagem precisa apresentar aeração, umidade de aproximadamente 70%, correção da relação carbono/nitrogênio e, se necessário, reposição de alguns nutrientes. Caso não obedeça esses padrões, o processo não é eficiente, pois muitos nutrientes são consumidos pela comunidade bacteriana e não ficam disponíveis as plantas no momento da incorporação do composto ao solo (MARTINS et al., 2013), sendo portanto, um processo que pode ser caracterizado como semicompostagem.

A extração de DNA metagenômico total de amostras ambientais, aliada ao uso de técnicas moleculares, auxilia na identificação da comunidade microbiana (MARTINS et al., 2013) ou de indivíduos específicos (LIN et al., 2012), melhorando o entendimento das estratégias metabólicas e adaptativas empregadas pelos microorganismos frente a uma ação antrópica. Uma das abordagens amplamente utilizada é a amplificação parcial ou total do gene 16S rRNA de bactérias e, após clonagem e sequenciamento, fazer uso das ferramentas de bioinformática necessárias para a classificação e identificação das sequências obtidas (NERCESSIAN et al., 2005; PAIXÃO et al., 2010; LIN et al., 2011), permitindo caracterizar os indivíduos que compõem a comunidade bacteriana de diferentes ecossistemas e inferir os impactos positivos e negativos sobre a adaptação desses organismos no ambiente ao qual estejam inseridos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Desenvolvimento do setor sucroenergético no Brasil

A partir do decreto nº 22789 o governo criou o Instituto do Alcool e do Açúcar (IAA) na década de 1930, visando o incentivo a modernização do setor nacional da época que passava por problemas quanto à produção excedente de açúcar e fomento de álcool combustível. Na década de 1970, houve um incentivo maior ao

setor, pois neste período os países árabes elevaram o preço do barril do petróleo, o que caracterizou uma crise mundial devido a constatação do risco iminente do esgotamento das fontes desse combustível fóssil, forçando os países a buscarem fontes alternativas para a obtenção de energia (OMORI et al., 2011). Neste mesmo período, no cenário nacional, o Brasil passava por uma crise açucareira que praticamente obrigava os usineiros a buscarem meios para diversificar a produção, na tentativa de explorar novos mercados e contornar os prejuízos desencadeados pela crise. Estes problemas possibilitaram aliar os interesses do Brasil e das usinas, começando assim a produção de etanol combustível no país e, dentre todos os benefícios prometidos pelo Proálcool, a indústria nacional pode ser modernizada e ter seus processos melhorados (PAULILLO et al., 2007). Dessa forma, o Brasil pode formular estratégias para diminuir a dependência do petróleo estrangeiro a partir do aperfeiçoamento dos processos existentes, os quais envolviam a fabricação de álcool derivado da planta de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) (VEIGA FILHO; RAMOS, 2006; OMORI et al., 2011).

Após um período de crise, em 2003, ocorreu a estabilização definitiva do setor de produção de álcool combustível com o lançamento dos carros *flex-fuel*, garantindo ao consumidor optar por abastecer seu veículo com álcool, gasolina ou a mistura desses dois combustíveis (DI GIULIO, 2006). Devido à grande aceitação de mercado, em 2008, foi registrada a incrível participação de mais de 85,0% na venda de novos veículos (FERREIRA, 2009). Em 2013 foi constatado a venda de 19 milhões de veículos com a tecnologia *flex* no país, além dos outros 10 milhões comercializados em outros países, revelando um caso único na história automobilística mundial com a possibilidade de consumo em grande escala de um único combustível renovável em alternativa a um combustível fóssil (UNICA, 2013). Em 2003 a demanda por etanol hidratado era de 3.762 mil m³ e, em 2007, saltou para 10.366 mil m³. Segundo expectativas, em 2017, será utilizado aproximadamente 73% em volume de etanol hidrato no país e, aliada ao aquecimento do mercado interno, existe a possibilidade de aumento nas exportações deste biocombustível, mantendo o Brasil como líder do mercado internacional (EPE, 2008).

2.2 Vinhaça: características, vantagens e desvantagens

Nos últimos anos, o Brasil realizou incentivos ao aumento da produção de etanol combustível, visando atender tanto ao mercado interno como o externo e, como consequência, houve um acréscimo na produção de vinhaça. Embora contenha características poluentes quando utilizada de forma não adequada, o uso racional da vinhaça no processo conhecido como fertirrigação promove a melhoria da fertilidade do solo, devido as grandes quantidades de nutrientes contidos neste efluente. Além disso, o destino a um uso correto, impede que a vinhaça seja descartada no meio ambiente de modo desenfreado, minimizando os riscos de poluição dos lençóis freáticos e águas superficiais (SILVA et al., 2007).

A vinhaça é subproduto da destilação do álcool, produzindo em média 13 litros de vinhaça para cada 1 litro de etanol, conforme qualidades tecnológicas da matéria-prima e processo industrial. Apresenta 93% de água e 7% de sólidos orgânicos e inorgânicos, além de ser rico em Matéria Orgânica (M.O.), basicamente na forma de ácidos orgânicos (principalmente glicerol na fração de carbono solúvel), apresentando também, pH ácido, cátions como potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e quantidades moderadas de nitrogênio (N) e fósforo (P) (MARIANO et al., 2009). Nos solos, a vinhaça causa a elevação do pH, aumento na disponibilidade de alguns cátions, aumento da Capacidade de Troca Catiônica (CTC), aumento na retenção de água e melhoria da estrutura física do solo, favorecendo a atividade microbiana nativa. Nos 10 primeiros dias de aplicação de vinhaça observa-se a queda do pH no solo, porém, com o aumento no tempo de plantio e aplicação deste efluente, o pH tende a se elevar. Esse processo é atribuído aos fungos que iniciam a transformação da M.O. em húmus, neutralizando a acidez e permitindo a proliferação de bactérias que atuam na mineralização e imobilização de nitrogênio, pelos processos de nitrificação, desnitrificação ou fixação biológica. Neste tipo de ambiente, há a ocorrência de muitos outros micro-organismos participantes de diversos ciclos biogeoquímicos, que também contribuem para a ciclagem de outros elementos diferentes do nitrogênio (SILVA et al., 2007).

Embora os micro-organismos nativos possam contribuir para a degradação da vinhaça aplicada em solos agricultáveis, o maior problema em se estabelecer o uso da vinhaça sem gerar controvérsias, reside no fato dela ser mais poluente que o esgoto doméstico. A produção de 10 litros de álcool gera um volume de vinhaça equivalente a poluição que 172 pessoas produziram em um único dia (LAIME et al., 2011). Embora os reais benefícios e impactos da aplicação de vinhaça em diferentes solos e regiões do mundo destinados a agricultura não estejam bem consolidados, verifica-se na maioria dos estudos científicos a melhora do sistema radicular de plantas de cana-de-açúcar e reposição de nutrientes (principalmente potássio) (PRADO et al., 2013), o que garante a continuidade da aplicação em níveis seguros deste resíduo nos solos brasileiros conforme os padrões estabelecidos na normativa P4.231 da CETESB. Outro fator crucial que valida o uso da vinhaça nos solos destinados ao plantio de cana-de-açúcar é a capacidade deste efluente em reduzir a dependência de adubos químicos (PRADO et al., 2013), considerados onerosos.

2.3 Torta de filtro, compostagem e semicompostagem

Na fabricação do açúcar, a clarificação do caldo gera um resíduo conhecido como torta de filtro que é rico em matéria orgânica, fósforo, umidade (80%), nitrogênio, cálcio e outros minerais. Assim como a vinhaça, este resíduo pode ser utilizado como substituto de adubos químicos devido a sua riqueza nutricional, principalmente fósforo e umidade. Muitos países utilizam a torta de filtro na adubação de solos, sendo registrado um volume de produção da ordem de 30-40 toneladas de torta de filtro por quilo de cana moída. Quando aplicada in natura no solo de áreas destinadas ao plantio de cana-de-açúcar, verifica-se aumento de produção nas lavouras, sendo que no Brasil são recomendadas aplicações entre 80 e 100 toneladas por hectare de torta de filtro no plantio. Além disso, a torta de filtro também pode ser utilizada na compostagem e, com o término do processo, o produto orgânico estabilizado pode ser aplicado no solo, devolvendo nutrientes e servindo de condicionar deste ambiente (PRADO et al., 2013).

A compostagem é uma técnica que visa reciclar resíduos orgânicos em geral, como os produzidos na agroindústria e Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs), obtendo ao final do processo um composto com propriedades fertilizante agrícola e/ou corretor de solos degradados. Durante o processo, temperaturas muito elevadas são atingidas e, por este motivo, ocorre redução de micro-organismos patogênicos no processo (HECK et al., 2013). Este fato permite que a qualidade microbiológica necessária do composto seja atingida, o que atende a Resolução 380/2006 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Muitos trabalhos avaliam o desempenho do processo e qualidade microbiológica do composto, porém, em sua maioria, são estudos voltados à detecção de alguns indivíduos de determinada população patogênica (GONÇALVES; MARIN, 2007; HAHN et al., 2012; HECK et al., 2013) que apenas indicam a qualidade do produto final obtido, desprezando dessa maneira, a real população existente na amostra.

Durante a compostagem, vários micro-organismos atuam em um processo bioquímico complexo sendo que fatores como aeração, nutrientes e umidade influenciam na eficiência deste processo. Quando estes parâmetros não são obedecidos, o processo é conhecido como compostagem incompleta (semicompostagem) e, neste tipo de sistema, os nutrientes do meio são consumidos pelos micro-organismos que visam manter em atividade todos seus processos metabólicos. Micro-organismos mesofílicos são observados no início do processo e assimilam fontes de carbono prontamente disponíveis e solúveis (açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos) gerando calor por causa das reações metabólicas exotérmicas, fazendo com que sejam atingidas temperaturas próximas a 40°C. Nesse momento, os microrganismos mesofílicos são inibidos quanto ao crescimento e os endósporos de fungos e bactérias termofílicas são estimulados a germinar. Nesta etapa fontes de carbono facilmente assimiláveis já se esgotaram, restando polissacarídeos que fazem parte da constituição da biomassa, como celulose, hemicelulose e pectina, cuja degradação requer ação conjunta de enzimas extracelulares, ocasionam elevação da temperatura para próximo de 70°C (GOMES et al., 2007; VALENTE et al., 2009). Embora não seja similar a compostagem, o processo de semicompostagem provavelmente apresenta riqueza quanto à diversidade microbiana e potencial de recuperação de muitas enzimas ou vias

biossintéticas ainda não resolvidas, que se elucidadas, podem acrescentar muito ao conhecimento científico de um modo geral.

2.4 Versatilidade e diversidade das vias bioquímicas dos micro-organismos

Os cientistas ignoravam até o início de 1970 o desafio de identificar e caracterizar organismos não cultiváveis, ou seja, aqueles que não são facilmente isolados pelo uso de métodos tradicionais de cultivo em laboratório. Desde 1880 o mundo microbiano já era dividido em micro-organismos cultiváveis e não cultiváveis devido aos postulados realizados por Robert Koch que na época provocaram uma mudança dos paradigmas no campo da microbiologia (PESSOA FILHO, 2010).

Em 1998, Handelsman et al. introduziram o termo metagenoma, onde afirmavam que a prática desta técnica somente foi possível devido aos avanços na biologia molecular e genômica eucariótica da época, sendo estas a base para a realização da clonagem e análise funcional dos genomas coletivos da microbiota dos ambientes. Com esses avanços, foi possível acessar genomas desconhecidos e caracterizar novas vias metabólicas e enzimas com potencial em aplicações biotecnológicas. Atualmente, com o avanço nas metodologias de extração de ácidos nucleicos e advento de sequenciadores de segunda geração, podemos acessar (*in silico*) o genoma total ou parcial das comunidades microbianas de uma determinada amostra ambiental, como aquela contaminada com hidrocarbonetos, e utilizar essa informação para o auxílio na compreensão das estratégias metabólicas desenvolvidas por essas populações de micro-organismos na degradação de moléculas complexas que são transformadas em compostos mais simples (ABBAl et al., 2012).

Estudos visando à diversidade genética contida nos organismos presentes no solo vêm sendo realizados para melhorar nosso entendimento das relações complexas estabelecidas entre as diferentes comunidades microbianas. A saúde do solo é mantido devido às inúmeras funções realizadas pela microbiota, a qual possui capacidade de realizar a ciclagem do carbono, nitrogênio, fósforo, beneficiar o

crescimento das plantas, recuperar áreas degradadas, decompor resíduos orgânicos e detoxificar substâncias tóxicas (PEDRINHO et al., 2009). A ciclagem redox do ferro é um exemplo dos inúmeros processos microbiológicos que envolvem a solubilização de minerais, processos esses que em conjunto contribuem para a manutenção da qualidade química dos solos, produzindo efeitos positivos até nos sedimentos desse ambiente. Esses micro-organismos abrangem uma ampla faixa de psicrófilicos e termófilicos, os quais utilizam a energia gerada por meio da redução do ferro, beneficiando o seu desenvolvimento. Alguns exemplos são: *Geobacter* sp., *Rhodoferax ferrireducens*, *Geothrix fermentans*, *Ferribacterium limneticum*, *Geoglobus ahangari* e *Shewanella* sp. (HAAIJER et al., 2012). Assim como nos solos, os indivíduos que compõem a comunidade microbiana da compostagem de resíduos orgânicos, atuam em diferentes fases (mesófilas e termófilas) da compostagem, variando a frequência e distribuição dos diferentes táxons presente neste ambiente. A desconstrução da matéria orgânica presente nas pilhas da compostagem, sofrem a ação das enzimas codificadas por estes micro-organismos onde as moléculas complexas são degradadas a moléculas mais simples, garantindo a ciclagem de nutrientes (MARTINS et al., 2013).

A elucidação dos processos biológicos empregados pelos micro-organismos permite o desenvolvimento de novas tecnologias como aquelas voltadas para a recuperação de cobre de rejeitos rochosos. Algumas bactérias e fungos podem metabolizar as substâncias presentes nessas rochas o que facilita a captação do metal impregnado nelas. Nas minas, onde ocorre a exploração de metal, as montanhas de rejeitos que se acumulam com o passar do tempo, são compostas por rochas trituradas que apresentam baixos teores de cobre. Esse rejeito é depositado sobre uma base impermeabilizada a céu aberto que está ligada a um sistema de drenagem. Uma solução aquosa é lançada sobre esse sistema criando um meio ideal ao desenvolvimento das bactérias que irão ajudar no processo de extração do cobre. Essas bactérias são oriundas de populações naturalmente existentes no ambiente de extração do minério e, após consumirem sulfetos das rochas, produzem ácido sulfúrico que ajuda na liberação do metal contido no rejeito (VASCONCELOS, 2012). Este tipo de tecnologia permite produzir um montante

adicional de cobre, que antes seria descartado no rejeito, pois sem tal procedimento a recuperação do cobre não poderia ser economicamente viável.

Qualquer atividade antropogênica ou natural é potencialmente perturbadora a estabilidade das comunidades microbianas de qualquer ambiente, como, por exemplo, o manejo do solo para o plantio e/ou colheita de cana-de-açúcar e procedimentos de semicompostagem. Indiferente ao procedimento antropogênico utilizado, vários fatores precisam ser levados em consideração, como alterações nas propriedades físico-químicas do solo, alteração na produção e longevidade da cultura, alterações no meio ambiente e comprometimento da saúde pública. Em sistemas de colheita mecanizada, não é empregado a queimada da cultura de cana-de-açúcar, sendo comum ocorrer a trituração e disposição de partes da cana-de-açúcar no solo como ponteiros, bainhas, folhas e outras partes não aproveitáveis na unidade sucroenergética. Este resíduo vegetal forma uma cobertura na superfície do solo, contribuindo para a incorporação da massa de resíduos orgânicos (SOUZA et al., 2005). Além desse tipo de manejo, outros relacionados à adubação, plantio direto, plantio indireto, preparo convencional do solo e a própria colheita mecanizada, são prejudiciais a manutenção da diversidade microbiana, seja em nível de populações ou metabolismo. Tais processos causam a dessecação, compactação e diminuição no volume de poros no solo, os quais dificultam o acesso aos recursos alimentares disponíveis a microbiota. Outro fator que é apontado por vários estudos, relaciona-se com os diferentes genótipos de plantas, pois estes causam certa influência sobre a comunidade microbiana da rizosfera devido a emissão de diferentes sinalizações pelas raízes das plantas, como exsudatos (SOUZA et al., 2012).

2.5 Metagenômica aplicada a análise de metadados

Handelsman et al. (1998) definiram o termo metagenoma como sendo a abordagem que permite o acesso a genomas coletivos e, por isso, também é possível acessar a maquinaria biossintética de micro-organismos conhecidos e desconhecidos de diferentes amostras ambientais. Essa abordagem é uma

poderosa ferramenta para a obtenção de informações que abrangem a estrutura, composição e predição de diferentes genes que estejam contidos nos diferentes indivíduos de determinado ambiente. O solo é um exemplo de ecossistema que apresenta elevada diversidade microbiana, onde estima-se que contenha uma riqueza de 10^6 a 10^7 espécies de micro-organismos por grama de solo (KAKIRDE et al., 2010), dos quais aproximadamente 1% são cultivados em laboratório (HANDELSMAN, 2005).

Na última década, a demanda por novas biomoléculas como enzimas, genes e compostos químicos, impulsionaram os estudos metagenômicos na busca por novos recursos naturais derivados de micro-organismos não cultivados, visando atender a demanda para aplicações biotecnológicas (HANDELSMAN et al., 2004; HANDELSMAN, 2005) ou para o acréscimo do conhecimento científico (COSTA et al., 2012). Estimativas sugerem que em cada grama de solo contenha entre 3.000 a 11.000 genomas diferentes, sendo que a maior parte das análises envolvem estudos de cultura pura de micro-organismos do solo, o qual se mostra uma fonte rica de novos compostos terapêuticos, tais como antibióticos, agentes anti-cancerígenos e imunossupressores (SCHMEISSER et al., 2007). O estudo de dados metagenômicos permite acessar *operons* íntegros que compõem vias biossintéticas ou degradativas, as quais podem ser recuperadas a partir de bibliotecas construídas a partir de DNA ambiental clonado em vetores específicos para tal finalidade (PESSOA FILHO, 2010; PARK et al., 2011).

O ambiente de turfa tem depositado sobre ele matéria orgânica heterogênea derivada de galhos, folhas, troncos de árvores e carcaças de animais mortos em diferentes períodos. Em decorrência da acidez, baixa quantidade de nutrientes e elevado teor de tanino, ocorre inibição da atividade microbiana envolvida na degradação dessa biomassa, tornando-a é lenta. Em decorrência disto, se torna de extrema importância o entendimento da interação entre a microbiota, tendo em vista que este ambiente produz impacto no balanço de carbono e na emissão de gases do efeito estufa. Apesar de limitadas, as pesquisas sobre o perfil metabólico e filogenético desse tipo de ecossistema, permitiu aos cientistas descobrirem que diferentes ribotipos de bactérias e arqueias atuam de diferentes formas na

degradação da lignocelulose (JACKSON et al., 2009; HIRANO et al., 2009; KANOKRATANA et al., 2011).

2.6 Organização estrutural do gene 16S rRNA

Nesses últimos anos, diversos estudos baseados no gene 16S ribossomal RNA (também conhecido como 16S rDNA) foram realizados e, tiveram como conclusão, a constatação da eficiência deste gene para fins de classificação filogenética de vários grupos bacterianos (MORALES et al., 2008). Este gene procariótico (arqueias e bactérias) possui comprimento aproximado de 1,5 kilopares de base (kb, onde 1 kb corresponde a 1.000 pares de bases [pb]) (Figura 1), o qual é empregado em técnicas metagenômicas para fins de identificação dos indivíduos que compõem a comunidade microbiana de determinado ambiente. Com o emprego de algoritmos classificatórios essas sequencias podem ser classificadas de maneira confiável, sendo necessário apenas os primeiros 500 pb para a realização de uma boa classificação em nível de gênero (PETROSINO et al., 2009). A subunidade menor (do inglês *Small Subunit*, SSU) do gene 16S rRNA possui nove regiões variáveis e conservadas (Figura 1), as quais apresentam comprimentos diferentes entre as espécies bacterianas. Seu produto dobra sobre si mesmo, formando uma estrutura secundária estável e complexa, consistindo basicamente em hastes e alças. As alças de quase todas as espécies bacterianas são conservadas e, de maneira específica, apresenta grande variação estrutural para uma ou mais classes (WANG; QIAN, 2009).

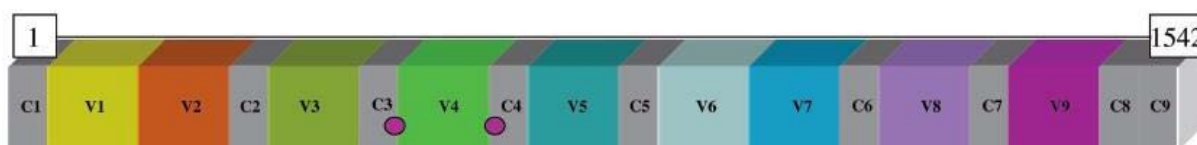


Figura 1. Exemplo da organização estrutural básica do gene 16S rRNA. As regiões conservadas estão ilustradas em cinza (C1-C9) e as regiões variáveis (V1-V9) são as coloridas. Para fins comparativos, a região V4 destacada por círculos possui aproximadamente 106 pb.

Adaptado de: Petrosino et al. (2009)

2.7 Caracterização de comunidades microbianas voltadas a bioconservação

O solo é sabidamente o maior reservatório de nutrientes e micro-organismos conhecido, composto principalmente pelo domínio bactéria, que em sua maioria ainda não é cultivado com o uso de técnicas tradicionais de cultivo (HANDELSMAN et al., 1998). Antes mesmo de se lançar a luz do conhecimento a definição do que é metagenoma, alguns pesquisadores aplicavam a técnica da recuperação do DNA ambiental total em estudos para a identificação de micro-organismos do solo (PACE et al., 1997). Antes disso, para a classificação de bactérias e arqueias, Woese (1987), foi pioneiro em propor o 16S rRNA como um marcador molecular para estudos filogenéticos, proposta essa que ainda nos dias atuais é utilizada por muitos cientistas na reconstrução da história evolutiva de muitos grupos procarióticos (VĚTROVSKÝ; BALDRIAN, 2013).

No solo, os micro-organismos realizam os ciclos biogeoquímicos que são essenciais à manutenção da vida na biosfera, os quais são passíveis de serem isolados e usados em diversas aplicações, como nas industriais, no estudo para o entendimento do papel que eles desempenham no meio ambiente e na agricultura (DUBEY et al., 2006). *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*, são exemplos de bactérias diazotróficas endofíticas que estão naturalmente presentes em solos participando de interações com as plantas e, são passíveis de serem isoladas e utilizadas no biocontrole do Raquitismo da Soqueira (do inglês *Ratoon Stunting Disease*, RDS) através da competição pelos sítios de colonização do tecido da planta, possibilitando o controle do patógeno e aumento na produtividade do canavial (SOUZA et al., 2011).

Durante os anos, as pesquisas vem demonstrando diferenças na estrutura e composição das comunidades bacterianas presentes nos solos sob ação de fatores naturais ou antrópicos, tais como solos úmidos de floresta com baixo pH (LIN et al., 2010), solos com diferentes zonas de vegetação florestal e preservada por longos períodos (LIN et al., 2011), solos de florestas separadas geograficamente (LIN et al., 2012), diferentes profundidade de solo com variação nos componentes minerais

localizado próximo a riachos (HANSEL et al., 2008), solos sob vegetação comparado com solo sob rotação de culturas (SOUZA et al., 2012), solo sob cultivo de cana-de-açúcar com diferentes aplicações de nitrogênio (PISA et al., 2011) e composto derivado da compostagem de resíduos vegetais e animais (MARTINS et al., 2013).

De maneira geral, a aplicação de micro-organismos ou de genes recuperados de amostras ambientais, podem ser aplicados no melhoramento de processos industriais já existentes, como a biorremediação, produção de antibióticos, etc. Embora a estrutura celular dos procariotos seja relativamente simples (LEHNINGER, 2006), menos de 1% são cultivados e caracterizados, sendo esta limitação técnica diretamente relacionada à complexidade de metabolismo apresentado por esses seres microscópicos (HANDELSMAN, 2005). Do ponto de vista biológico é de extrema importância decifrar e entender a fisiologia, constituição genética e índices ecológicos das comunidades microbianas presentes nos diferentes ambientes (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005). Com base nisto, pode-se concluir que a identificação da abundância dos filos bacterianos e o levantamento das relações existentes entre os grupos taxonômicos e o meio onde se inserem, podem contribuir para a descoberta de novas informações que poderão ser utilizadas como base na construção de um conhecimento técnico ou científico ainda não formulado ou mal construído, permitindo aos pesquisadores desenvolverem métodos de isolamento de micro-organismos ou de genes.

2.8 A bioinformática no estudo da diversidade microbiana

Desde a descoberta do sequenciamento de DNA até a atualidade, muitos dados sobre genes específicos ou do genoma total de muitos organismos, foram gerados (BANSAL, 2005). Informações obtidas a partir dos dados de *amplicons*, bibliotecas genômicas e metagenômicas, elevaram o conhecimento científico acerca dos organismos como um todo, permitindo aos pesquisadores compreenderem melhor os processos biológicos e etapas de manipulação dos organismos para a produção de biomoléculas importantes em aplicações industriais, permitindo a

melhora na qualidade de vida e do meio ambiente (WATSON, 2005; PETROSINO et al., 2009).

Como consequência do avanço científico e tecnológico à automatização no sequenciamento de DNA e a adoção de algoritmos computacionais poderosos para análise e interpretação dos dados permitiram que diariamente muita informação fosse gerada. Desde então, os bancos de dados públicos tem sido alimentados com grande quantidade de informações derivadas do sequenciamento, facilitando a identificação dos organismos (COLE et al., 2013) e sua posterior classificação em análises para identificação de táxons microbianos presentes nos mais variados ambientes.

Antes da construção do filograma (filogenia) ou fenograma (fenética) (SANTOS, 2008) é necessário o estudo de afiliação da sequência representativa dos organismos pesquisados. Para a análise da diversidade bacteriana e arqueias o gene comumente empregado é o 16S rRNA que pode ser classificado por algoritmos como: (i) *blastn* (ZHANG et al., 2000) disponível no National Center for Biothechnology (NCBI); (ii) *classifier* (COLE et al., 2013) do Ribosomal Database Project (RDP II); (iii) o *NASt* (DESANTIS et al., 2006) do Greengenes; (iv) e o *SINA* (PRUESSE et al., 2012) do ARB-SILVA.

Bansal (2005) desperta a atenção para o uso das ferramentas de bioinformática em outras aplicações, como no entendimento e diagnóstico de doenças através do emprego de proteínas bioindicadoras, uso de vacinas com custo efetivo para prevenção de doenças, desenvolvimento racional de drogas, melhoria da produção agrícola em nível de qualidade e quantidade e desenvolvimento de técnicas que auxiliem a compreensão detalhada de como funciona a maquinaria microbiana, principalmente a de patógenos.

3 OBJETIVOS

Utilizar o 16S rRNA para explorar a variação da diversidade (α -diversidade, γ -diversidade e β -diversidade) e estrutura de comunidades bacterianas de cinco ambientes que estão relacionados ao manejo de cana-de-açúcar e dos resíduos vinhaça e torta de filtro. Quatro desses ambientes eram provenientes de solos, os quais apresentavam variação na composição vegetal (cana-de-açúcar, mata e somente solo heterogêneo) e irrigação de vinhaça e um ambiente de semicompostagem de torta de filtro. Os biomas são caracterizados da seguinte maneira: *i*) solo com plantio de cana-de-açúcar e irrigação de vinhaça (**SV**); *ii*) solo depositado sobre o canal mestre que transporta a vinhaça da destilaria para as áreas de plantio (**MC**) (RIBEIRO, 2012); *iii*) solo de mata nativa localizada próxima a áreas de cultivo de cana-de-açúcar (**MT**); *iv*) solo com plantio de cana-de-açúcar e sem irrigação de vinhaça (**CH**) (CAMARGO, 2013); e *v*) semicomposto de torta de filtro (**CP**).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos, quando não especificados pelo fornecedor do kit ou reagentes, foram baseados em Sambrook (2001). Tais técnicas não oferecem risco para o meio ambiente ou a saúde humana, adequando-se aos padrões de biossegurança (NB-1).

4.1 Descrição dos pontos de coleta e análises

Foram coletadas amostras de 5 biomas diferentes relacionados com plantio de cana-de-açúcar e/ou manejo dos resíduos vinhaça e torta de filtro. Quatro desses ambientes foram obtidos de solos com diferenças no tipo de vegetação (presença ou ausência de cultivares de cana-de-açúcar) e irrigação de vinhaça e, o quinto

ambiente, foi obtido de material orgânico de semicompostagem (ou compostagem incompleta) de torta de filtro. Os biomas coletados foram: *i*) solo com plantio de cana-de-açúcar (cultivar RB965911) e fertirrigação de vinhaça (**SV**); *ii*) solo heterogêneo depositado sobre o canal mestre da vinhaça (**MC**); *iii*) solo de mata nativa localizada próximo a áreas de cultivo de cana-de-açúcar (**MT**); *iv*) solo com plantio de cana-de-açúcar e sem fertirrigação de vinhaça (**CH**); e *v*) material orgânico de semicompostagem de torta de filtro (**CP**). Os ambientes SV, MC, MT e CP, foram coletados em Fevereiro de 2011 (OMORI, 2011) em áreas da Fazenda Itaquerê pertencentes a Usina Santa S.A. localizadas no município de Nova Europa-SP, distante 310 km de São Paulo. O solo CH foi coletado na Fazenda Pau D'alho, no município de Bebedouro-SP, localizada a 397 km de São Paulo. Todos os dados obtidos a partir do solo CH e dos clones foram gentilmente fornecidos por Camargo (2013) e, uma parte dos dados de MC, foram gentilmente fornecidos por Ribeiro (2012). Os ambientes SV, MC e MT foram coletados em Fevereiro de 2011 e, CP e CH, em Janeiro de 2013. Todas as amostragens foram realizadas no período chuvoso. Em todos os casos, a profundidade amostrada foi de 0 cm a 20 cm, com coletas realizadas ao acaso e em duplicata a partir do ponto central de cada área de plantio [com exceção de CH, ver Camargo (2013)].

O microbioma SV possuía em fase de desenvolvimento a cultivar de cana-de-açúcar RB965911 em seu 4^o estágio de corte. A colheita de cana-de-açúcar nesta área é totalmente mecanizada e o preparo de solo é o convencional. Este talhão está localizado a 502 m de altitude nas coordenadas 21°49'41,07"S (latitude) e 48°36'11,46"O (longitude) onde houve aplicação de vinhaça nos anos de 2008, 2009 e 2010. No dia da coleta, o solo SV apresentava depositado sobre si muita matéria orgânica vegetal que era resíduo de restos culturais de colheitas anteriores. MC esteve localizado a 480 m de altitude nas coordenadas 21°49'35,17"S e 48°36'41,06"O e era deste canal que o ambiente SV recebia a vinhaça por irrigação. No final de 2010, este canal foi assoreado pelas chuvas constantes, que em conjunto da força de deslocamento da vinhaça, inviabilizaram o uso de MC devido a deposição constante de diferentes particulados de solo e matéria orgânica oriunda da própria vinhaça e de restos culturais de cana-de-açúcar. O canal mestre é utilizado pelas indústrias no transporte de vinhaça produzida na Usina para as áreas

de plantio de cana-de-açúcar, onde a vinhaça é bombeada do canal para o local de cultivo. MT está localizada a 475 m de altitude, nas coordenadas 21°48'32,77"S e 48°36'23,68"O. Este bioma está sujeito a perturbações antropogênicas (perturbações por passagem de máquinas e introdução de resíduos de adubos químicos e orgânicos arrastados pelas águas das chuvas) devido à proximidade com as áreas de plantio de cana-de-açúcar. No dia da coleta, este ambiente apresentava grande quantidade de serapilheira, formada por restos vegetais provenientes da própria mata. CH está localizado nas coordenadas 20°55'59.90"S e 48°25'49.36"O. Este ambiente apresentava apenas o cultivo de cana-de-açúcar e era ausente quanto a ação da fertirrigação de vinhaça. A coleta de solo deste bioma foi precedida do procedimento de queima e colheita manual da cana-de-açúcar. No dia da coleta este solo estava muito úmido devido as chuvas constantes e também apresentava depositado sobre o solo um pouco de restos culturais. A área onde CP estava depositada localiza-se em um pátio destinado somente ao depósito de torta de filtro residual que não foi utilizada na incorporação ao solo de áreas destinadas ao plantio de cana-de-açúcar. Além de fornecer muitos nutrientes (principalmente fósforo), a torta de filtro na Usina Santa Fé S.A. é utilizada principalmente no fornecimento de umidade (no geral, possui 60% de umidade) que é devolvida para o solo no período de seca, o que favorece o desenvolvimento da planta de cana-de-açúcar quando os canaviais são renovados ou estão em fase de desenvolvimento após colheita. O material coletado neste ambiente estava a aproximadamente um mês empilhado, o qual não foi submetido a procedimentos de correção carbono : nitrogênio (30:1). Seu aspecto e textura no momento da coleta era seco, não apresentando nenhuma característica dos 60% de umidade que possui imediatamente após sair do filtro prensa ou rotativo na indústria. Desde a deposição neste pátio, não foi feito o revolvimento da torta de filtro para evitar proliferação de agentes microbianos anaeróbios. Do ponto de vista nutricional, a anaerobiose não é interessante, pois em sistemas de compostagem (que pode utilizar torta de filtro) este processo provoca perda de nutrientes do sistema, pois a atividade desta população microbiana exige o consumo de nutrientes do meio e, por este motivo, o produto final é pobre em nutrientes e classificado como semicomposto (ou compostagem incompleta).

Segundo a classificação climática de Koeppen as cidades de Nova Europa-SP e Bebedouro-SP localizam-se a Noroeste do estado de São Paulo, as quais possuem climas mais quentes, enquadrando-se no tipo *Aw*. Isto configura clima tropical chuvoso com inverno seco e mês mais frio, onde a cidade de Nova Europa apresenta temperatura média anual de 29,3°C e a precipitação média anual é de 1.341,4 mm. A cidade de Bebedouro apresenta temperatura média anual de 31,0°C e precipitação média anual de 1.333,8 mm. Em Janeiro a cidade de Nova Europa apresenta temperatura média de 25,1°C com precipitação média de 247,2 mm e, a cidade de Bebedouro, apresenta em Fevereiro, temperatura média de 26,0°C e precipitação média de 199,7 mm (CIPAGRI, 2014). Estes dados refletem a proximidade climática entre as duas regiões, mesmo que ambas estejam localizadas em posições geográficas diferentes.

As quatro amostras de solos foram secas naturalmente e encaminhadas para análises dos parâmetros físico-químicos no Laboratório de Análise de Solo do Departamento de Solos e Adubos localizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista de Jaboticabal/SP (UNESP/FCAV). O material orgânico de CP foi caracterizado quanto composição estrutural de seu constituinte fibroso (mistura do bagaço de cana-de-açúcar moído) no Laboratório de Nutrição Animal (LANA) do Departamento de Zootecnia da UNESP/FCAV.

4.2 Crescimento da cepa de *Rhizobium etli* LGM 17827

A estirpe *Rhizobium etli* foi utilizada como controle positivo para as amplificações parciais do gene 16S rRNA com uso dos iniciadores Y1 e Y2 (YOUNG et al., 1991), os mesmos que foram utilizados para obtenção do *amplicons* do DNA metagenômico dos 5 microbiomas. Para o crescimento desta bactéria foi utilizado o meio de cultivo estéril *Tryptone-Yeast Extract* (TY) (BERINGER, 1974) com pH 7,2. Este meio é composto por 5,0 g/L de Triptona, 3,0 g/L de Extrato de Levedura, 0,87 g/L de CaCl₂ e, quando sólido, 9,0 g/L de Agar Bacteriológico.

4.3 Extração de DNA genômico de *R. etli* LGM 17827

O protocolo utilizado foi baseado no método descrito por Marmur (1961), com adaptações. Foram utilizados aproximadamente 0,05 g de *pellet* de *R. etli*. Essas células foram sedimentadas em tubos novos de 1,5 mL estéreis, sendo ressuspensas em 400,0 µl de solução salina 0,85% (p/v). Em seguida, foram adicionados 40,0 µl de lisozima na concentração de 20 mg/mL, a seguir, agitou-se os tubos em vortex. Após a agitação, foram adicionados 13,0 µl de RNase (10 µg/mL) aos tubos que foram então deixados em banho-maria por 2 h a 37°C, com inversões suaves a cada 30 min.

Transcorrido o tempo, adicionou-se 35,0 µl de SDS 25% (p/v), submetendo os tubos à inversão manual suave por 5 min. Ao preparo adicionou-se 158,0 µl de Acetato de Sódio 3M e pH 5,2, invertendo os tubos manualmente por 5 min. Em seguida adicionou-se 650,0 µl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) (v/v), misturando os reagentes por inversão manual. Os tubos foram centrifugados em centrífuga modelo 5810 R (Eppendorf) a 15.294 xg, a 4°C por 15 min.

A fase superior foi coletada e transferida para novos tubos de 2,0 ml estéreis, adicionando-se a esta fase dois volumes de etanol absoluto gelado e invertendo gentilmente os tubos manualmente para homogeneizar os reagentes. Os tubos foram deixados no *freezer* -80°C por 20 min, sendo centrifugados a 15.294 xg, a 4°C por 30 min. Depois de descartar o sobrenadante foi adicionado 1,0 ml de etanol 70% (v/v) gelado, seguindo para centrifugação a 15.294 xg, a 4°C por 5 min. Após descarte do sobrenadante, os tubos tiveram o excesso de etanol evaporado em Concentrator *plus* (Eppendorf), na opção D-AL e sem ajuste de temperatura. O DNA foi ressuspensado em 100,0 µl de TE (Tris e EDTA) 10:1 e pH 8,0 e deixados durante a noite na geladeira a 4°C.

No dia seguinte o DNA genômico foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml) e tampão de corrida TBE 1X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3) em voltagem constante de 90 V por aproximadamente 1 h e 30 min. No gel foram aplicados 3,0 µl de DNA genômico acrescidos de 5,0 µl de tampão de carregamento [0,025% de azul

de bromofenol (p/v) e 50% de glicerol (v/v)]. O gel foi fotodocumentado em aparelho Bio-Rad Modelo Universal HoodI (Bio-Rad Laboratories, Fabricado nos U.S.A.) e o DNA foi quantificado em aparelho Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific – Uniscience) onde o critério de avaliação de contaminação por proteínas ou resíduo de reagentes foi baseado nos resultados obtidos pela relação dos comprimentos de onda 260/280. A concentração do DNA foi obtido em ng/μl. Foi utilizado o software ND-1000 v3.7.1 para obtenção da concentração e pureza. Quando as amostras de DNA não fossem utilizadas em curto prazo, as mesmas foram estocadas em freezer -20°C.

4.4 Extração e quantificação do DNA metagenômico

A extração e quantificação do DNA metagenômico da população de micro-organismos presentes nos 5 biomas foram realizadas no mesmo dia da coleta de cada amostra. As extrações foram realizadas em triplicata a partir de porções recuperadas da homogeneização (amostras compostas dos dois pontos de cada ambiente) de cada solo em separado (mesmo procedimento para o semicomposto), onde todos os DNA metagenômicos extraídos ficaram estocados em freezer -20°C até o momento do uso. Para a extração do DNA metagenômico foi utilizado o Fast DNA® kit for Soil (Bio 101-Quantum Biotechnologies). O método de quantificação e avaliação da qualidade do DNA foi o mesmo descrito no item 4.3.

4.5 Amplificação do gene 16S rRNA

O DNA metagenômico dos 5 biomas foi submetido à amplificação parcial dos 300 pb iniciais (regiões V1 e V2) do *amplicon* 16S rRNA com o uso de oligoiniciadores (*primers*) Y1 e Y2. A reação de amplificação foi realizada utilizando Tampão 1X, 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 5 U/μl de Taq Polimerase (Ludwig), 5 pmol/μl dos *primers* Y1 e Y2, aproximadamente 80,0 ng/μl de cada DNA

metagenômico. O perfil térmico da PCR foi programado em termociclador modelo PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.) e era constituído de 7 ciclos: 1) 95°C por 2 min; 2) 95°C por 45 s; 3) 65°C por 45 s; 4) 72°C por 1 min e 30 s; 5) 35 repetições do ciclo dois ao quatro; 6) 72°C por 5 min; e 7) 4°C por 24 h.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v), contendo brometo de etídio e tampão de corrida TBE 1X em voltagem constante de 80 V por aproximadamente 1 h e 30 min. No gel foram aplicados 3,0 µl de cada amostra com adição de 5,0 µl de tampão de carregamento. O gel foi fotodocumentado conforme descrição do item 4.3.

4.6 Seleção dos fragmentos de 300 pb de comprimento

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão (*low melting point*; Bio-Rad Laboratories) 1,5% (p/v), isento de brometo de etídio, para a seleção dos fragmentos de tamanho aproximado a 300 pb. A cuba para eletroforese utilizada foi à modelo Horizon 58 previamente descontaminada da presença de brometo de etídio pela adição de água sanitária comum 5% (v/v) no compartimento que comporta o gel e o tampão de corrida. Os componentes utilizados para a solidificação do gel foram colocados nesse compartimento e deixados de molho em água sanitária comum 5% por 40 min. Em seguida, enxaguou-se bem a cuba e seus componentes em água corrente, secando-os após o termino do enxágue. O conjunto foi exposto à luz UV por 20 min como passo final.

O volume final contendo os produtos de PCR foi acrescido de 20% de tampão de carregamento (v/v) e, 15,0 µl dessa mistura (guia), foi aplicada no gel de agarose ao lado de 6,0 µl do marcador GeneRuler™ 1 kb DNA ladder para servir de guia na recuperação dos produtos de 300 pb. A amostra a ser recuperada foi aplicada em volume total num poço largo do gel. A eletroforese foi conduzida em tampão TAE 1X (40 mM Tris-Acetato, 1 mM de EDTA) gelado isento de brometo de etídio, com voltagem constante de 90 V por aproximadamente 5 h.

Ao término da eletroforese foi realizado um corte vertical no gel de agarose resultando em 2 porções: A) contendo o marcador e o guia da amostra e, a outra; B) contendo os insertos a serem recuperadas (poço largo) (Figura 2). A parte A foi corada com brometo de etídeo e observada em transiluminador (BIO RAD – GEL DOC 1000) para que com a ajuda do marcador fosse possível confirmar o tamanho dos fragmentos a serem recuperados utilizando o guia. Com o auxílio de um pedaço de palito de madeira a região contendo os 300 pb foi marcada, servindo como guia para recuperar da porção B os fragmentos que não foram corados com brometo de etídeo. Essa porção foi protegida com plástico filme para que não entrasse em contato com o brometo de etídeo do gel corado. Após serem cortados com lâmina de bisturi estéril (flablada), os pedaços dos géis recuperados (para os 5 biomas) pesando aproximadamente 500 mg, foram depositados em tubos novos de 2,0 ml estéreis seguindo para eluição dos fragmentos.

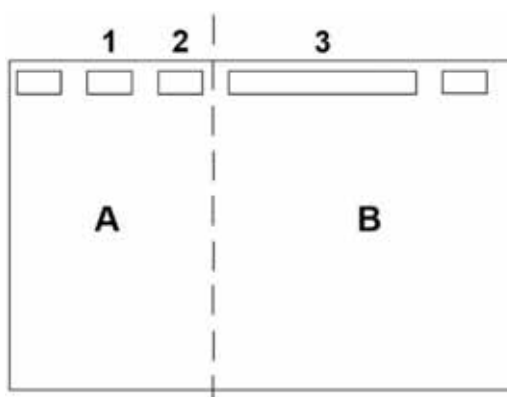


Figura 2. Ilustração do gel da preparativa demonstrando a parte A (corada com brometo de etídeo) e a parte B (não corada com brometo de etídeo). Na canaleta 1 foi aplicado 6,0 μ l do padrão GeneRuler™ 1 kb DNA ladder; na canaleta 2 foi aplicado 15,0 μ l da amostra guia para identificação dos 300 pb após corar com brometo de etídeo; e por último, na canaleta 3, foi aplicado o volume restante da amostra a ser recuperada.

4.7 Eluição dos fragmentos de 300 pb recuperados em gel

Os géis contendo os fragmentos de 300 pb foram eluídos e purificados conforme instruções do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). O DNA foi analisado conforme especificações do item 4.3, utilizando gel de agarose 1,5% (p/v).

4.8 Clonagem dos produtos de 300 pb purificados

Para a clonagem dos fragmentos purificados foi utilizado o CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas), com algumas alterações na execução do protocolo. Para o cálculo da massa de inserto necessária a realização da reação de ligação do inserto ao vetor, foi realizado o seguinte cálculo baseado no protocolo pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega):

$$M.I. = \frac{TI \times mv}{TV}$$

Onde:

M.I. = Massa de inserto

TI = Tamanho do inserto

mv = Massa do vetor

TV = Tamanho do vetor

A massa de inserto requerida foi de 15 ng de *amplicons* de aproximadamente 300 pb (considerando relação inserto/vetor de 3 : 1), independentemente do ambiente amostrado. A seguir, todos os passos descritos na reação *blunting* do protocolo CloneJET™ PCR Cloning Kit, foram realizados com algumas modificações. A célula competente utilizada neste estudo foi a *Escherichia coli* DH10B, gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos do

Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal/SP. Após misturar a reação de ligação no tubo contendo 200,0 µl de célula competente (tubo inserido no gelo), o mesmo foi levado ao banho-maria a 42°C por 90 s e imediatamente após esse período foi deixado no gelo por 5 min. O plaqueamento dos clones foi realizado em placas de petri contendo meio sólido estéril LB (Luria Bertani) (BERTANI, 1951) que contém em sua formulação: triptona 10,0 g/L; extrato de levedura 5,0 g/L; NaCl 10,0 g/L; agar bacteriológico 9,0 g/L; antibiótico ampicilina (50 µg/ml). Após a inoculação os clones foram mantidos em estufa de B.O.D. a 37°C por aproximadamente 20 h.

4.9 Cultivo dos clones para validação

Para cada um dos 5 biomas, 20 colônias foram coletadas aleatoriamente com o auxílio de palitos de madeira esterilizados em autoclave. Esses clones foram transferidos para tubos tipo falcon de 15 ml contendo 1,0 ml de meio LB líquido acrescido de 50 µg/ml de ampicilina. Os tubos foram incubados durante a noite a 250 rpm, por aproximadamente 20 h a 37°C.

4.10 Extração do DNA plasmidial para validação da biblioteca

Após o desenvolvimento dos 20 clones (para cada um dos 5 biomas), os mesmos foram centrifugados em centrífuga Eppendor a 15.600 xg, por 5 min e 25°C, seguindo do descarte do sobrenadante. Os *pellet* bacterianos foram lavados pela ressuspensão em 200,0 µl de NaCl 0,85% (p/v).

A extração do DNA plasmidial foi realizada conforme método estabelecido por Sambrook (2001), com adaptações. Os *pellets* celulares foram ressuspensos em 100,0 µl de solução GET (50 mM de glicose, 25 mM de Tris-HCl pH 8,0; 10 mM de EDTA pH 8,0) e, em seguida, foram adicionados 13,0 µl de RNase e 200,0 µl de Solução de Lise (0,2 M de NaOH e 1% de SDS [p/v]) recém-preparada. Os tubos

foram invertidos gentilmente de forma manual por 5 vezes, para que houvesse a homogeneização das soluções neles contidas. A seguir, foram adicionados 150,0 µl de Acetato de Potássio 3M e pH 5,2 gelado, seguindo de inversão manual gentil por 10 s, deixando os tubos repousarem por 5 min no gelo. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 14.000 xg, por 5 min na temperatura de 4°C.

O sobrenadante foi transferido para novos tubos de 2,0 ml estéreis e, como passo opcional, adicionou-se igual volume (tomando por base o volume de sobrenadante recuperado) de fenol : clorofórmio (v/v), misturando-os em vortex. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 14.000 xg, por 2 min na temperatura de 4°C. Novamente o sobrenadante foi transferido para novos tubos de 2,0 ml estéreis.

O DNA foi precipitado com a adição de 1 volume de isopropanol a temperatura ambiente, misturando a solução em vortex e deixando a mistura sobre a bancada por 2 min a temperatura ambiente, seguindo para centrifugação a 14.000 xg, por 5 min na temperatura de 4°C.

O sobrenadante foi cuidadosamente descartado, deixando os tubos invertidos em papel absorvente até as paredes dos mesmos não apresentarem traços do isopropanol. Os *pellet* de DNA foram ressuspensos com a adição de 1,0 ml de etanol gelado 70% (v/v). Removeu-se o sobrenadante cuidadosamente e os tubos foram secos em Concentrator *plus* (Eppendorf) na opção D-AL por 10 min sem temperatura especificada. O DNA foi novamente ressuspensado em 50,0 µl de água Milli-Q ultra pura autoclavada e filtrada. Os tubos tipo *ependorf* foram mantidos durante a noite em temperatura de 4°C na geladeira. A quantificação do DNA plasmidial extraído foi avaliada quanto a contaminação por proteína ou solução residual com o uso do aparelho Nanodrop, conforme descrito no item 4.3. Quando as amostras de DNA não fossem utilizadas em curto prazo, as mesmas foram estocadas em *freezer* -20°C.

4.11 PCR de validação dos clones

Os 20 tubos contendo o DNA plasmidial dos clones coletados e maneira aleatória para os 5 ambientes, foram submetidos a reação de validação da inserção

dos 300 pb no vetor, conforme especificações do protocolo CloneJET™, com algumas modificações. A reação continha Tampão 1X; 0,2 mM de dNTPs; 2 mM de MgCl₂; 5 pmol/μl dos *primers* pJET1.2 Forward e pJET1.2 Reverse; e 1U de Taq DNA Polimerase. O DNA plasmidial foi utilizado na concentração de 105 ng e o perfil térmico da reação de PCR era o seguinte: 1) 95°C por 3 min; 2) 94°C por 30 s; 3) 60°C por 30 s; 4) 72°C por 30 s; 5) 25 repetições do ciclo 2 ao 4; 6) 4°C por 24 h. Os padrões dos fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose 1,5% (p/v) conforme descrição do item 4.3. Como foram utilizados os *primers* do vetor, era esperado um fragmento de aproximadamente 300 pb.

4.12 Cultivo dos clones validados

Após a validação das 5 bibliotecas de cada bioma, os clones transformados em placa de petri de cada ambiente foram coletados e organizados em placas de estoque do tipo ELIZA de 96 poços contendo cada um 100,0 μl de meio LB líquido acrescido de 50 μg/ml de ampicilina. Um total de 500 clones para cada bioma (total de 2.500 clones) foi recuperado. As placas foram seladas com adesivos apropriados e incubadas durante a noite por aproximadamente 20 h em estufa B.O.D. a 37°C. Após o período de incubação foram adicionados 100,0 μl de glicerol 40% (v/v) nos 96 poços das placas (dentro do fluxo laminar), seguindo para o armazenando das mesmas em *freezer* -80°C quando não utilizadas.

Para a replicação dos clones destinados a extração de DNA plasmidial que seria encaminhado para o sequenciamento, as placas de cultivo (Mega Titer, 96 wells, 2.5 ml) continham 1,0 ml de meio LB líquido com ampicilina. Quando congelados em *freezer* -80°C, os clones organizados nas placas do tipo ELIZA foram descongelados em temperatura ambiente (fora do fluxo laminar) por 30 min. Após o descongelamento, as placas do tipo ELIZA ainda seladas pelos adesivo, foram centrifugadas em centrífuga Eppendorf a 3.220 xg, por 1 min a 25°C. A seguir, as placas do tipo ELIZA foram manipuladas em fluxo laminar junto das placas de cultivo. Após remoção dos adesivos protetores, foi utilizado replicador para inocular os 96 clones de cada placa do tipo ELIZA nas placas de cultivo, estas

previamente suplementadas com ampicilina. As placas de cultivo inoculadas foram seladas com novos adesivos e submetidas a agitação em aparelho *shaker* New Brunswick Scientific modelo Excella E24 a 250 rpm, por aproximadamente 20 h a 37°C para o desenvolvimento dos clones.

Ao término do período de desenvolvimento dos clones, foi realizado a centrifugação das placas de cultivo em centrífuga Eppendorf a 3.220 xg, por 10 min a 20°C. O sobrenadante (meio líquido e metabólitos) foi descartado e o *pellet* de células foi lavado com a adição de 300,0 µl de solução GET, seguido de centrifugação nas condições mencionadas anteriormente. Quando não fosse realizado a extração de DNA plasmidial no mesmo dia, as placas contendo os *pellet* foram estocadas em *freezer* -80°C.

4.13 Extração do DNA plasmidial dos clones estocados em placas do tipo ELIZA

As bibliotecas dos 5 biomas tiveram o mesmo tratamento para extração do DNA plasmidial. Cada um dos *pellet* dos 96 clones foram ressuspensos em 60,0 µl de GET contendo RNase e, em seguida, foi realizada agitação da placa em vortex. Após essa ação, as placas foram deixadas em repouso na bancada por 5 min a temperatura ambiente. Foram adicionados 200,0 µl de Solução de Lise previamente preparada em cada pocinho, seguindo de agitação suave e repouso por 5 min em temperatura ambiente. Foram adicionados mais 120,0 µl de Acetato de potássio e, após agitação suave para mistura dos reagentes, as placas foram estocadas em *freezer* -80°C durante a noite.

Após deixar as placas de cultivo em temperatura ambiente por aproximadamente 5 min, elas foram centrifugadas a 3.220 xg, por 45 min a 20°C. Aproximadamente 120,0 µl do sobrenadante foi transferido para outras placas do tipo ELIZA autoclaváveis, seguindo de centrifugação a 3.220 xg, por 20 min a 10°C. A seguir, aproximadamente 100,0 µl do sobrenadante foram transferidos para novas placas do tipo ELISA. Foram adicionados aos pocinhos um volume (com base no volume de sobrenadante recuperado) de isopropanol seguindo de adição

de adesivo resistente. As placas foram acondicionadas em *freezer* -80°C durante a noite.

As placas foram deixadas a temperatura ambiente por 5 min, seguindo de centrifugação a 3.220 xg, por 45 min a 4°C. Após descarte do isopropanol e adição de 200,0 µl de etanol 70% (v/v) gelado em cada pocinho, as placas foram centrifugadas por 5 min nas condições anteriores, seguindo do descarte do sobrenadante. O etanol residual presente nos pocinhos das placas, foi evaporado em Concentrator *plus* (Eppendorf) utilizando a opção D-AL e sem ajuste de temperatura. O DNA foi ressuspendido em aproximadamente 20,0 µl de água milli-Q ultrapura altoclavada e filtrada e, em seguida, as placas foram deixadas durante a noite na geladeira em temperatura de 4°C. O DNA plasmidial foi avaliado conforme descrição do item 4.3, utilizando gel 1,5% (p/v).

4.14 Sequenciamento do 16S rRNA dos clones bacterianos

O mapa do vetor de clonagem pJET1.2/*blunt* disponível no kit CloneJET™ pode ser visualizado na Figura 3. Nela é possível observar que o vetor foi linearizado por restrição com a enzima *Eco32I* (*EcoRV*) onde a extremidade 5' está fosforilada e se apresenta na forma cega (*blunt*).

Eppendorf a 3.220 xg, a 20°C por 5 min. Esta última operação foi repetida por mais duas vezes e as amostras tiveram o etanol residual evaporado com uso do Concentrator *plus* (Eppendorf), utilizando a opção D-AL e 30°C por 20 min.

Em seguida, as amostras foram ressuspensas com 9,0 µl Hi-Di Formamide (ABI Prism, Catálogo-P/N 4311320) e desnaturadas a 95°C por 5 min. O sequenciamento dos produtos foi realizado em sequenciador capilar modelo ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Perkin Elmer).

4.15 Análise da qualidade das sequências e busca por estruturas quiméricas

Para verificar a qualidade das sequências geradas utilizou-se o programa Sequencing Analysis 3.4 e, os eletroferogramas obtidos, foram submetidos à análise do programa Phred (GORDON et al., 1998). A seleção das sequências fasta utilizadas nas análises subsequentes foram aquelas que apresentavam qualidade Phred maior ou igual a 20.

Em seguida, as sequências obtidas foram checadas quanto à presença de quimeras utilizando o *software on-line* DeChiper (WRIGHT et al., 2012). O conjunto de sequências não quiméricas e livres de vetor, foram confrontadas com o banco de dados público Ribosomal Database Project (RDP II) com confiabilidade de 80% utilizando a ferramenta *Classifier* e, para visualização dos códigos de acesso das sequências mais similares, foi utilizado a ferramenta *Seqmatch* (COLE et al., 2013). Todas as sequências com até 80% de confiança na classificação de domínio bactéria, foram recuperadas para as análises subsequentes. Uma média de 20 sequências quimeras foram detectadas em cada conjunto de dados dos 5 biomas. Essas análises foram refeitas após a atualização deste banco de dados em 2013 e não foi observada nenhuma mudança nos padrões de classificação taxonômica. Para estas análises um total de 1.090 sequências foram utilizadas (não quiméricas) e todas trimadas a partir da ferramenta Blastn disponível no National Center for Biotechnology Information (NCBI). Destas 1.090 sequências, 280 são pertencentes a SV, 207 a MC, 193 a MT, 271 a CH e 139 a CP.

4.16 Análises de α -diversidade, γ -diversidade, β -diversidade e teste de diferenças na estrutura das comunidades bacterianas

Para o alinhamento das sequências foi utilizado o *software* ClustalW (THOMPSON et al., 1994) disponível no pacote de programas BioEdit (HALL, 1999). Após o alinhamento, as extremidades foram retiradas no passo da edição de áreas pouco informativas. Em seguida, o arquivo no formato fasta originado, foi convertido para o arquivo .meg utilizando o *software* Mega 5.05 (TAMURA et al., 2011).

Em paralelo, o arquivo contendo as sequencias alinhadas foi utilizado na construção da matriz de distâncias utilizando o *software* Dnadist disponível no pacote de programas Phylip v3.6 (FELSENSTEIN, 2005). O arquivo resultante foi utilizado como arquivo de entrada para o *software* Mothur (SCHLOSS et al., 2009). A α -diversidade (diversidade do próprio ambiente) foi obtida através das análises de cada clone para a construção da curva de rarefação, richness, evenness, índice de diversidade Shannon (H) e Chao 1, considerando uma distância evolucionária de 3% de diferenças (ou 97% de similaridade entre as sequencias do gene 16S rRNA). O H foi utilizado para estimar a γ -diversidade (diversidade entre as amostras, ou seja, regional) das amostras. Para avaliação da similaridade entre as comunidades bacterianas dos 5 biomas (β -diversidade), o cálculo foi baseado na abundância de similaridade Jaccard entre as comunidades utilizando um corte de 97% de similaridade.

A análise UniFrac (LOZUPONE et al., 2006) foi utilizada para comparar os clones das bibliotecas tendo como base os dados da árvore obtida a partir das distância genéticas entre as 1.090 sequências. Estes dados foram obtidos pela execução do programa Neighborn disponível no pacote do Phylip. O arquivo contendo as instruções para a construção da árvore gerado por Neighborn, foi utilizado como entrada para o programa UniFrac. Considerando o passo de normalização, o teste UniFrac foi executado para verificar a ocorrência de diferenças significativas de cada par de amostra, utilizando 100 permutações, escolha da opção de Jackknife Environment Clusters e seleção do algoritmo ponderado (considera

abundância relativa de UTOs). Para aferir se as comunidades bacterianas diferente estatisticamente entre si, foi realizado o teste Libshuff utilizando o teste estatístico de Cramer-von Mises, onde um $p \leq 0,05$ confirmaria as diferenças entre as comunidades. Os *p-value* foram corrigidos utilizando a correção de Bonferroni.

5 RESULTADOS E DISCUSÃO

5.1 Perfil da eletroforese após amplificação do gene 16S rRNA do DNA metagenômico

O DNA metagenômico dos cinco ambientes da indústria sucroenergética foram extraídos no mesmo dia da coleta. Na Figura 4 é mostrado como exemplo o perfil do DNA metagenômico obtido de SV, perfil este que se repetiu para os outros quatro biomas.

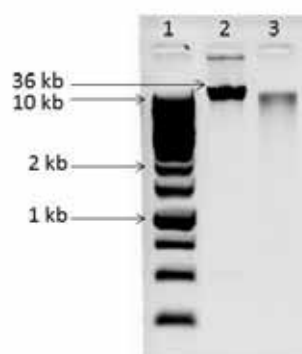


Figura 4. Perfil da eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) da amostra de DNA metagenômico obtida de SV. Na canaleta 1 foi aplicado 6,0 μ l de padrão GeneRuler™ 1 kb DNA ladder (Fermentas); canaleta 2 foi aplicado 6,0 μ l de padrão GeneRuler™ ladder, High Range (Fermentas); e no poço 3 foi aplicado 3,0 μ l de DNA metagenômico acrescido de 5,0 μ l de tampão de carreamento.

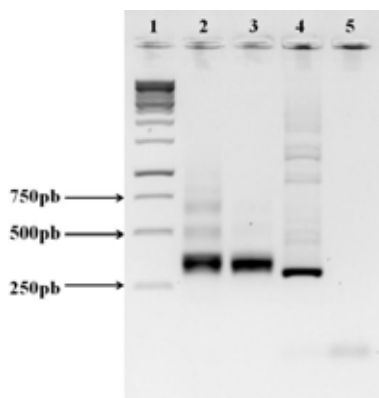


Figura 5. Padrão dos produtos de PCR do solo SV antes e depois da purificação. Na canaleta 1 foi aplicado 3,0 μ l de padrão; na canaleta 2 foi aplicado 5,0 μ l dos produtos de PCR não purificados acrescido com 3,0 μ l de tampão de carregamento; na canaleta 3 foi aplicado 5,0 μ l dos produtos de PCR purificados acrescido com 3,0 μ l de tampão de carregamento; na canaleta 4 foi aplicado 5,0 μ l dos produtos de PCR obtidos da amplificação do DNA do controle positivo (*R. etli* LGM 17827) acrescido de 3,0 μ l do tampão de carregamento; e na canaleta 5 foi aplicado 5,0 μ l da reação do controle negativo (continha água no lugar do DNA) acrescidos de 3,0 μ l de tampão de carregamento.

Em seguida, foi realizada a amplificação parcial dos 300 pb iniciais (regiões V1 e V2) do gene 16S rRNA nas cinco amostras, utilizando os *primers* Y1 e Y2. Devido à presença de bandas inespecíficas, foi realizada uma etapa de purificação desses fragmentos, conforme visualizado na Figura 5. O DNA amplificado e purificado foi utilizado na clonagem e obtenção dos transformantes portadores do gene 16S rRNA ligado no vetor. Antes da coleta total dos clones foi realizada coleta de 20 clones ao acaso para cada bioma. Depois do cultivo, foi feita a extração do DNA plasmidial que foi utilizado na validação da ligação do inserto de aproximadamente 300 pb no vetor. Na Figura 6 podem ser visualizados os diferentes padrões dos produtos amplificados, demonstrando o sucesso da clonagem dos fragmentos do gene alvo.

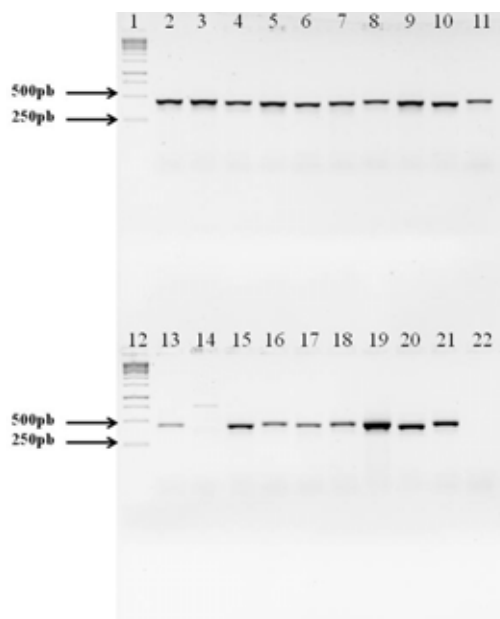


Figura 6. Perfil eletroforético da validação por PCR dos 20 clones pertencentes ao bioma SV, coletados ao acaso. Nas canaletas 1 e 12 estão aplicados 3,0 µl de padrão. Nas demais canaletas foram aplicados 5,0 µl de cada um dos DNA's extraídos e, em seguida, houve o acréscimo de 3,0 µl de tampão de carreamento em cada uma das amostras. Além dos diferentes padrões obtidos depois da amplificação utilizando *primers Forward* e *Reverse* do vetor, foi possível concluir que os clones das canaletas 14 e 22 são possíveis falso positivos, pois o clone da canaleta 22 apresentou insertos maiores/menores que 300 pb e, o clone da canaleta 22, não apresentou nenhum inserto aparente.

Após a validação de todos os clones dos cinco ambientes, os mesmos foram coletados e organizados em 5 placas (cada ambiente) tipo Eliza em condições estéreis. Um total de 2.500 clones foram obtidos onde cada ambiente teve 500 clones recuperados. Após a replicação dos mesmos, foi realizada a extração do DNA plasmidial e o sequenciamento, seguindo do estoque das bibliotecas de clones acrescidos de glicerol no *freezer* -80°C.

5.2 Táxons verificados em SV

No solo com fertirrigação de vinhaça e plantio de cana-de-açúcar (SV) foram observados 11 filos bacterianos diferentes, conforme classificação no banco de dados Ribosomal Database Project II (RDP II). Os três filos de maior representação

foram Proteobacteria (30,71 %), Acidobacteria (27,50 %) e Actinobacteria (5,70 %) embora outros filos menos frequentes também foram encontrados. O RDP II conta com um nível de classificação especial, o qual comporta sequências que não obtiveram similaridade próxima a alguma sequência de bactéria depositada nesta base de dados. Esta categoria é chamada de bactéria não classificada e, no bioma SV, contou com aproximadamente 21 % das sequências afiliadas (Figura 7). Um perfil de distribuição de filos bacterianos parecido com o deste trabalho, foi observado em um solo com plantio de cana-de-açúcar e diferenças na adubação nitrogenada (PISA et. al., 2011), podendo ser um indicativo de que os nutrientes derivados de produtos nitrogenados e vinhaça podem atuar na seleção destes táxons bacterianos naturalmente presentes no solo.

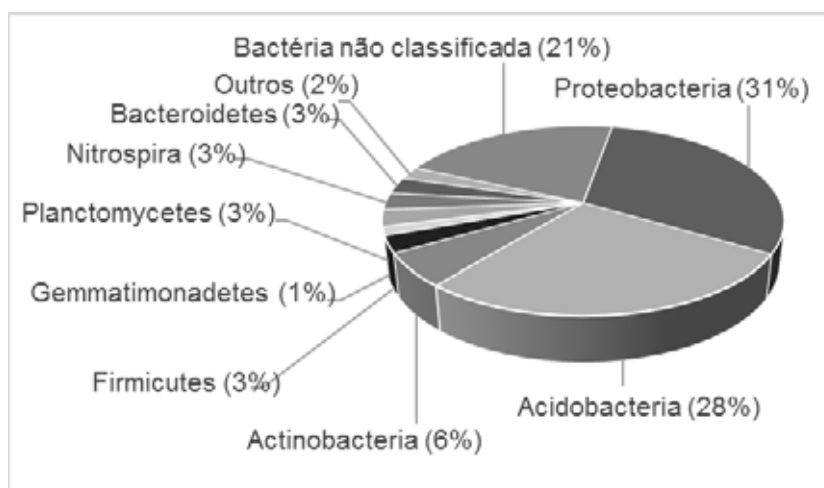


Figura 7. Classificação em nível de filo para as 280 sequências de SV utilizando a ferramenta *Classifier* do RDP II com um corte de 80% de confiança. Na figura são mostrados os filos mais frequentes encontrados em SV, incluindo o grupo de bactérias não classificadas que apresentaram elevada abundância (aproximadamente 21%).

O elevado número de sequências não classificadas, também pode ser relacionado a duas situações diferentes: 1) mesmo que o banco de dados RDP II disponibilize ferramentas poderosas utilizadas na classificação de sequências e passado por recentes atualizações em seu conjunto de dados (COLE et al., 2013), este ainda pode não conter disponíveis informações suficientes para melhorar as análises comparativas, pois qualquer banco de dados é alimentado pelas

sequencias geradas a partir da identificação de micro-organismos e, as técnicas tradicionais de cultivo utilizadas pela microbiologia apresenta o entrave técnico de acessar apenas 1% dos procariotos que são conhecidos ao homem. Este é um desafio científico que será superado somente quando a complexidade metabólica desses micro-organismos for suprida com o fornecimento de meios de cultivo mais elaborados do que aqueles conhecidos na atualidade (HANDELSMAN, 2004); 2) embora existam trabalhos sendo realizados em solos com cultivo de cana-de-açúcar no Brasil (DINI-ANDREOTTI et al., 2010; PISA et al., 2011), esta eleva quantidades de sequencias afiliadas a bactérias não cultivadas pode refletir a falta de informações à cerca da população total de procariotos presentes em solos com manejo de cana-de-açúcar, podendo ser um indicativo de que estes ambientes contenham elevada diversidade de táxons bacterianos ainda não explorada.

Em ecossistemas como o solo sobre cultivo agrícola é encontrada elevada diversidade de filos de Proteobacteria, Acidobacteria e Actinobacteria. Dentro destas classificações taxonômicas também são identificados muitas afiliações de clones bacterianos em nível de ordem, família, gênero e espécie e, como acontece em qualquer tipo de ambiente, a frequência e distribuição desses ribotipos bacterianos é afetada pela interação desses indivíduos com toda população de organismos (fungos, protozoários e mesmo plantas). Outro fator que pode contribuir para a frequência de grupos bacterianos é o tamanho e normalização da biblioteca de clones (JANSSEN, 2006). Quando comparado a outros ambientes que também tiveram a introdução de substâncias não naturais do ambiente, SV apresenta proporção de filos mais frequentes muito próxima, o que pode indicar que estes grupos bacterianos parecem se adaptar melhor em termos metabólicos a ambientes sobre diferentes ações antrópicas (PISA et al., 2011; ABBAI et al., 2012; KORENBLUM et al., 2012).

Algumas monoculturas podem contribuir para a seleção positiva de alguns táxons em detrimento de outros, como por exemplo no cultivo de eucalyptus, o qual parece favorecer o aumento da abundância relativa dos filos de Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia e redução da frequência de Acidobacteria e Bacteroidetes quando comparado a um solo de mata nativa (Silveira et al., 2006). Quanto a seleção de táxons bacterianos, este fenômeno também é observado em

solos com plantio de diferentes cultivares (SOUZA et al., 2012), uma vez que a rizosfera é responsável por comportar elevada biodiversidade. Nesta região do solo, a população bacteriana desempenha atividades importantes a manutenção da vida, como a ciclagem de nutrientes (carbono, nitrogênio, fósforo, etc) e metabolismo de componentes complexos. Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCP), muito abundantes na rizosfera, são responsáveis por atuarem no controle de fitoparasitas e causar mudanças fisiológicas nas plantas, contribuindo para o aumento da absorção de nutrientes desses vegetais (GAYLARDE et al., 2005; PEREIRA et al., 2008; SANTOS et al., 2010). Das cepas frequentemente isoladas e identificadas em trabalhos brasileiros (SANTOS et al., 2010), nenhuma foi identificada no solo SV, demonstrando que este ambiente pode estar selecionando negativamente tais espécies. PISA et al. (2011) identificaram clones afiliados próximos a gêneros de cepas RPCP conhecidas em solo com plantio de cana-de-açúcar e diferenças na adubação nitrogenada e quando estes resultados são comparados com os obtidos neste estudo, fica evidente que as diferenças na concentração de nitrogênio atua de maneira diferente da aplicação de vinhaça no solo no que diz respeito a seleção de indivíduos relacionados a táxons mais elevados. Isto revela que uma análise mais aprofundada deve ser realizada acerca dos gêneros bacterianos presentes em ambientes como SV (Figura 8).

Na região onde são situadas as áreas de plantio e colheita de cana-de-açúcar da Fazenda Itaquerê é relatada uma característica quase única no que diz respeito ao manejo da cana-de-açúcar, uma vez que as condições ambientais desta região parecem contribuir para os poucos registros de doenças que comumente causam prejuízos nos canaviais de todo o país (dados coletados na Usina Santa Fé S. A.). Aparentemente a diversidade bacteriana aqui desvendada atua em conjunto com as condições ambientais desta região, contribuindo para a boa sanidade cultural observada na área SV. Isto demonstra que a introdução de vinhaça neste ambiente não parece influenciar a predominância de bactérias fitopatogênicas que podem causar perdas consideráveis na produção de cana-de-açúcar. Em particular, o grupo *Acidobacteria* que foi identificado em considerável abundância no solo SV (Figura 8), tem sido apontado como produtor de substâncias antimicrobianas derivadas de seu metabolismo, que atuam no controle de agentes patogênicos, além de serem

relacionados a ambientes com pH ácidos (SILVEIRA et al., 2006) assim como o que é observado em SV (Tabela 1).

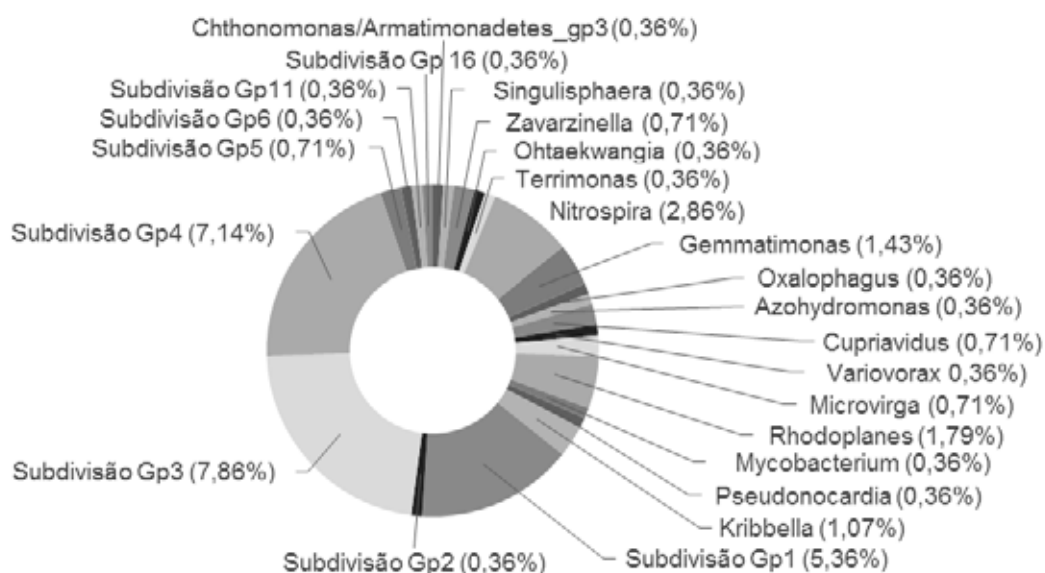


Figura 8. Gêneros bacterianos identificados no bioma SV. Todas as 280 sequências foram identificadas utilizando um corte de confiança de 80% no *Classifier* do RDP II. Na figura são mostradas apenas as sequências em porcentagem que foram classificadas no nível taxonômico de gênero. Os gêneros identificados não estão descritos como os mais frequentemente isolados para RPCP, podendo ser uma evidência de que a vinhaça provoca efeito seletivo sobre as populações de bactérias não comumente identificadas em solos com plantio de cana-de-açúcar sem aplicação de vinhaça.

Tabela 1. Análises das propriedades físico-químicas dos 4 biomas de solo estudados neste trabalho na profundidade de 0-20 cm.

Solos	pH em	M.O.	P resina	K	Ca	Mg	H+AL	SB	T	V
Estudados	CaCl ₂	g/dm ³	mg/dm ³	-----mmol/dm ³ -----						%
SV	5,5	20	33	9,8	44	19	31	72,8	103,8	70
MC	6,4	19	26	10,3	106	26	12	142,3	154,3	92
MT	5,2	23	31	1,1	39	22	38	62,1	100,1	62
CH	4,8	10	9	1	13	7	28	21	49	43

pH = potencial hidrogeniônico; M.O. = matéria orgânica; K = potássio; Ca = cálcio; Mg = magnésio; H+AL = acidez trocável ou potencial ácido; SB = soma de bases; T = Capacidade de Troca de Cátions (CTC) efetiva em pH 7,0; V = porcentagem de saturação por bases; mmol/dm³ = mili centimol por decímetro cúbico

SV = solo com fertirrigação de vinhaça e plantio de cana-de-açúcar; MC = solo heterogêneo depositado sobre o canal-mestre da vinhaça; MT = solo de mata nativa localizada próxima a áreas de cultivo de cana-de-açúcar; CH = solo com plantio de cana-de-açúcar e sem fertirrigação de vinhaça

5.3 Táxons observados na semicompostagem

A análise no RDP II das 139 sequências do gene 16S rRNA recuperados do semicomposto de torta de filtro (CP) demonstraram que a nível de filo a diversidade procariótica é muito baixa, com apenas 4 táxons identificados: 1) Actinobacteria (57%); 2) Firmicutes (22%); 3) Proteobacteria (19%); e Bactérias não classificadas (2%) (Figura 9).

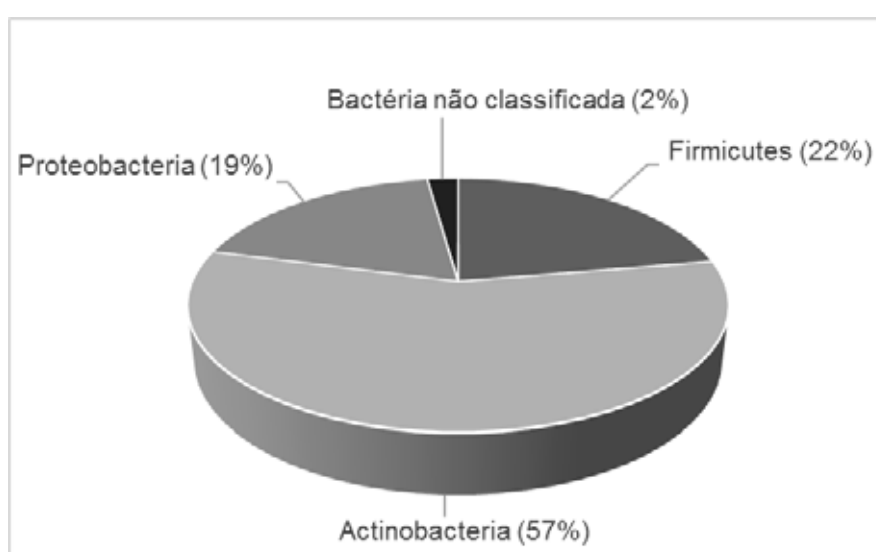


Figura 9. Porcentagem de sequências afiliadas aos 4 táxons identificados no bioma CP. Em relação aos ambientes de solo (JANSSEN, 2006; PISA et al., 2011), a diversidade bacteriana em CP é muito baixa, evidenciando o domínio de apenas alguns poucos táxons neste processo. A baixa frequência de clones relacionados a bactérias não classificadas demonstra que uma grande parcela das sequências dos clones recuperados de CP possuem ótimo suporte dos dados disponíveis no banco de dados, ou seja, as bactérias identificadas nos diferentes níveis hierárquicos podem ser melhor exploradas quanto ao seu papel biológico desempenhado em CP.

Em diferentes biomas os táxons predominantes são resultado das condições ambientais fornecidas a eles, como pH ácido (SILVEIRA et al., 2006), alta umidade (LIN et al., 2010), presença ou ausência na adubação nitrogenada (PISA et al., 2011), isolamento geográfico (LIN et al., 2012), contaminação por petróleo (KORENBUM et al., 2012) e degradação de biomassa (MARTINS et al., 2013). O ambiente CP provavelmente fornece condições ideais para a prevalência dos 4 filos

identificados neste estudo, onde o grupo de Actinobacteria pode estar melhor adaptado devido a capacidade deste grupo em produzir agentes antimicrobianos e degradar a biomassa vegetal (SILVEIRA et al., 2006). Embora Firmicutes seja apontado como o filo mais abundante ao final do processo de compostagem (MARTINS et al., 2013), em CP ele foi classificado como o segundo filotipo de maior abundância. Provavelmente o tipo de material de *input* (torta de filtro), falta de condições que forneçam maior aeração, falta da correção da relação carbono : nitrogênio (30 : 1) e confecção de leiras adequadas a realização da compostagem, podem contribuir para a menor frequência deste filo (NUNES, 2009) e falta da verificação de outros mais abundantes em sistemas de degradação de material lignocelulósico (MARTINS et al., 2013).

Em análises do processo inicial de compostagem de resíduos produzidos no zoológico de São Paulo (MARTINS et al., 2013), foi confirmado que a compostagem é essencialmente bacteriana, apresentando menos de 3% de sequências relacionadas ao grupo de eucariotos. Esse dado veio a confirmar que os fungos não desempenham papel importante nos estágios iniciais deste processo, pois as enzimas bacterianas são as responsáveis pela degradação do preparo utilizado no processo. Os autores verificaram variação na frequência de algumas ordens bacterianas no estágio inicial e final do processo (80 dias após o início do processo). Ao fim da compostagem, foi verificada elevada frequência das ordens Lactobacillales, Clostridiales, Bacillales, Actinomycetales, Bacteroidales, Pseudomonadales, Enterobacteriales, Burkholderiales, Xanthomonadales e Selenomonadales. Na análise do 16S rRNA obtidos a partir dos clones de CP que estava armazenado por 1 mês a condições ambiente, foi observado que CP compartilhava algumas ordens identificadas em processo de compostagem: Actinomycetales, Bacillales, Xantomonadales e Clostridiales. Embora estas ordens fossem compartilhadas, Rhizobiales e Myxococcales foram relacionadas somente ao bioma CP (Figura 10).

Diante da elevada representatividade do filo Actinobacteria no bioma CP em relação aos demais filios (Figura 9), era de se esperar que os táxons subjacentes relacionados a este nível hierárquico apresentasse maior número de indivíduos (Figura 10). Actinomycetales predominou em frequência (mais que 50%) na amostra,

evidenciando que esta ordem desempenha um papel muito importante para a manutenção do sistema. A elevada frequência de clones afiliados aos membros deste táxon, pode ser relacionada com o fato destes indivíduos serem descritos como micro-organismos utilizados no biocontrole de doenças em plantas, além de serem produtores de celulases, hemicelulases, quitinases, amilases e glucanases. Devido ao domínio da população bacteriana observada em CP e o relato de que Actinobacteria são capazes de produzir enzimas degradadoras de materiais lignocelulósicos, parece que este grupo pode estar atuando na linha de frente da degradação da lignocelulose presente na torta de filtro depositada no pátio da Usina Santa Fé S.A.. Membros de Firmicutes foram identificados como o segundo filo mais abundante em CP provavelmente por estes serem relacionados ao metabolismo de ácidos orgânicos (ácido láctico) e queda de pH na fase mesófila (inicial) do processo. Os ácidos orgânicos são produtos da degradação da biomassa vegetal por Actinobacteria (MARTINS et al., 2013), onde em CP estes indivíduos podem estar desempenhando papel similar. Proteobacteria apresenta variações na morfologia, fisiologia e metabolismo, podendo desempenhar papel importante na disponibilização de enxofre, fósforo e nitrogênio (TORSVIK, et al., 2002) na degradação da torta de filtro.

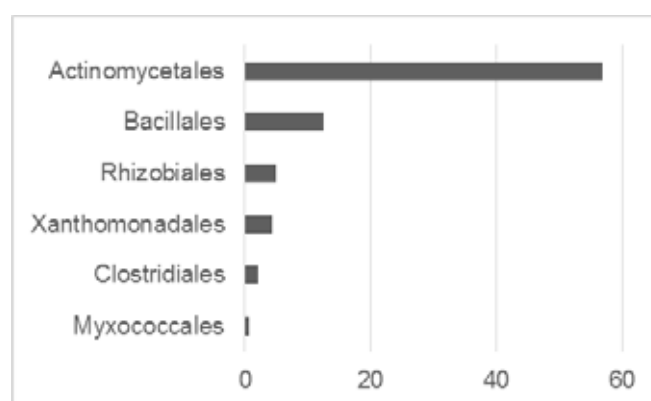


Figura 10. Porcentagem de Ordens bacterianas identificadas em CP. Estes dados foram recuperados do conjunto de 139 sequências classificadas no RDP II utilizando a ferramenta *Classifier* com um corte de confiança de 80%. Diferente do que foi mostrado para um processo de compostagem (MARTINS et al., 2013), no bioma CP, Actinomycetales foi a ordem mais abundante, fato que pode estar relacionado a produção de antimicrobianos e condições que diferem CP daquelas presentes na compostagem.

No bioma CP havia condições que beneficiava um processo de anaerobiose, visto que no local de depósito deste resíduo não havia equipamentos que permitissem a oxigenação do sistema. Para fins de esclarecer melhor o ambiente ao qual estavam expostos as bactérias em CP, uma análise da composição bromatológica da torta de filtro foi realizada (Tabela 2). Essa análise permitiu evidenciar a grande abundância de celulose, hemicelulose e lignina, visto que a torta de filtro é basicamente composta por bagaço de cana-de-açúcar moído. Embora uma busca mais detalhada sobre o papel dos gêneros bacterianos identificados em CP não foi realizada, na Tabela 3, segue a descrição dos gêneros e quantas Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) foram classificadas em cada um. Uma breve análise da literatura, permitiu verificar que eles são essenciais em algumas etapas da compostagem, como *Clostridium*, que é relacionado as fases termofílica, de degradação de celulose e anaeróbica. *Bacillus* também é descrito como participante deste processo, sendo relacionado ao consumo de ácidos orgânicos disponíveis no ambiente da compostagem (KATO et al., 2004; MARTINS et al., 2013).

Tabela 2. Análise da composição do material fibroso de CP coletado na profundidade de 0 a 20 cm.

ÍNDICES	Resultados 2ª Matéria Seca (%)
Matéria mineral (g/kg de sólidos totais)	34,5
Matéria fibrosa (g/kg de sólidos totais)	10,92
Fibra em Detergente Neutro (g/kg de sólidos totais)	43,21
Fibra em Detergente Ácido (g/kg de sólidos totais)	35,03
Lignina (g/kg de sólidos totais)	9,4
Celulose (g/kg de sólidos totais)	25,63
Hemicelulose (g/kg de sólidos totais)	8,18
Lignina/(celulose + hemicelulose)	0,28

Tabela 3. Classificação dos gêneros bacterianos segundo o algoritmo *Seqmatch* do RDP II.

GÊNEROS BACTERIANOS	No. SEQUENCIAS	No. ACESSO
<i>Gordonia</i>	1	AJ586615
<i>Nocardia</i>	2	EU861514
<i>Cellulosimicrobium</i>	1	AB210961
<i>Micromonospora</i>	7	EU214947
<i>Saccharothrix</i>	1	JN387600
<i>Streptomyces</i>	3	AY996821
<i>Actinomadura</i>	8	AY766302
<i>Thermomonospora</i>	8	AY525765
<i>Ensifer</i>	1	X67231
<i>Magnetospirillum</i>	1	AB167721
<i>Anaeromyxobacter</i>	1	AB265927
<i>Steroidobacter</i>	1	JQ400829
<i>Pseudoxanthomonas</i>	3	AB039329
<i>Geobacillus</i>	4	AY608981
<i>Bacillus</i>	2	AB020196
<i>Paenibacillus</i>	1	EU290156
<i>Thermobacillus</i>	1	CP003255
<i>Brevibacillus</i>	2	AB112717
<i>Clostridium sensu stricto</i>	2	AY548785

5.4 Análise comparativa de 5 ambientes diferentes

Foram recuperadas um total de 1.090 sequências (livre de sequências quiméricas) parciais do gene 16S rRNA, sendo que 280 sequencias foram recuperados SV, 207 sequencias de MC, 271 sequencias de CH, 193 sequencias de MT e 139 sequencias de CP. As sequências de MC são derivadas do canal mestre da vinhaça (RIBEIRO, 2012), utilizado para levar a vinhaça da indústria de álcool para as áreas de plantio de cana-de-açúcar, onde ocorrerá o procedimento de fertirrigação. Esse conjunto de dados foram introduzidos para avaliar se a diversidade bacteriana existente em SV e MC eram próximas, uma vez que a vinhaça que MC transporta foi utilizada na irrigação de SV. CH é o único ambiente que representa uma área de cultivo de cana-de-açúcar localizado no município de Bebedouro-SP (CAMARGO, 2013), o qual não era fertirrigado com vinhaça e, por

isso, foi introduzido para avaliar se a comunidade bacteriana de SV era influenciada pela fertirrigação de vinhaça ou pelo cultivo de cana-de-açúcar. MT foi amostrada em uma área próxima as áreas de cultivo de cana-de-açúcar, servindo como um parâmetro na investigação de como a estrutura da população microbiana é alterada quando comparado os ambientes com manejo de cana-de-açúcar ou seus resíduos (vinhaça e torta de filtro). O conjunto de dados de CP é derivado da torta de filtro (ver itens 2.3, 4.1 e 5.3), a qual é rica em nutrientes (principalmente fósforo e bagaço de cana-de-açúcar) e estava armazenada por aproximadamente 1 mês. Este bioma fornece condições para adaptação de bactérias muito diferentes daquelas disponíveis no solo, e devido a atividade natural de degradação da biomassa por bactérias, este bioma pode ser caracterizado como uma semicompostagem de torta de filtro. As 1.090 sequências parciais do gene 16S rRNA foram combinadas e utilizadas para as análises subsequentes. A classificação taxonômica no RDP II permitiu evidenciar a ocorrência de 11 grupos filogenéticos distintos, os quais estavam distribuídos de forma diferente nos cinco microbiomas. Também foi possível verificar que os cinco ecossistemas apresentaram diferenças elevadas na distribuição e frequência dos filos bacterianos, onde MTV foi o mais diverso, apresentando 11 filos, seguido de CH com 7 filos, MC com 5 filos, MT com 4 filos e CP com 3 filos (Tabela 4).

O teste de variância molecular Unifrac utilizando a análise Jackknife Environment Clusters demonstra que a composição e estrutura da comunidade bacteriana dos cinco ambientes da agroindústria de cana-de-açúcar são diferentes quando comparados ao acaso, porém, embora tal teste não afirme similaridade, CH e MT apresentam certa proximidade em relação aos demais ambientes (Figura 11). O teste Libshuff demonstrou que nenhuma das cinco comunidades bacterianas apresentam a chance de ter ao acaso a mesma estrutura, pois independentemente da direção X-Y ou Y-X analisadas, o resultado sempre foi $p < 0,02$ (dados não mostrados). Esses resultados demonstram que embora MC fornecia a vinhaça em forma de irrigação para SV, esses dois ambientes são estatisticamente diferentes no que diz respeito a estrutura de comunidades. Isso fica mais claro quando é observado que SV está mais relacionado a estrutura de comunidades existentes em CH e MT, do que com MC (Figura 11). Assim sendo, como no trabalho de Pisa et al.

(2011) que estudaram a ação da variação da adubação nitrogenada sobre a população de bactérias do solo, os três principais grupos taxonômicos mais abundantes nos biomas SV e MC foram Proteobacteria, Acidobacteria (em MC Actinobacteria apresentou mesma frequência que Acidobacteria) e bactérias não classificadas (Tabela 4). Isto pode ser um indicativo de que a aplicação de vinhaça e diferenças na adubação nitrogenada, contribuem para a predominância desses táxons bacterianos nos solos sobre cultivo de cana-de-açúcar.

Tabela 4. Distribuição de filotipos bacterianos identificados no 5 biomas relacionados ao manejo de cana-de-açúcar e resíduos vinhaça e torta de filtro. A classificação foi baseada no algoritmo *Classifier* do RDP II, com um corte de confiança de 80%.

Grupos filogenéticos	Clones identificados nas bibliotecas (%)				
	SV	CH	MC	MT	CP
Proteobacteria	30,71	62,70	41,55	59,59	18,71
α -Proteobacteria	72,10	89,41	45,35	93,04	42,31
β -Proteobacteria	16,28	2,35	1,16	0,87	-
γ -Proteobacteria	-	1,18	15,12	-	46,15
δ -Proteobacteria	1,16	-	-	0,87	3,85
Proteobacteria não classificada	10,46	7,06	38,37	5,22	7,69
Acidobacteria	27,50	8,60	12,08	6,74	-
Actinobacteria	5,70	17,30	12,08	12,43	56,83
Firmicutes	2,86	0,70	6,76	-	22,30
Gemmatimonadetes	1,43	0,70	0,48	3,11	-
Planctomycetes	2,86	0,40	-	-	-
Nitrospira	2,86	0,70	-	-	-
Bacteroidetes	2,86	-	-	-	-
Chloroflexi	1,43	-	-	-	-
Armatimonadetes	0,36	-	-	-	-
TM7	0,36	-	-	-	-
Bactéria não classificada	21,07	8,90	27,05	18,13	2,16
Número total de sequencias por bioma	280	271	207	193	139

SV = solo com plantio de cana-de-açúcar e fertirrigação de vinhaça; CH = solo com plantio de cana-de-açúcar e sem irrigação de vinhaça; MC = solo heterogêneo depositado sobre o canal mestre da vinhaça; CP = matéria orgânica da semicompostagem de torta de filtro; MT = solo de mata nativa localizada próxima a áreas de plantio de cana-de-açúcar
 - = não observado

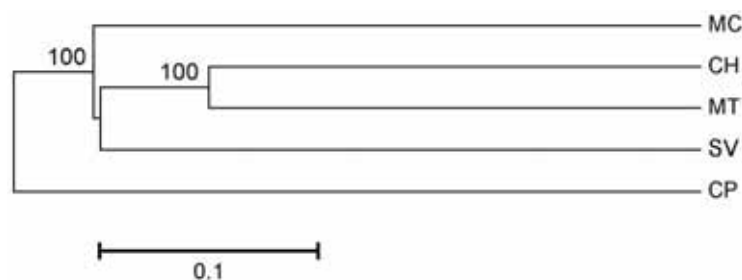


Figura 11. Teste Unifrac utilizando Jackknife Environmental Cluster para aferir se as cinco comunidades bacterianas possuíam a mesma estrutura se comparadas ao acaso. CP apresentou comportamento de grupo externo na análise e MC foi classificado mais distante de SV do que CH e MT. **MC** = solo heterogêneo depositado sobre o canal mestre da vinhaça; **CH** = solo com plantio de cana-de-açúcar sem irrigação de vinhaça; **MT** = solo de mata nativa localizada próxima a áreas de plantio de cana-de-açúcar; **SV** = solo com cultivo de cana-de-açúcar e fertirrigação de vinhaça; **CP** = matéria orgânica de semicompostagem de torta de filtro.

O ambiente CP demonstrou ser o mais diferente de todos, onde os filos predominantes foram Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria (Tabela 4). Este ecossistema também apresentou bactérias não classificadas, porém, com poucos indivíduos afiliados, o que pode refletir a elevada frequência de táxons quase únicos que são conhecidos por técnicas tradicionais de cultivo e isolamento de micro-organismos (Figura 12 e 13). Actinobacteria provavelmente foi o filo predominante neste ambiente devido a sua capacidade em degradar o material lignocelulósico da biomassa vegetal (MARTINS et al., 2013) que é abundante na torta de filtro (Tabela 2), além de produzir agentes antimicrobianos (SILVEIRA et al., 2006) que auxiliam na sua predominância populacional. Actinobacteria são apontadas como produtoras de celulases, hemicelulases, quitinases, amilases e glucanases, que apresentam potencial em aplicações como a produção de etanol de segunda geração. Firmicutes pode estar atuando no metabolismo de ácidos orgânicos (ácido lático), principal produto no período após a degradação da biomassa vegetal (estágio termofílico) e liberação de açúcares menores (MARTINS et al., 2013). Proteobacteria é relacionado a estágios termofílicos na compostagem (BAHARUDDIN et al., 2009) podendo variar em abundância conforme o avanço do estágio deste processo (MARTINS et al., 2013). Além disso, este filo apresenta grande variação na diversidade morfológica, fisiológica e metabólica e assim como nos solos (ROS et al., 2011), pode estar atuando no ciclo global do carbono, nitrogênio e enxofre em

CP. Com base no que foi exposto, no CP, Actinobacteria deve atuar na degradação do material lignocelulósico, liberando componentes menores, como ácidos orgânicos, que são assimilados por Firmicutes e Proteobacteria. Aparentemente CP já havia passado pelo estágio termofílico do processo, pois apresentou poucos indivíduos relacionados a *Clostridium*, muito abundante em estágios termofílicos na compostagem (MARTINS et al., 2013).

Dentre as classes detectadas nos cinco ambientes, α -Proteobacteria foi identificada em todos eles. A elevada abundância desta classe denota que estes indivíduos contribuem muito para a manutenção dos ecossistemas estudados. Lin et al. (2011) observaram a predominância de α -Proteobacteria em solos de floresta, assim como o que é relatado nos ambientes com manejo de cana-de-açúcar, não correlacionando essa abundância com qualquer propriedade física ou química dos solos analisados por eles. Aparentemente, essa abundância pode estar relacionada a atributos fisiológicos e metabólicos do filo Proteobacteria, onde α -Proteobacteria parece estar sendo favorecida em ambientes como MT (93,04%), CH (89,41%) e SV (72,10%), respectivamente. Somente o ambiente não teve a identificação de β -Proteobacteria. No ambiente SV, apenas a classe γ -Proteobacteria não foi identificada, sendo que α -Proteobacteria, β -Proteobacteria e δ -Proteobacteria foram as classes mais abundantes. Em MC, em ordem de abundância, foram identificadas as classes α -Proteobacteria, γ -Proteobacteria e β -Proteobacteria (Tabela 4). Em outros solos brasileiros sob plantio de cana-de-açúcar foi comum identificar as classes α -Proteobacteria, β -Proteobacteria, γ -Proteobacteria e δ -Proteobacteria (DINI-ANDREOTTI et al., 2010; PISA et al., 2011). Provavelmente a concentração dos resíduos e a própria umidade da vinhaça e torta de filtro podem atuar como fatores seletivos na diversidade de classes de Proteobacteria, uma vez que a classe γ -Proteobacteria esteve presente em MC e ausente em SV, assim como β -Proteobacteria em CP. Outro fator que deve ser levado em consideração é que diferentes genótipos de plantas podem influenciar na estrutura da comunidade microbiana no solo, que devido a emissão de diferentes sinalizações das raízes, como exsudatos (SOUZA et al., 2012) e, em conjunto com a aplicação de vinhaça, podem interferir na frequência desta classe no solo.

Além das classes α -Proteobacteria e γ -Proteobacteria, CP apresentou δ -Proteobacteria, que está relacionada a estágios anaeróbios em sistemas de compostagem incompleta de resíduos orgânicos (MARTINS et al., 2013). Por este motivo, a identificação de δ -Proteobacteria em CP, indica que o mesmo apresentava microhabitats anaeróbios que se formam devido à falta de aeração. Neste tipo de procedimento estático, micro-organismos anaeróbios podem se desenvolver e dentre eles se destacam alguns indivíduos de δ -Proteobacteria que apresentam grande diversidade fisiológica dentre os anaeróbios, podendo participar da redução de sulfato, redução de ferro, fermentação e desalogenação (SANFORD et al., 2002), ou sejam, eles consomem os nutrientes do meio. Na construção da árvore comparativa de Proteobacteria dos biomas SV, MC e CP, muitas UTOs foram agrupadas com sequências pertencentes a bactérias não classificadas, demonstrando que todos os ambientes apresentam potencial para a descoberta de novos grupos bacterianos ainda desconhecidos, aumentando o acesso a recursos biológicos e genéticos.

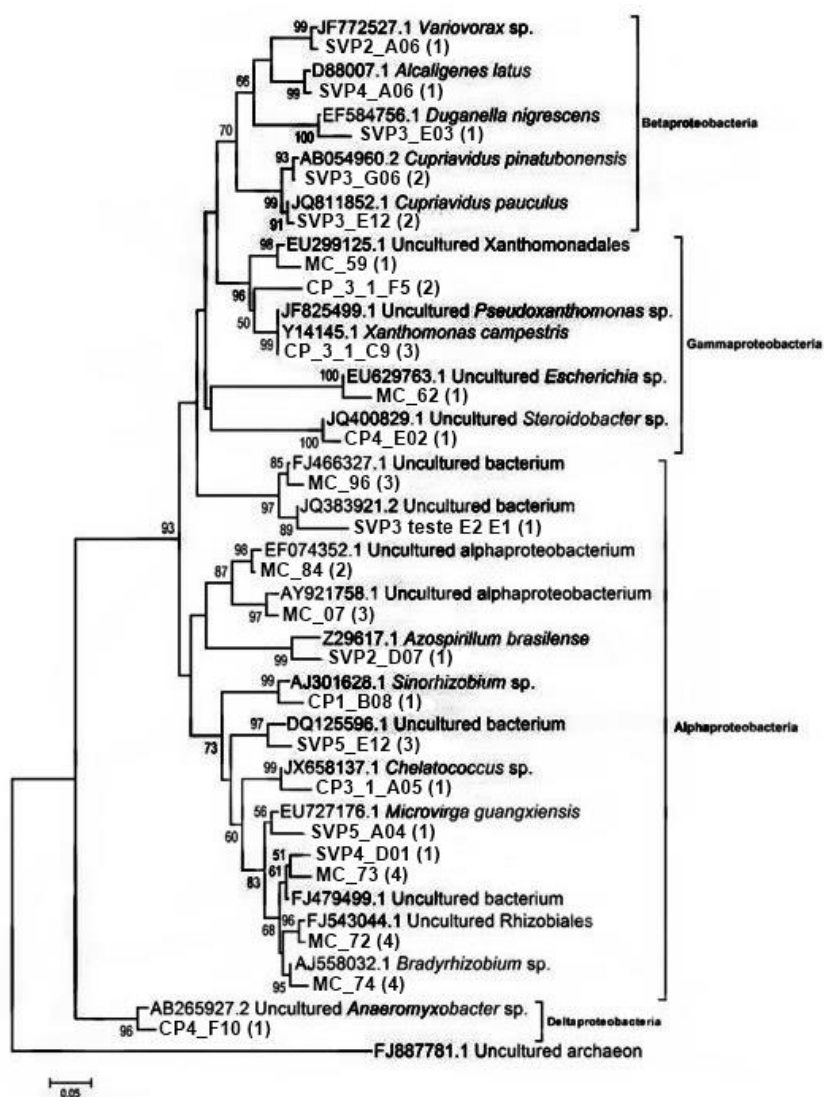


Figura 12. Dendrograma mostrando a classificação das Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) relacionadas ao filo Proteobacteria dos biomas SV, MC e CP. As sequências obtida neste estudo estão em negrito. Os números entre parênteses representam a quantidade de sequências deste estudo que foram afiliadas a um mesmo grupo taxonômico de Acidobacteria. Para a construção da árvore foi utilizada a matriz de substituições de nucleotídeos Jukes e Cantor, método *Neighbor-Joining* com *bootstrap* para 5.000 réplicas e opção deleção completa. Os nós mostram apenas valores de *bootstrap* acima de 50%. A escala indica que ocorrem 0,05 substituições de nucleotídeos a cada posição.

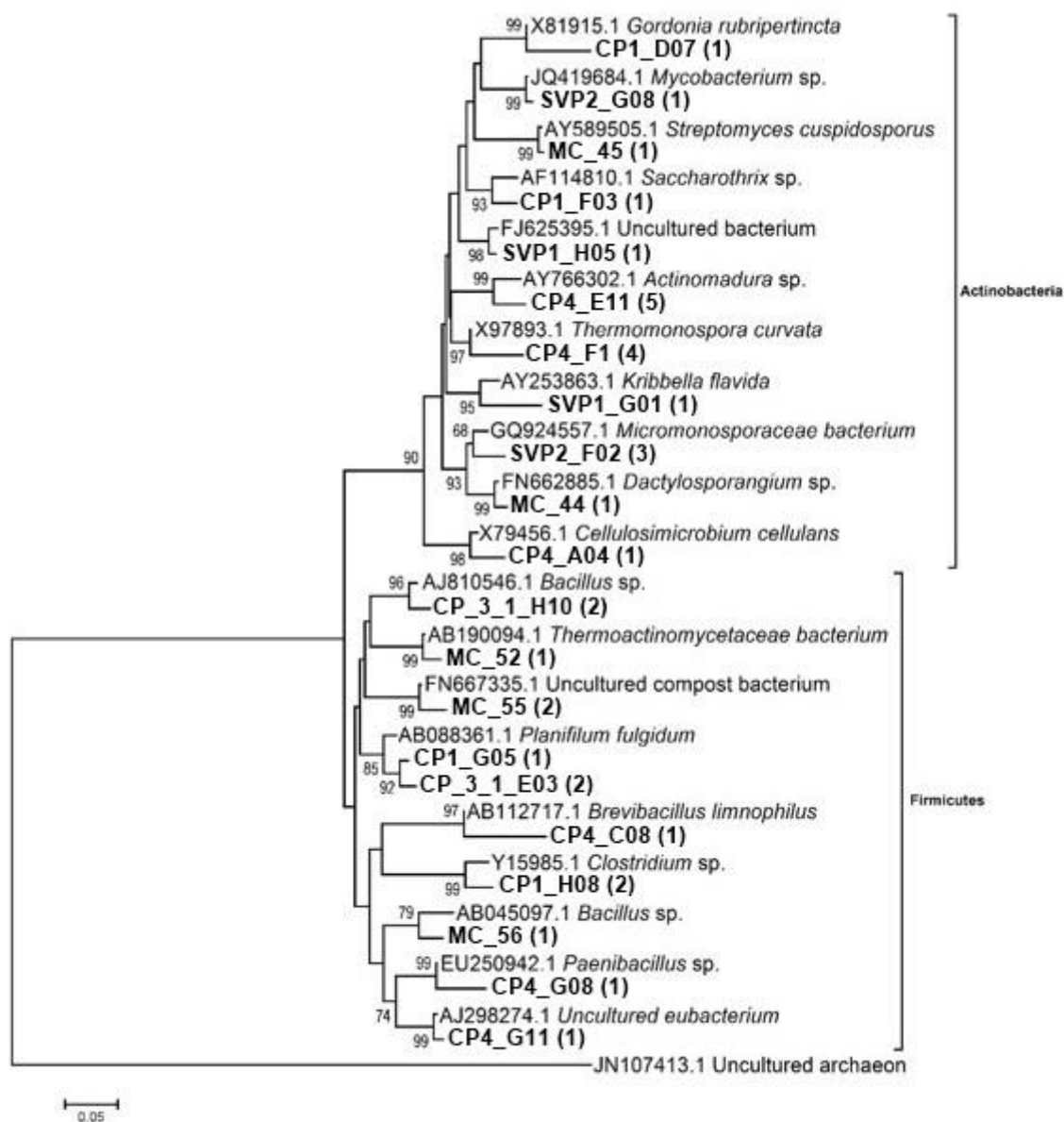


Figura 13. Árvore ilustrando a classificação das Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) relacionadas aos filos Actinobacteria e Firmicutes recuperadas de CP, MC e SV. Curiosamente, a maioria das sequências do gene 16S rRNA pertencentes a CP foram agrupadas a gêneros bacterianos conhecidos. A escala mostra que a cada posição ocorrem de 0,05 substituições de nucleotídeos.

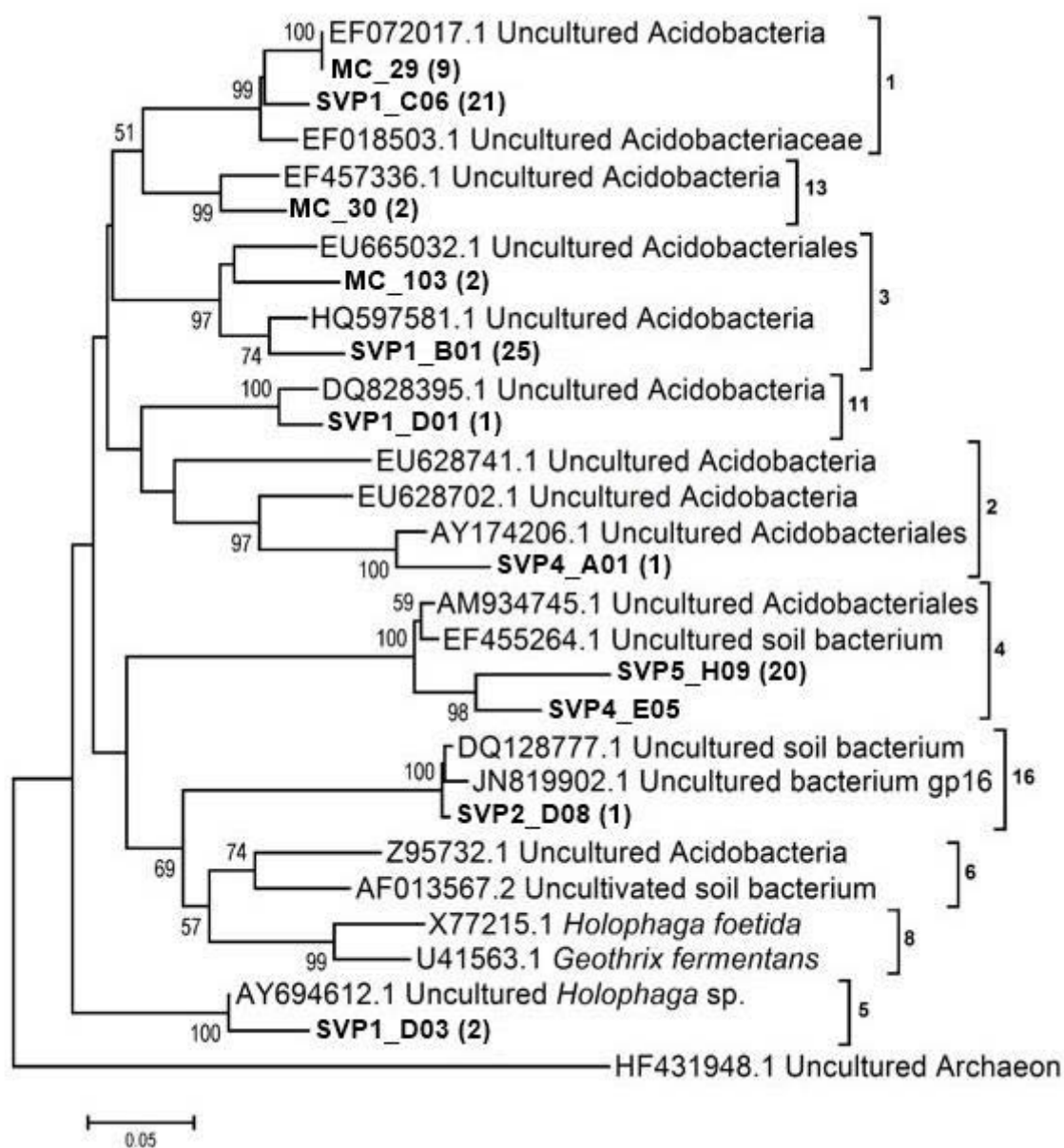


Figura 14. Árvore demonstrando as afiliações das Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) relacionadas ao grupo Acidobacteria, detectadas somente em SV e MC. Foram utilizadas para a construção da árvore somente seqüências que apresentaram melhor classificação a nível de gênero no RDP II. A escala indica que ocorrem 0,05 substituições de nucleotídeos a cada posição.

Devido a presença de vinhaça, MC e SV eram esperados para ser ambientes relacionados proximamente em termos de táxons e estrutura das comunidades bacterianas, porém, em termo de frequência de filos (Tabela 4), teste de variância molecular Unifrac (Figura 11) e Libshuff ($p < 0,02$, dados não mostrados), demonstram diferenças de frequência relativa e estatísticas entre si. Isso fica mais

evidente quando o agrupamento dos táxons terminais dos filios mais abundantes identificados nestes ambientes são visualizados na forma de dendrograma comparativo. No RDP II, muitas UTOs são agrupadas no mesmo gênero, porém aparentam divergir em espécies (Figura 12, 13 e 14). Dentre os táxons externos que mais apresentam indivíduos não cultivados, se destacam as subdivisões 1, 3 e 4 de Acidobacteria encontradas em SV (Figura 14). Em MC, 9 UTOs foram atribuídas ao grupo 1 desta subdivisão. Acidobacteria são relacionadas a solos com pH ácidos, principalmente os da subdivisões 1, 2 e 3 (MÄNNISTÖ et al., 2006; LIN et al., 2010). Somente no ambiente SV foi identificado a subdivisão 4 de Acidobacteria, podendo ser um indicativo de que a menor concentração (em relação ao que está disponível em MC quando há fluxo de vinhaça da indústria para as áreas de plantio), teor e umidade da vinhaça possam atuar como fatores seletivos para a grande abundância desta subdivisão no solo. Os táxons externos dos demais filios também demonstram diferenças na composição da comunidade bacteriana dos ambientes, ressaltando as diferenças existente entre eles quanto a abundância de espécies. CP foi o ambiente que mais apresentou indivíduos cultiváveis em sua constituição, sendo este um indicativo de que poucas espécies não cultivadas ainda podem ser identificadas neste tipo de ambiente.

5.5 Análise da diversidade, riqueza, UTOs e teste de hipóteses

Lin et al. (2010) demonstram que a relação H/H_{max} (Richness) de 0,68 representava baixa diversidade em seu ambiente de floresta em relação a outros reportados anteriormente. Por este parâmetro, fica claro a grande diversidade que os ambientes da agroindústria da cana-de-açúcar apresentaram, uma vez que o menor valor (0,81) foi apresentado por MC (Tabela 5). Pela análise dos índices e o gráfico de rarefação, fica evidente que o ambiente mais rico em táxons terminais (espécies) é SV, visto que além de apresentar 11 filios (Tabela 4) a curva do gráfico da curva de rarefação foi a que menos apresentou sensibilidade de atingir alguma estabilidade (Figura 15), além de apresentar valor de Richness de 0,93, o maior dentre todos os biomas. MT apresentou diversidade intermediária na comparação

dos 5 ambientes, uma vez que além de seu valor Richness ser de 0,83, a curva de rarefação apresentou comportamento de ascensão intermediária. Embora os ambientes CP e MC apresentem valores de índices próximos, CP sem dúvida é o ambiente que apresenta menor diversidade, uma vez que além do seu valor de Richness (0,82) e Evenness (0,96) o classificarem como mais diverso que MC, esta sentença é derrubada devido aos valores obtidos para Shannon (4,61), Simpson (0,0047) e Chao1 (806), que classifica CP como o ambiente de menor diversidade dentro os outros 4 biomas. Isto evidencia que independente do ambiente da agroindústria de cana-de-açúcar analisado, todos apresentam alterações diversidade de suas comunidades bacterianas, conforme o tipo de condições a que são expostos. SV foi o ambiente que mais apresentou alterações, sendo portador de elevada diversidade quando comparado aos outros 4 biomas.

Embora os solos brasileiros sejam considerados como portadores de menor diversidade em nível de filós (PISA et al., 2011), a vinhaça contribui para o aumento populacional de espécies de micro-organismos nos solos, principalmente de bactérias heterotróficas (MARIANO et al., 2009). Nossos resultados colaboram com estas previsões, uma vez que apenas 11 filós foram contados em SV, 7 filós em CH e 4 filós em MT, este último de mata nativa localizada próxima a áreas de plantio de cana-de-açúcar. Mesmo apresentando composição de solo e matéria orgânica variável, MC também apresentou elevada diversidade de táxons bacterianos, sendo comparável ao ambiente CH que apresentava manejo de cana-de-açúcar (Tabela 5). Essa elevada diversidade bacteriana nos ambientes com presença de vinhaça (SV e MC), contrasta com a baixa diversidade de filós verificada em CP. Tomando por base a diferença existente entre ambientes de solo e aquele compõem a semicompostagem de torta de filtro, fica claro as diferenças observadas nas comunidades bacterianas mostradas anteriormente (Tabela 4 e Figura 11). LIN et al. (2011) atribuem a diferenças de comunidades bacterianas, a presença de carbono orgânico solúvel, que conforme as características do ambiente é mais acessível pela população de micro-organismos. Dentre todos os cinco ambientes analisados neste estudo, os ambientes SV, CH e MT apresentavam diferenças na disponibilizações de carbono solúvel em relação a MC e CP, uma vez que MC apresentava mistura de diferentes solos e matéria orgânica e, CP, mistura de componentes (nutrientes,

bagaço moído, etc) advindos da decantação de lodo da clarificação de caldo de cana-de-açúcar.

A análise de similaridade (3% de diferenças) do cluster Jaccard (Figura 16) dos cinco biomas, mostra claramente que os ambientes MT e CH aparentam dividir algumas espécies compartilhadas entre si, confirmando o padrão visualizado na análise Unifrac (Figura 11). Segundo Lin et al. (2012), essas diferenças no agrupamento das comunidades de bactérias de diferentes biomas está relacionado a disponibilidade de nutrientes, pH, matéria orgânica, íons, presença de oxigênio, localização geográfica e outros fatores relacionados a esses ambientes.

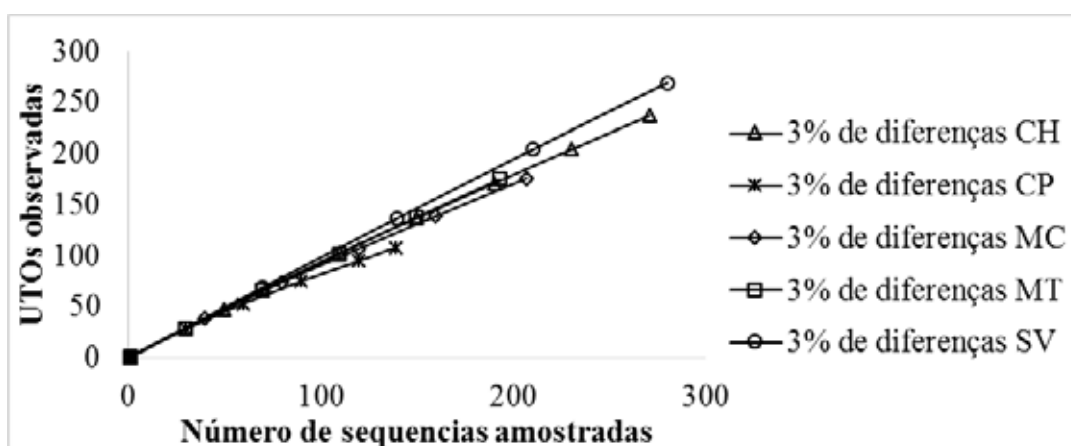


Figura 15. Curva de rarefação dos cinco biomas. CP demonstra maior sensibilidade do que os outros quatro ambientes, fenômeno este atribuído a baixa diversidade que CP apresenta. SV demonstram ter menos sensibilidade na curva, sendo classificado como o ambiente mais diverso de todos.

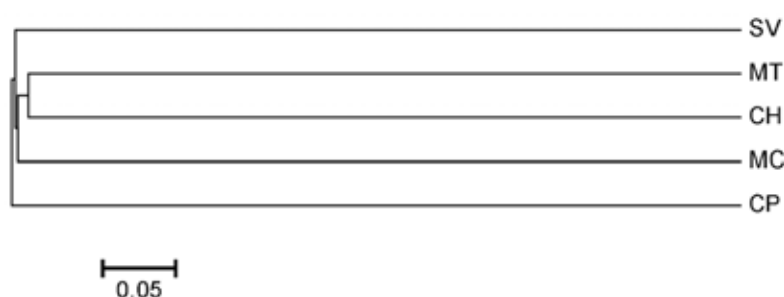


Figura 16. Dedrograma dos clusters da similaridade *pairwise* Jaccard utilizando um corte de 97% de similaridade. Os ambientes da agroindústria mostraram ser muito distintos entre si, conformando o que é mostrado pela análise Unifrac.

Tabela 5. Índices de diversidade e riqueza observados^a para as cinco comunidades bacterianas.

Índices	Ambientes analisados				
	SV	CH	MC	CP	MT
^b S	269	237	176	108	175
^c N	280	271	207	139	193
^d Evenness	0,99	0,97	0,95	0,96	0,97
^e Richness	0,93	0,83	0,81	0,82	0,89
Shannon (H)	5,58 (5,62) ^f	5,37 (5,56)	5,06 (5,33)	4,61 (4,81)	5,04 (5,20)
Simpson	0,0003	0,0019	0,0028	0,0047	0,0029
Chao 1	3,032 (1.812-5.215) ^g	1,863 (1.163-3.091)	1,026 (648-1.706)	806 (435-1.603)	2.290 (1.157-4.725)
Singleton	258 (276) ^f	214 (258)	155 (191)	99 (120)	160 (179)

^aD = 0,03^bS = número de UTOs observadas^cN = número de sequências por amostra^dEvenness = H/H_{max} (PIELOU, 1966)^eRichness = (número de UTOs $singletons-1$)/log N. O valor máximo é (N-1)/log N. O valor observado/máximo possível é informado

Valor máximo observado para Shannon (H) e Singleton

^fIntervalos de confiança (95%) para Chao1^gSV = solo sobre fertirrigação de vinhaça e plantio de cana-de-açúcar; CH = solo com plantio de cana-de-açúcar e sem irrigação de vinhaça; MC = solo heterogêneo depositado sobre o canal mestre da vinhaça; CP = semicompostagem de torta de filtro; MT = solo de mata nativa

6 CONCLUSÃO

Todas as comunidades bacterianas apresentam variação na estrutura e composição de táxons, conforme apontado pelos teste Unifra, Libshuff e gráfico de similaridade (3% de diferenças) Jaccard. Embora menos diversa em questão de filos em relação aos solos sobre ação de vinhaça, CP apresenta potencial de conter elevada quantidade de espécies bacterianas relacionadas a degradação da biomassa da torta de filtro (enzimas celulases, dentre outras), apresentando também potencial de conter espécies bacterianas produtoras de antimicrobianos. A fertirrigação de vinhaça em SV parece contribuir para o aumento da diversidade bacteriana, uma vez que este bioma apresentou estrutura diferente do que é observado em ou MC, MT e CH. Em SV, são encontrados principalmente táxons pertencentes as subdivisões do grupo 1, 3 e 4 de Acidobacterias.

7 REFERÊNCIAS

ABBAI, N. S.; GOVENDER, A.; SHAIK, R.; PILLAY, B. Pyrosequence analysis of unamplified and whole genome amplified DNA from hydrocarbon-contaminated groundwater. **Molecular Biotechnology**, v. 50, n. 1, p. 39-48, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12033-011-9412-8>>.

BAHARUDDIN, A. S.; KAZUNORI, N.; ABD-AZIZ, S.; TABATABAEI, M.; RAHMAN, N. A. A.; HASSAN, M. A.; WAKISAKA, M.; SAKAI, K.; SHIRAI, Y. Characteristics and microbial succession in co-composting of oil palm empty fruit bunch and partially treated palm oil mill effluente. **The Open Biotechnology Journal**, v. 3, p.87-95, 2009.

BANSAL, A. K. Bioinformatics in microbial biotechnology – a mini review. **Microbial Cell Factories**, v. 4, p. 1-11, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-4-19>>.

BERINGER, J. E. R-factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, v. 84, n. 1, p.188-198, 1974. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1099/00221287-84-1-188>>.

BERTANI, G. Studies on lysogenesis I. **Journal of bacteriology**, v. 62, n. 3, p.293-300, 1951.

CAMARGO, A. F. **Análise de diversidade e perfil metabólico de comunidades microbianas em solo sob cultivo de cana-de-açúcar com manejo de queimada em períodos de chuva e seca**. 2013. 58 f. Trabalho de graduação (Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006.

CIPAGRI – Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura. **Clima dos municípios paulistas**. Acesso em: 11 mar. 2014. Disponível em: <<http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-dos-municipios-paulistas.html>>.

COLE, J. R.; WANG, Q.; FISH, J. A.; CHAI, B.; McGARRELL, D. M.; SUN, T.; BROWN, C. T.; PORRAS-ALFARO, A.; KUSKE, C. R.; TIEDJE, J. M. Ribosomal database project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1244>>.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 380/2006**, 31/10/2006. Acesso em: 16 Mar 2014. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=514>>.

COSTA, M. C.; ARROYO, L. G.; ALLEN-VERCOE, E.; STÄMPFLI, H. R.; KIM, P. T.; STURGEON, A.; WEESE, J. S. Comparison of the fecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3-V5 region of the 16S rRNA gene. **Public Library of Science**, v. 7, n. 7, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0041484>>.

CRIVELARO, S. H. R.; MARIANO, A. P.; FURLAN, L. T.; GONÇALVES, R. A.; SEABRA, P. N.; ANGELIS, D. F. Evaluation of the use of vinasse as a biostimulation agent for the biodegradation of oily sludge in soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 5, p.1217-1224, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132010000500027>>.

DESANTIS, T. Z.; HUGENHOLTZ, P.; LARSEN, N.; ROJAS, M.; BRODIE, E. L.; KELLER, K.; HUBER, T.; DALEVI, D.; HU, P.; ANDERSEN, G. L. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and Workbench compatible with ARB. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p.5069-5072, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03006-05>>.

DI GIULIO, G. Motor bicompostível ganha cada vez mais consumidores. **Inovação Uniemp**, v. 2, n. 1, p.38-40, 2006.

DINI-ANDREOTE, F.; DINI-ANDREOTE, F.; COSTA, R.; TAKETANI, R. G.; van ELSAS, J. D.; ARAÚJO, W. L. Bacterial soil community in a Brazilian sugarcane field. **Pant Soil**, v. 336, n. 1-2, p.337-349, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11104-010-0486-z>>.

DUBEY, S. K.; TRIPATHI, A. K.; UPADHYAY, S. N. Exploration of soil bacterial communities for their potential as bioresource. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 17, p. 2217-2224, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.06.008>>.

EPE – Empresa de Pesquisa Energética. Perspectivas para o etanol no Brasil. Brasília: EPE, 2008. 67 p. (EPE. Cadernos de Energia EPE).

FELSENSTEIN, J. **PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6**. Department of Genome Sciences and Department of Biology, University of Washington, Seattle, WA, 2005.

FERREIRA, F. Toda inovação contida no “flex”. **Conhecimento & Inovação**, v. 5, n. 3, p.16-17, 2009.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p.136-145, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000100025>>.

GONÇALVES, V. P.; MARIN, J. M. Fate of non O157 Shiga toxigenic *Escherichia coli* in composted cattle manure. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 4, p. 825-831, 2007.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Toronto, v.8, p.195-202, 1998. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/gr.8.3.195>>.

HAAIJER, S. C. M.; CRIENEN, G.; JETTEN, M. S. M.; Op den CAMP, H. J. M. Anoxic iron cycling bacteria from an iron sulfide- and nitrate-rich freshwater environment. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p.1-8, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00026>>.

HAHN, L.; PADILHA, M. T. S.; PADILHA, J. C. F.; POLI, A.; RIEFF, G. G. Persistência de patógenos e do antibiótico salinomicina em pilhas de compostagem de cama de aviário. **Archivos de Zootecnia**, v. 61, n. 234, p. 279-285, 2012.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, n. 49, p.95-98, 1999.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 669-685, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.68.4.669-685.2004>>.

HANDELSMAN, J. Sorting out metagenomes. **Nature biotechnology**, v.23, n.1, jan., p.38-39, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nbt0105-38>>.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5, n. 10, p.R245-R249, 1998. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1074-5521\(98\)90108-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90108-9)>.

HANSEL, C. M.; FENDORF, S.; JARDINE, P. M.; FRANCIS, C. A. Chances in Bacterial and Archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1620-1633, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01787-07>>.

HECK, K.; MARCO, E. G.; HAHN, A. B. B.; KLUGE, M.; SPILKI, F. R.; SAND, S. T. V. D. Temperatura de degradação de resíduos em processo de compostagem e qualidade microbiológica do composto final. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 1, p. 54-59, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662013000100008>>.

HIRANO, T.; JAUHAINEN, J.; INOUE, T.; TAKAHASHI, H. Controls on the carbon balance of tropical peatlands. **Ecosystems**, v. 12, n. 6, p.873-887, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10021-008-9209-1>>.

JACKSON, C. R.; LIEW, K. C.; YULE, C. M. Structural and functional changes with depth in microbial communities in a tropical Malaysian peat swamp forest. **Microbial Ecology**, v. 57, n. 3, p.402-412, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00248-008-9409-4>>.

JANSSEN, P. H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p.1719-1728, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006>>.

KAKIRDE, K. S.; PARSELEY, L. C.; LILES, M. R. Size does matter: application-driver approaches for soil metagenomics. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, n.11, p.1911-1923, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.07.021>>.

KANOKKRATANA, P.; UENGWETWANIT, T.; RATTANACHOMSRI, U.; BUNTERNGSOOK, B.; NIMCHUA, T.; TANGPHATSORNRUANG, S.; PLENGVIDHYA, V.; CHAMPREDA, V.; EURWILAICHITR, L. Insights into the phylogeny and metabolic potential of a primary tropical peat swamp forest microbial community by metagenomic analysis. **Microbial Ecology**, v. 61, n. 3., p.518-528, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00248-010-9766-7>>.

KATO, S.; HARUTA, S.; CUI, Z. J.; ISHII, M.; IGARASHI, Y. Effective cellulose degradation by a mixed-culture system composed of a cellulolytic *Clostridium* and aerobic non-cellulolytic bacteria. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology**, v. 51, n. 1, p. 133-142, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.femsec.2004.07.015>>.

KORENBLUM, E.; SOUZA, D. B.; PENNA, M.; SELDIN, L. Molecular analysis of the bacterial communities in crude oil samples from two Brazilian offshore petroleum platforms. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 8 pages, ID 156537, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2012/156537>>.

LAIME, E. M. O.; FERNANDES, P. D.; OLIVEIRA, D. C. S.; FREIRE, E. A. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 5, n. 3, p.16, 2011.

LOZUPONE, C.; HAMADY, M.; KNIGHT, R. UniFrac – an online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. **BMC Bioinformatics**, v. 7, 14 p., 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-7-371>>.

LEHNINGER, A. L. **Lehninger princípios de bioquímica**. São Paulo: SARVIER, 2006, p. 3-11.

LIN, YE-TE; WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; CHIU, CHIH-YU. Comparison of soil bacterial communities between coastal and inland forest in a subtropical area. **Applied Soil Ecology**, v. 60, p.49-55, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.03.001>>.

LIN, YU-TE; HUANG, YU-JU; TANG, SEN-LIN; WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; CHIU, CHI-YU. Bacterial community diversity in undisturbed perhumid montane forest soils in Taiwan. *Microbiology Ecology*, v. 59, n. 2, p.369-378, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00248-009-9574-0>>.

LIN, YU-TE; JANGID, K.; WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; CHIU, CHIH-YU. Change in bacterial community structure in response to disturbance of natural hardwood and secundar coniferous forest soils in central Taiwan. **Environmental Ecology**, v. 61, n. 2, p.429-437, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00248-010-9748-9>>.

MARIANO, A. P.; CRIVELARO, S. H. R.; ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M. The use of vinasse as an amendment to ex-situ bioremediation of soil and groundwater contaminated with diesel oil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p.1043-1055, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132009000400030>>.

MARMUR, J. A. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. **Journal of Molecular Biology**, v. 3, p. 208-218, 1961. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80047-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80047-8)>.

MARTINS, ANTUNES, L. P.; PASCON, R. C.; OLIVEIRA, J. C. F.; DIGIAMPIETRI, L. A.; BARBOSA, D.; PEIXOTO, B. M.; VALLIM, M. A.; VIANANIERO, C.; OSTROSKI, E. H.; TELLES, G. P.; DIAS, Z.; CRUZ, J. B.; JULIANO, L.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; SILVA, A. M.; SETUBAL, J. C. Metagenomic analysis of a tropical composting operation at the São Paulo Zoo Park reveals diversity of biomass degradation functions and organisms. **Public Library of Science**, v. 8, n. 4, e61928, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0061928>>.

MORALES, S. E.; COSART, T.; JOHNSON, J. V.; HOLBEN, W. E. Supplemental programs for enhanced recovery of data from the DOTUR application. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, n. 3, p.572-575, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2008.07.017>>.

MOURA, E. P.; MÉLO, M. A. N.; MEDEIROS, D. D. Um estudo sobre o desempenho da agroindústria canvieira no estado de Pernambuco no período de 1987 a 1996. **Produção**, v. 14, n. 1, p.78-91, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-65132004000100008>>.

MÄNNISTÖ, M. K.; TIROLA, M.; HÄGGBLOM. Bacterial communities in Arctic fjelds of finnish lapland are stable but highly pH-dependent. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 59, n. 2, p.452-465, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00232.x>>.

NERCESSIAN, O.; FOUQUET, Y.; PIERRE, C.; PRIEUR, D.; JEANTHON, C. Diversity of bacterial and archaea associated with a carbonate-rich metalliferous sediment sample from the Rainbow vent field on the Mid-Atlantic Ridge. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 5, p.698-714, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00744.x>>.

NUNES, M. U. C. Compostagem de resíduos para produção de adubo orgânico na pequena propriedade. Circular Técnica 59. Aracajú, 2009. 7 p. (Circular Técnica)

OMORI, W. P. **Construção da biblioteca metagenômica a partir de amostras de solos contaminadas com vinhaça e construção de um oligoiniciador para Cu/Zn-SOD**. 2011. 113 f. Trabalho de Graduação (Graduação) – Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, Jaboticabal, 2011.

OMORI, W. P.; PIRES, R. T.; OGASSAVARA, F. O.; FRIGIERI, M. C. Emprego de *Zymomonas mobilis* em processos fermentativos. **Ciência & Tecnologia**, v. 3, n. 1, p. 28-49, 2011.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v. 276, p. 734-740, 1997. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.276.5313.734>>.

PAIXÃO, D. A. A.; DIMITROV, M. R.; PEREIRA, R. M.; ACCORSINI, F. R.; VIDOTTI, M. B.; LEMOS, E. G. M. Molecular analysis of the bacterial diversity in a specialized consortium for diesel oil degradation. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 3, p.773-781, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832010000300019>>.

PARK, SO-YOUN; SHIN, HYUN-JAE; KIM, GEUN-JOONG. Screening and identification of a novel esterase EstPE from a metagenomic DNA library. **Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p.7-14, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12275-011-0201-7>>.

PAULILLO, L. F.; VIAN, C. E. F.; SHIKIDA, P. F. A.; MELLO, F. T. Álcool combustível e biodiesel no Brasil: *quo vadis?* **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 45, n. 3, p.531-565, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-20032007000300001>>.

PEDRINHO, , E. A. N.; LEMOS, E. G. M.; PEREIRA, R. M.; SCAQUITTO, D. C.; SILVEIRA, É. L.; VAL-MORAES, S. P.; ALVES, L. M. C.; WICKERT, E.; VALARINI, M. J. Avaliação do impacto do lodo de esgoto na microbiota do solo utilizando o gene *16S rRNA*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 3, p. 443-448, 2009.

PEREIRA, R. M.; SILVEIRA, E. L.; CARARETO-ALVES, L. M.; LEMOS, E. G. M. Avaliação de populações de possíveis rizobactérias em solos sob espécies florestais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 5, p.1921-1927, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832008000500013>>.

PESSOA FILHO, M. A. C. P. Metagenômica e sua aplicação no estudo de diversidade e função de microrganismos de solos do serrado. **Documentos**, Embrapa Cerrados, Planaltina, 29p., 2010.

PETROSINO, J. F.; HIGHLANDER, S.; LUNA, R. A.; GIBBS, R. A.; VERSALOVIC, J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 5, p.856-866, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2008.107565>>.

PISA, G.; MAGNANI, G. S.; WEBER, H.; SOUZA, E. M.; FAORO, H.; MONTEIRO, R. A.; DAROS, E.; BAURA, V.; BESPALHOK, J. P.; PEDROSA, F. O.; CRUZ, L. M. Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 12, p. 1215-1221, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2011007500148>>.

PRADO, R. M.; CAIONE, G.; CAMPOS, C. N. S. Filter cake and vinasse as fertilizers contributing to conservation agriculture. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2013, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/581984>>.

PRUESSE, E.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. **Bioinformatics**, v. 28, n. 14, p. 1823-1829, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bts252>>.

PRUESSE, E.; QUAST, C.; KNITTEL, K.; FUCHS, B. M.; LUDWIG, W.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 21, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm864>>.

RIBEIRO, L. D. **Prospecção e avaliação da diversidade bacteriana em solo sob ação antropogênica**. 2012. 34 f. Trabalho (Graduação) – Apresentado ao Curso de Tecnologia em Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, Jaboticabal, 2012.

ROS, M.; KNAPP, B. A.; PEINTNER, U.; INSAM, H. Short communication. Response of bacterial community composition to long-term applications of different composts in agricultural soils. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 1, p.338-343, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5424/sjar/20110901-118-10>>.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 3. ed., v. 1, 2001.

SANFORD, R. A.; COLE, J. R.; TIEDJE, J. M. Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halorespiring facultative anaerobic Myxobacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p.893-900, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.2.893-900.2002>>.

SANTOS, A. S.; MOREIRA, A. L. L.; SANTOS, A. T.; AGOSTINI, E. A. T.; HIGAKI, W. A.; ALMEIDA, F. L.; ARAUJO, F. F.; GUABERTO, L. M. Bioprospecção de rizobactérias promotoras do crescimento em alface. **Colloquium Agrariae**, v. 6, n. 2, p.8-13, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5747/ca.2010.v06.n2.a052>>.

SANTOS, C. M. D. Os dinossauros de Hennig: sobre a importância do monofiletismo para a sistemática biológica. **Scientiae Studia**, v. 6, n. 2, p. 179-200, 2008.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3, p.1501-1506, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.3.1142-1147.2005>>.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D. H.; ROBINSON, C. J.; SAHL, J. W.; STRES, B.; THALLINGER, G. G.; VAN HORN, D. J.; WEBER, C. F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p.7537-7541, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01541-09>>.

SCHMEISSER, C.; STEELE, H.; STREIT, W. R. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 5, p.955-962, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-007-0945-5>>.

SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p.108-114, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662007000100014>>.

SILVEIRA, E. L.; PEREIRA, R. M.; SCAQUITTO, D. C.; PEDRINHO, E. A. N.; VAL-MORAES, S. P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES, L. M.; LEMOS, E. G. M. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 10, p. 1507-1516, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2006001000008>>.

SOUZA, L. M.; SCHLEMMER, F.; ALENCAR, P. M.; LOPES, A. A. C.; PASSOS, S. R.; XAVIER, G. R.; FERNANDES, M. F.; MENDES, I. C.; REIS JÚNIOR, F. B. Estrutura metabólica e genética de comunidades bacterianas em solo de cerrado sob diferentes manejos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 2, p.269-276, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2012000200016>>.

SOUZA, S. R.; DAROS, E.; FRAGOSO, R. B.; RUARO, L. Efeito de bactérias diazotróficas nos componentes de produção de cana-de-açúcar infectadas pelo raquitismo das soqueiras. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 4, p. 21-27, 2011.

SOUZA, Z. M.; PRADO, R. M.; PAIXÃO, A. C. S.; CESARIN, L. G. Sistemas de colheita e manejo da palhada de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 3, p.271-278, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2005000300011>>.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PERTERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p.2731-2739, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121>>.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p.4673-4680, 1994. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>>.

TORSVIK, V.; OVREAS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity – magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, v. 296, n. 5570, p.1064-1066, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.1071698>>.

VALENTE, B. S.; XAVIER, E. G.; MORSELLI, T. B. G. A.; JAHNKE, D. S.; BRUM JR., B. S.; CABRERA, B. R.; MORAES, P. O.; LOPES, D. C. N. Fatores que afetam o desenvolvimento da compostagem de resíduos orgânicos. **Archivos de Zootecnia**, v. 58, n. 1, p.59-85, 2009.

VASCONCELOS, Y. Bactérias mineradoras. **Pesquisa FAPESP**. 2012. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2012/10/11/bacterias-mineradoras/>>. Acesso: 17 Mar. 2014.

VEIGA FILHO, A. A.; RAMOS, F. Proálcool e evidências de concentração na produção e processamento de cana-de-açúcar. **Informações econômicas**, São Paulo, v. 36, n. 7, p. 48-61, 2006.

VĚTROVSKÝ, T.; BALDRIAN, P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. **Public Library of Science**, v. 8, n. 2, e57923, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0057923>>.

WANG, M.; CHEN, J.-K.; LI, B. Characterization of bacterial community structure and diversity in rhizosphere soils of three plants in rapidly changing salt marshes using 16S rDNA. **Pedosphere**, v. 17, n. 5, p.545-556, 2007. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160\(07\)60065-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160(07)60065-4)>.

WANG, Q.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M.; COLE, J. R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p.5261-5267, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00062-07>>.

WANG, Y.; QIAN, PEI-YUAN. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **Public Library of Science**, v. 4, n. 10, e7401, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0007401>>.

WATSON, J. D. **DNA o segredo da vida**. São Paulo: Companhia das Letras, 2005. p. 182-213.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.

WRIGHT, E. S.; YILMAZ, L. S.; NOGUEIRA, D. R. Dechiper, a search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 3, p. 717-725, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.06516-11>>.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the phototrophic Rhizobium strain BTail by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 7, p.2271-2277, 1991.

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology**, v. 7, n. 1-2, p. 203-214, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1089/10665270050081478>>.