

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

**ESTUDO DA DIVERSIDADE E ATIVIDADE
BACTERIANA EM SOLOS DE FLORESTA E SOB
CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Wellington Marcelo Queixas Moreira
Biólogo

2013

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

**ESTUDO DA DIVERSIDADE E ATIVIDADE
BACTERIANA EM SOLOS DE FLORESTA E SOB
CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Wellington Marcelo Queixas Moreira

Orientadora: Prof. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutor em
Microbiologia Agropecuária.**

2013

M838e Moreira, Wellington Marcelo Queixas
Estudo da diversidade e atividade bacteriana em solos de floresta
e sob cultivo de cana-de-açúcar / Wellington Marcelo Queixas
Moreira. – – Jaboticabal, 2013
xiii, 103 p.: il.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientadora: Lúcia Maria Carareto Alves
Banca examinadora: Antonio Carlos Monteiro, Haroldo Alves
Pereira Júnior, Luciano Takeshi Kishi, Mariana Carina Frigieri Salaro
Bibliografia

1. Ciclos biogeoquímicos. 2. gene 16S rRNA. 3. *Saccharum* spp.
4. Hipervariáveis V I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 579.22:633.61

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
– Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Wellington Marcelo Queixas Moreira – nascido em Bebedouro (SP), em 24 de fevereiro de 1983, graduou-se em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário UNIFAFIBE em Bebedouro (SP), no ano de 2004. Ingressou no Curso de Especialização, em 2006, recebendo o título de Especialista em Biologia Molecular e Biotecnologia, pela Universidade de Franca (UNIFRAN) em junho de 2007. Em agosto de 2007, iniciou o Mestrado, no curso de Pós-graduação em Microbiologia, Área de concentração em Microbiologia Agropecuária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal (SP), recebendo o título de mestre em julho de 2009. Em agosto do mesmo ano, iniciou o curso de Doutorado também no Programa de Microbiologia Agropecuária.

**“No meio da confusão, encontre a simplicidade.
A partir da discórdia, encontre a harmonia. No
meio da dificuldade reside a oportunidade”.**
Albert Einstein

Aos meus pais João e Marli, por toda dedicação,
educação e confiança.

À Gabriela, sempre companheira.

E a meus familiares e amigos

Dedico com carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS e a minha família

À Profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves, pela orientação, amizade, paciência e confiança depositada.

À Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, por todo suporte, idéias e incentivo no decorrer deste trabalho.

Ao Dr. João Carlos Campanharo pelos constantes auxílios e amizade.

Aos professores doutores: Antônio Carlos Monteiro, Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, Haroldo Alves Pereira Júnior, Luciano Takeshi Kishi, Maria Inês Tiraboschi Ferro, Mariana Carina Frigieri Salaro, Silvana Silvana Pompéia do Val-Moraes e Renata Aparecida de Andrade pelas sugestões e correções no exame de qualificação e defesa.

À amiga Dra. Silvana Pompéia do Val-Moraes pela amizade e colaboração no decorrer deste e de outros trabalhos.

À Gabriela Sanches Perez pelo apoio, carinho, paciência e companheirismo incondicional.

Ao Dr. Luciano Takeshi Kishi por todo suporte no decorrer deste.

A todos os companheiros do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas pela amizade e por tudo mais.

A todos os amigos do Centro Universitário Unifafibe pela amizade e companheirismo.

Ao professor Ms. Hélio José dos Santos Souza e prof. Dr. Rinaldo Guariglia do Centro Universitário Unifafibe, meus sinceros agradecimentos.

E o meu obrigado a todos que direta ou indiretamente sempre contribuíram para realização deste trabalho.

Muito Obrigado.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	x
SUMMARY	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Microrganismos e os ciclos biogeoquímicos	3
2.2. Vegetação do Estado de São Paulo	7
2.3. Cultura da cana-de-açúcar	10
2.4. Estudos de microrganismos independente de técnicas de cultivo	12
2.5. Sequenciamento de alta performance	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
Parte I – Área de estudo e amostragem do solo, obtenção e análise do DNA metagenômico	18
1. Áreas de estudo	18
1.1. Área 1: Santa Rita do Passa Quatro	18
1.2. Área 2: Mococa	19
2. Coleta do solo	20
3. Extração do DNA metagenômico do solo	22
4. Análise da integridade e quantificação do DNA metagenômico	22
Parte II – Construção das bibliotecas dos genes 16S rRNA do DNA metagenômico das amostras de solo	22
1. Amplificação por PCR da região 16S rDNA	22
2. Eluição e purificação dos produtos da PCR	23
3. Clonagem em vetor pGEM [®] T Easy	24
4. Transformação das células competentes	25
5. PCR para sequenciamento	25
6. Análise das sequencias	26
Parte III – Amplificação da região Vi (V1-V2) do 16S rDNA do DNA metagenômico do solo para análise da diversidade bacteriana baseada em Sequenciamento de Nova Geração (NGS)	26
1. Amplificação por PCR da região Vi do 16S rDNA	27
2. Eluição e purificação dos fragmentos de PCR da região Vi do 16S	28
3. Quantificação das amostras (Qubit [®])	29

4. Construção e validação das bibliotecas	28
5. Normalização das amostras	29
6. Clusterização e sequenciamento	30
7. Análise de Dados	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
Parte I: Análise das características do solo e extração do DNA metagenômico do solo	32
1. Análise das características físico-químicas das diferentes amostras de solo	32
2. Análise do DNA metagenômico	34
PARTE II: Bibliotecas de fragmentos 16S rDNA do DNA metagenômico do solo	37
1. Amplificação e clonagem dos fragmentos 16S rDNA.....	37
2. Clonagem e validação das bibliotecas 16S rDNA	38
3. Análise das bibliotecas de fragmentos 16S rDNA do DNA metagenômico do solo	39
3.1. Análise da diversidade bacteriana nos solos	39
3.1.1 Análise individual no banco NCBI	39
3.1.2. Comparação das sequencias de diferentes bibliotecas no RDP II..	43
3.2. Análise da atividade microbiana nos solos em relação aos ciclos biogeoquímicos.....	47
PARTE III: Análise da diversidade bacteriana baseada em sequenciamento de nova geração (NGS) da região Vi do gene 16S rRNA do DNA metagenômico do solo	55
1. Amplificação dos Fragmentos Vi do 16S rDNA.....	55
2. Validação das bibliotecas.....	57
3. Análise das comunidades bacterianas dos solos baseadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs)	58
4. Análise da diversidade bacteriana nos solos através do RDP-II.....	60
5. CONCLUSÕES	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
APÊNDICES	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS APÊNDICES	94

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Sistema de Incorporação de nucleotídeos e sequenciamento em matriz sólida do sistema Solexa/Illumina.....	17
Figura 2: Áreas de coleta em Santa Rita do Passa Quatro - SP. Área de Floresta e cultivo com cana-de-açúcar.....	19
Figura 3: Áreas de coleta em Mococa - SP. Área de Floresta e cultivo com cana-de-açúcar.	20
Figura 4: Metodologia de marcação dos pontos de amostragem de solo nas áreas de floresta e cana-de-açúcar em Santa Rita do Passa Quatro - SP	20
Figura 5: Tubos de P.V.C. utilizados para coleta do solo.....	21
Figura 6: Perfil eletroforético do DNA metagenômico total das amostras de solo de Floresta	35
Figura 7: Perfil eletroforético do DNA metagenômico total das amostras de solo de Cana-de-açúcar.....	36
Figura 8: Perfil eletroforético dos fragmentos 16S do DNA metagenômico das amostras de solo em Floresta e Cana-de-açúcar.....	38
Figura 9: Perfil eletroforético do DNA plasmidial dos clones obtidos das amostras de solo de Floresta	39
Figura 10: Perfil eletroforético do DNA plasmidial dos clones obtidos das amostras de solo de Cana-de-açúcar	39
Figura 11: Composição dos filos encontrados em amostras de Floresta e Cana-de-açúcar através da comparação com NCBI baseado em sequencias parciais de 16S RNA bacteriano.....	40
Figura 12: Diversidade bacteriana nos clones 16S rRNA com base na afiliação filogenética do RDP II – ferramenta Library Compare A – Cana 1 x Floresta 1 ; B – Cana 2 x Floresta 2 ; C – Cana Mococa x Floresta Mococa.....	44
Figura 13: Diversidade bacteriana nos clones 16S rRNA com base na afiliação filogenética do RDP II – ferramenta Library Compare. A – Floresta 1 x Floresta 2 ; B – Floresta 1 x Floresta Mococa	45
Figura 14: Diversidade bacteriana nos clones 16S rRNA com base na afiliação filogenética do RDP II – ferramenta Library Compare. A – Cana 1 x Cana 2 ; B – Cana 1 x Cana Mococa.....	45

Figura 15: Diversidade bacteriana nos clones 16S rRNA com base na afiliação filogenética do RDP II – ferramenta Library Compare. A – Cana 1 x Cana 2 ; B – Floresta 1 x Floresta 2 ; C - Cana 1 x Cana 2 ; D - Floresta 1 x Floresta 2. A e B representam o filo Proteobacteria enquanto C e D representam Acidobacteria.....	46
Figura 16: Porcentagem de organismos encontrados em: A - Floresta 1; B - Floresta 2 e C – Floresta Mococa, com função relacionada à ciclos biogeoquímicos relatados em literatura.....	50
Figura 17: Porcentagem de organismos encontrados em: A - Cana 1; B - Cana 2 e C – Cana Mococa, com função relacionada a ciclos biogeoquímicos relatados em literatura.....	52
Figura 18: Perfil eletroforético dos fragmentos Vi do 16S do DNA metagenômico das amostras de solo Floresta e Cana-de-açúcar	56
Figura 19: Perfil eletroforético dos “pools” de fragmentos Vi do 16S do DNA metagenômico das amostras purificadas de solo Floresta e Cana-de-açúcar	56
Figura 20: Análise das bibliotecas de Cana-de-açúcar e de Floresta através do sistema de eletroforese capilar Bioanalyzer® Agilent Technologies 2100	57
Figura 21: Curvas de rarefação para as sequencias obtidas através do sequenciamento do fragmento Vi do gene16S rRNA.....	59
Figura 22: Composição dos filos encontrados em amostras de Floresta (1 e 2) e Cana-de-açúcar (1 e 2) através da comparação com RDP-II baseado em sequencias do fragmento Vi do 16S rDNA bacteriano	62

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Elementos químicos, fonte e sua função nas células.....	4
Tabela 2: Técnicas de sequenciamento: Estratégia e Geração de Dados.....	16
Tabela 3: Análises físico-químicas dos solos utilizados neste experimento em função do local de coleta.....	32
Tabela 4: Rendimento médio de DNA metagenômico total obtido das diferentes amostras de solo	37
Tabela 5: Riqueza de UTOs e índices de diversidade calculados a partir das sequências Vi do 16S rRNA.....	60
Tabela 1S: Organismos Relatados em amostras de Solo de Cana-de-açúcar: Ca1 (cana-de-açúcar 1), Ca2 (cana-de-açúcar 2), Ca Mococa (cana-de-açúcar Mococa) e Não Relatado (NR) de acordo com a literatura.....	87
Tabela 2S: Organismos Relatados em amostras de Solo de Floresta: FI1 (Floresta 1), FI2 (Floresta 2), FI Mococa (Floresta Mococa) e Não Relatados (NR) de acordo com a literatura.....	90

ESTUDO DA DIVERSIDADE E ATIVIDADE BACTERIANA EM SOLOS DE FLORESTA E SOB CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO - A composição e a diversidade de comunidades microbianas podem ser usadas como indicadores da qualidade do solo, pois respondem rapidamente às mudanças ambientais. A intensificação da agricultura causa significativa perda de diversidade, reduzindo a habilidade do ecossistema resistir a períodos de estresse e efeitos ambientais indesejáveis. Esta redução é mais evidente quando se trata de sistemas de monocultura, impactando os microrganismos e diversos invertebrados, e também reduz a capacidade de auto-regulação do solo. Assim, este trabalho tem como objetivo analisar a diversidade bacteriana em solos de floresta e em solos cultivados com cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) em diferentes períodos do ano que possa estar relacionada com a dinâmica dos ciclos biogeoquímicos, bem como um estudo comparativo entre diferentes áreas de cultivo e técnicas de sequenciamento. As amostras de solo foram coletadas no município de Santa Rita do Passa Quatro, SP. Amostras de DNA metagenômico de cada solo foram extraídas e construídas quatro bibliotecas com amplicons do gene 16S rRNA e quatro bibliotecas com amplicons da região V1 e V2 (Vi) do gene 16S rRNA. Um estudo comparativo com sequências obtidas nas mesmas condições em outra área situada no município de Mococa, SP também foi analisado. Através dos dados obtidos, foi verificado que em solos de Floresta, independente do período do ano e área analisada, os filos bacterianos e a atividade dos organismos em relação aos ciclos biogeoquímicos, permaneceram praticamente inalterados. Este fato pode ser atribuído à estabilidade desse tipo de ecossistema, no qual existe ciclagem constante de nutrientes. Nas amostras de cana-de-açúcar, observou-se variação na frequência dos organismos encontrados em relação a diferentes coletas. Quanto à diversidade bacteriana, foi verificado que a ocorrência dos filos Proteobacteria, subdivisão Alphaproteobacteria e Deltaproteobacteria foi maior em solos de floresta, enquanto Acidobacteria e Firmicutes foram mais frequentes em solos de cana-de-açúcar. Quando os organismos encontrados foram analisados como participantes nos ciclos biogeoquímicos, foi observado que nas amostras de floresta os organismos relacionados ao ciclo do Nitrogênio (N) foram os mais

encontrados, seguidos dos relacionados aos ciclos de Carbono (C) e Enxofre (S). Nas amostras de solos com cana-de-açúcar foi observado mesmo padrão exceto do solo cana 2 no qual bactérias relacionadas ao ciclo do C foram encontradas em maior número. Quanto às análises do sequenciamento do fragmento Vi pelo sistema Illumina, observou-se que tanto em floresta 1, quanto em floresta 2 a predominância foi do Filo Proteobacteria, seguidos de Actinobacteria, Acidobacteria e Firmicutes. Nos solos das áreas de cana-de-açúcar, o maior número de sequências encontradas em cana 1 e 2 pertenciam ao filo Proteobacteria, seguido de Firmicutes, Actinobacteria e Acidobacteria. Aproximadamente 50% das sequências não puderam ser classificadas. As estratégias de sequenciamento parcial de fragmentos hipervariáveis do gene 16S rRNA podem ser um recurso importante a ser explorado como estratégia de “screening” em amostras complexas, pois os mesmos filos bacterianos foram relatados quando a análise da diversidade foi estudada através do sequenciamento de bibliotecas 16S com a técnica de Sanger

Palavras-chave: Ciclos biogeoquímicos; diversidade bacteriana; gene 16S rRNA; *Saccharum* spp, hipervariáveis V

STUDY OF DIVERSITY AND BACTERIAL ACTIVITY IN FOREST SOILS AND UNDER SUGAR CANE FARMING.

ABSTRACT – Microbial communities diversity and composition can be used as soil quality indicators, because respond quickly to environmental changes. Agriculture intensification causes significant loss of diversity, reducing the ability of the ecosystem to resist to periods of stress and undesirable environmental effects. This reduction is more evident when dealing with monoculture systems, impacting the microorganisms and several invertebrates, and also reduce the capacity of the soil self regulation. So, this study aims to analyze the bacterial diversity in forest soils and in soils cultivated with sugar cane (*Saccharum* spp.) in different periods of the year that can be related to biogeochemical cycles dynamic, as well as a comparative study between farming areas and sequencing techniques. Metagenomic DNA samples of each soil were extracted and built four libraries with gene 16S rRNA amplicons and four libraries with amplicons from gene 16S rRNA region Vi. A comparative study with obtained sequences in same conditions in another area situated in the municipality of Mococa, SP was also analyzed. Through the obtained data, it was found that in forest soils, regardless of the period of year and the area analyzed, bacterial phyla and organisms' activity in relation to biogeochemical cycles, remained practically unchanged. This fact can be assigned to this type of ecosystem stability, in which there is a constant nutrients cycling. In soil samples cultivated with sugar cane, was observed variation in organisms frequency found in relation to different collections. Proteobacteria phyla, subdivision Alphaproteobacteria and Deltaproteobacteria, was larger in forest soils, while Acidobacteria and Firmicutes were more frequent in sugar cane soils. When the organisms found were analyzed as participants in biogeochemical cycles, was observed that in forest samples the organisms related to Nitrogen cycle (N) were the most frequent, followed by those related to Carbon cycle (C) and sulfur (S). In sugar cane soils samples was observed the same pattern, except for the sugar cane soil 2 in which bacteria related to C cycle were found in larger numbers. Regarding the analysis of fragment Vi sequencing, it was observed that both in forest 1, as in forest 2, the predominance of Proteobacteria Phylum, followed by Actinobacteria, Acidobacteria and Firmicutes. In soils of sugar cane

areas, the largest number of sequence found in cane 1 and 2 belonged to Proteobacteria Phylum, followed by Firmicutes, Actinobacteria and Acidobacteria. Approximately 50% of the sequences could not be classified. Strategies of the partial sequencing of gene 16S rRNA hyper variable fragments can be an important resource to be explored as “screening” strategy in complex samples, because the same bacterial phyla were related when diversity analysis was studied through the sequencing of libraries 16S with Sanger technique.

Key words: biogeochemical cycles, bacterial diversity, 16S rRNA gene, *Saccharum* spp, V hyper variables.

1. INTRODUÇÃO

O solo é provavelmente o ambiente mais desafiador para os microbiologistas no que diz respeito à quantidade e diversidade de espécies, e comunidades microbianas presentes (DANIEL, 2005) sendo considerado um “hotspot”. E a diversidade encontrada em apenas um grama de solo é de alguns milhares de espécies (BAILLY et al., 2007).

A composição e a diversidade de comunidades microbianas podem ser usadas como indicadores da qualidade do solo, pois respondem rapidamente às mudanças ambientais. No entanto, ainda é difícil interpretar o processo de formação dessa composição, pois são pouco conhecidos os papéis específicos de muitos organismos na qualidade do solo (JOHNSON et al., 2003).

O número de potenciais micro-habitats em uma pequena porção do solo é extraordinário. Variações temporais como umidade, temperatura e nutrientes em cada um desses ambientes, influenciam esta diversidade de nichos para suportar as populações microbianas (ROESCH et al., 2007). Outro fator que afeta diretamente a diversidade de microrganismos são os processos de utilização do solo, como na agricultura, por exemplo. A intensificação da agricultura causa significativa perda de diversidade, ocasionando diversos efeitos negativos ao ambiente e também à produção agrícola.

A consequente redução na diversidade microbiana nos solos inclui extinção de espécies ou perda de função, reduzindo a habilidade do ecossistema resistir a períodos de estresse e efeitos ambientais indesejáveis (GILLER et al., 1997). Assim, ações na conservação da microbiota implicam em diversos benefícios ao ecossistema, até mesmo em escala global. A redução da biodiversidade do solo é ainda mais evidente quando se trata de sistemas de monocultura, impactando os microrganismos e diversos invertebrados, além de reduzir a capacidade de auto-regulação do solo. Desta forma, exige a entrada de outras fontes não biológicas para manutenção dos processos no solo, como o uso de agroquímicos (LAVELLE et al., 1999).

Estima-se que, de toda a diversidade de microrganismos do solo, apenas 0,1 a 1% destes sejam cultiváveis. Estudos que contemplem toda a diversidade de organismos, sejam eles cultiváveis ou não, são necessários. Devido à grande diversidade e seu “status” de não cultivável, a detecção, caracterização e quantificação em amostras ambientais, ainda é desafiadora e

o estabelecimento da ligação entre microbiota e funções nos ecossistemas é o outro desafio (HE et al., 2007)

Na biosfera, os microrganismos desempenham diversos papéis nos ecossistemas e também nos ciclos biogeoquímicos do carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo e diversos metais, mas a função da maioria destes microrganismos ainda é desconhecida (FITTER et al., 2005). Os microrganismos responsáveis pela existência destes processos são pertencentes principalmente aos domínios Bacteria, Fungi e Archaea. O entendimento da estrutura, funções, estabilidade e adaptações das populações microbianas, é extremamente importante para pesquisas básicas, biotecnologia (busca de novos genes e produtos destes), agricultura, ambiente e saúde humana (HE et al., 2007), acesso a dados de sequências de DNA destas comunidades, além de comparações entre conteúdo gênico e a comunidade de microrganismos encontrada (FRIAS-LOPEZ et al., 2008).

Diversas estratégias têm sido usadas para estudar as relações entre funcionamento de ecossistemas e estrutura de comunidades microbianas. Os maiores esforços são para atribuir funções-chave a membros específicos da comunidade e observar as cooperações entre estes membros (BENNDORF et al., 2007).

O poder destas comunidades e sua versatilidade metabólica permanecem obscuros, entretanto, estas atuando em conjunto, regulam a grande maioria das transformações de matéria e energia na Terra (COMMITTEE ON METAGENOMICS, 2007)

Uma vez que a diversidade de microrganismos encontradas nos mais diferentes ambientes, é extremamente grande, na mesma escala em que é complexa, são necessários estudos que busquem elucidar a papel dos microrganismos de diversos ecossistemas e a importância destes nos ciclos biogeoquímicos.

Assim, este trabalho tem como objetivo analisar a diversidade bacteriana em solos de Floresta e em solos cultivados com cana-de-açúcar em diferentes períodos do ano que possa estar relacionada com a dinâmica dos ciclos biogeoquímicos, bem como um estudo comparativo entre diferentes áreas de cultivo e técnicas de sequenciamento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Microrganismos e os ciclos biogeoquímicos

Os microrganismos são fundamentais para várias funções em diversos ecossistemas, dentre eles os solos, estando diretamente relacionada com o equilíbrio do mesmo; conseqüentemente, a perda desta diversidade perturba diretamente muitas atividades.

Assim, um melhor entendimento dos efeitos antropogênicos nas comunidades microbianas é extremamente importante, pois os microrganismos, entre outras atividades, regulam diversos processos biogeoquímicos no solo, incluindo decomposição da matéria orgânica, mineralização de nutrientes e emissão e consumo de gases (RADMAN et al., 2003). Essas atividades não são somente essenciais para o funcionamento de ecossistemas naturais, mas também são importantes para a manutenção de ecossistemas agrícolas.

Pesquisas têm sido direcionadas a fim de estabelecer as relações entre composição, diversidade e abundância dos microrganismos no solo, e sua relação com efeitos ambientais como erosão, emissão de gases estufa e sequestro de carbono (GILLER et al., 1997).

O planeta terra é um grande ecossistema com quantidades limitadas de carbono, oxigênio e nitrogênio disponíveis para todas as formas de vida. Estes elementos essenciais (Tab. 1) devem ser convertidos de uma forma para outra e disponibilizado aos organismos (ADUAN et al., 2004). Os microrganismos apresentam uma característica essencial a estes processos ambientais que consiste na capacidade de reciclar elementos essenciais. A ciclagem microbiana de elementos (ex: C, N, P e S) é conhecida como biotransformação e acontece em escala global transferindo os elementos de um local para outro (TODAR, 2006).

A separação e organização dos microrganismos do solo se dá em relação à sua atividade biológica nos ecossistemas, como exemplo os atuantes no ciclo do nitrogênio, carbono, fósforo e enxofre (VAL-MORAES, 2008). Os procariotos (Bacteria e Archaea) possuem metabolismos tão diversos que os qualificam como participantes de todos os ciclos dos elementos essenciais.

Como exemplos, podemos citar a conversão de dióxido de carbono em metano (metanogênese) e a conversão de nitrogênio atmosférico em formas assimiláveis (fixação biológica) que são processos unicamente realizados por procariotos, sendo essenciais para 2 dos ciclos mais importantes: C e N (SONI, 2007).

Tabela 1: Elementos químicos, fonte e sua função nas células.

Elemento	% Peso Seco	Fonte	Função
Carbono	50	CO ₂ , compostos orgânicos	Principal constituinte celular
Oxigênio	20	H ₂ O, CO ₂ , O ₂ , compostos orgânicos	Aceptor de Elétrons; constituinte celular
Nitrogênio	14	NH ₃ , NO ₃ , N ₂ , compostos orgânicos	Aminoácidos, Ácidos nucleicos, coenzimas, etc
Hidrogênio	8	H ₂ O, compostos orgânicos, H ₂	Constituinte celular
Fósforo	3	PO ₄	Ácidos nucleicos, Fosfolípidos, ATP
Enxofre	1	SO ₄ , H ₂ S, S	Aminoácidos (cisteína e metionina)
Potássio	1	Sais de P	Cofator enzimático
Magnésio	0,5	Sais de Mg	Cofator enzimático
Cálcio	0,5	Sais de Ca	Cofator enzimático
Ferro	0,2	Sais Ferrosos	Citocromos, Cofator enzimático

Adaptado de: TODAR, 2006.

Outros processos metabólicos interessantes podem ser citados como a utilização de compostos inorgânicos como amônia (NH₃) e sulfeto de hidrogênio (H₂S) como fonte de energia; outros utilizam nitratos ou sulfatos ao invés de oxigênio (O₂) durante o processo de respiração. Basicamente todo oxigênio é derivado do processo de fotossíntese de microalgas eucarióticas e as cianobactérias participam com grande importância deste processo (MARQUES, 2006). A lista de exemplos de envolvimento microbiano nos ciclos é infinita, e provavelmente, todos os microrganismos em um ecossistema estão envolvidos de uma maneira íntima e única (TODAR, 2006).

A decomposição da matéria orgânica é outro processo pelo qual nutrientes minerais como N, P e K presentes em materiais mortos, estão disponíveis prontamente para uso pelos consumidores primários. Sem este processo de ciclagem de nutrientes, a produção primária em escala global se extinguiria (SONI, 2007).

O carbono é o elemento central de todas as moléculas orgânicas, sendo também o elemento mais abundante. Uma das formas mais comuns de encontrá-lo é na forma gasosa como dióxido de carbono (CO₂). Seres

autotróficos, que incluem plantas, algas, bactérias fotossintéticas e metanogênicas, utilizam CO_2 como fonte de carbono para o crescimento. Já os heterotróficos necessitam de carbono orgânico para o crescimento e, finalmente, convertê-lo de volta para CO_2 (ADUAN et al., 2004).

A queima de combustíveis fósseis, principalmente petróleo e carvão, além de queimada de florestas e cana-de-açúcar, libera anualmente grandes quantidades de C na atmosfera (GRACE, 2001). A liberação de C para a atmosfera, principalmente o oriundo da queima de material vegetal ou combustíveis fósseis, está sempre em evidência devido sua contribuição para o efeito estufa bem como as mudanças climáticas globais (KREILEIMAN E BOUWMAN, 1994).

A superfície terrestre contém cerca de cem quatrilhões de toneladas de carbono (10^{23} g) e a maior parte está contida em rochas sedimentares (8×10^{22} g) que tem um processo de decomposição lento, não sendo levado em conta diretamente como participante do ciclo global do carbono (SCHELESINGER, 1997). O restante do carbono que participa desta ciclagem é liberado a partir da queima de combustíveis fósseis e por seres vivos dentre eles os microrganismos.

Outro elemento que chama atenção devida sua importância e abundância na atmosfera é o nitrogênio. Esse elemento é constituinte essencial de aminoácidos, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, hormônios e clorofila, entre outras moléculas (CRAWFORD et al., 2000) e está entre os quatro elementos mais abundantes nos seres vivos. Um complexo ciclo biogeoquímico deste elemento permite sua incorporação através de processos naturais como fixação atmosférica e deposição pela chuva ou a Fixação Biológica do Nitrogênio – FBN (ARAÚJO et al., 2006). Nos sistemas biológicos, este elemento apresenta o mais complexo dos ciclos devido à diversidade das maneiras que o elemento pode aparecer na biosfera.

O maior reservatório de N que existe é a atmosfera, o ar é composto de aproximadamente 78% deste elemento mas nesse local ele se encontra em uma forma química que não pode ser assimilada, o nitrogênio gasoso (N_2). Os microrganismos são os únicos seres capazes de remover o N_2 da atmosfera e transformá-lo em formas assimiláveis como a amônia (NH_3) (SONI, 2007).

Grupos específicos de bactérias podem realizar este processo, seja em vida livre ou em simbiose com determinados vegetais. A amônia gerada neste processo é assimilada em moléculas diversas como já citado. Bactérias como *Clostridium*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, Cianobactérias, entre outros são capazes de fixar N_2 em vida-livre, outros como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Frankia*, etc, se associam simbioticamente com as raízes de diversos vegetais formando nódulos característicos (ZILLI et al., 2005).

Outra forma de utilização de N é a respiração anaeróbica, no qual estes microrganismos utilizam formas como nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) comoceptor final de elétrons na cadeia respiratória. Podemos citar como exemplo, *Bacillus* e *Pseudomonas* comumente encontradas no solo a que utilizam nitrato (NO_3^-), o qual é reduzido a nitrito (NO_2^-) e depois à forma gasosa. Este processo é conhecido como Denitrificação (HENRY et al. 2004). Geralmente as bactérias denitrificantes são aeróbicas facultativas.

Inversamente, o processo de nitrificação também é comum entre as bactérias. Bactérias nitrificantes como *Nitrosomonas* utilizam NH_3 como fonte de energia, oxidando em NO_2^- , enquanto *Nitrobacter* oxida NO_2^- em NO_3^- . Essas bactérias são encontradas em diversos ambientes, sejam eles aquáticos ou terrestres e nestes apresentam grande significância para a fertilidade dos solos (BASHKAR; CARYULU, 2005). Como aspecto final a ser levado em consideração sobre este ciclo, temos ainda a disponibilização de N em ambientes oriundo da decomposição de matéria morta (vegetal ou animal), pois os microrganismos envolvidos utilizam o elemento nos processos de nutrição.

O Enxofre (S) é encontrado em vitaminas, metabólitos além de ser componente de aminoácidos (cisteína e metionina), sendo essencial para todos os organismos. Assim como os outros elementos, pode ser convertido através de microrganismos, os quais tem a capacidade de reduzir sulfato (SO_4) em sulfeto (H_2S). Alguns grupos de bactérias podem oxidar H_2S em S sendo chamadas de bactérias verdes sulfurosas. Outras utilizam H_2S e S como fonte de energia. Em ambos os casos, microrganismos podem mediar a conversão de H_2S em SO_4 (LIU et al., 2009).

Geralmente estes processos, são realizados por bactérias termofílicas ou acidófilas (acidificam o ambiente pela produção de ácido sulfúrico). SO_4 e S podem ser utilizados como aceptores finais de elétrons nos processos de

respiração anaeróbica. Quando estes processos de respiração anaeróbica acontecem, H_2S é liberado conferindo odor específico a solos, sedimentos ou substratos diversos. Bactérias e plantas assimilam S na forma de SO_4 , e alguns animais e bactérias utilizam como fonte de S, proteínas originadas de decomposição (SONI, 2007).

O fósforo (P) é um elemento essencial em sistemas biológicos, porque é um constituinte de ácidos nucleicos, (DNA e RNA) e ocorre nos fosfolípidios das membranas celulares. O fosfato é também um constituinte de ADP e ATP, que são moléculas de energia em sistemas biológicos. O ciclo do fósforo é relativamente simples, uma vez que não ocorrem intermediários gasosos e o P inorgânico é convertido em orgânico, e deste retorna a inorgânico (ADUAN et al., 2004). A ausência de formas atmosféricas de P faz com que o fluxo desse elemento seja sempre no sentido do continente em direção ao leito de rios e oceanos. Este só retorna à terra em pequenas porções quando animais se alimentam de produtos aquáticos, ou quando os oceanos elevam seu piso, formando porções de terra o que ocorre em milhões de anos (SONI, 2007).

A maior fonte de fósforo não vem da atividade microbiana, como acontece com outros elementos e sim de fontes minerais que sofrem intemperismo. Fungos e substâncias liberadas pelas raízes das plantas podem acelerar este processo em ecossistemas terrestres. O P sempre foi extremamente importante para produção agrícola devido sua importância na formação de compostos presentes nos seres vivos. Fontes artificiais de P são introduzidas nesses sistemas a fim de suprir as necessidades do sistema (DIEBEL et al., 2009).

2.2. Vegetação do Estado de São Paulo

O Estado de São Paulo, bem como todo o Brasil, sempre ocuparam lugar de destaque quando o assunto é biodiversidade. Originalmente era totalmente coberto por vegetações e colonizado por animais que apresentavam suas peculiaridades de acordo com o local que ocupavam. O Estado de São Paulo atualmente possui poucas áreas ainda recobertas por vegetação natural (FUNDAÇÃO FLORESTAL - SMA, 2013).

Uma peculiaridade do sudeste brasileiro é a presença de remanescentes florestais de diferentes unidades fitogeográficas ocorrendo muito próximos entre si. No Estado de São Paulo, entre 25° e 22° de latitude sul ocorrem fragmentos de pelo menos quatro grandes formações florestais como as Formações Pioneiras com Influência Marinha (Floresta de Restinga), a Floresta Ombrófila Densa, a Floresta Estacional Semidecidual e a Savana Florestada (Cerradão), cada qual com composição florística, estrutura e dinâmica próprias, em função dos fatores bióticos e abióticos determinantes (VELOSO, 1992).

É inquestionável a importância das florestas naturais na integração e preservação da biodiversidade, ou na manutenção dos ecossistemas e das funções relacionadas à hidrologia e à geologia, entre outros aspectos. Devido a intensos processos de degradação, diversas áreas foram determinadas como unidades de conservação, parques entre outros. No interior do Estado, dentre estas áreas fitogeográficas importantes, a Floresta Estacional Semidecidual e o Cerrado ganham destaque.

As florestas estacionais semidecíduas do Estado de São Paulo sofreram diferentes formas de perturbações e encontram-se restritas a pequenos fragmentos (LEITÃO-FILHO 1987). A floresta estacional semidecidual constitui uma vegetação pertencente ao bioma da Mata Atlântica (Mata Atlântica do Interior), típica do Brasil Central e condicionada à dupla estacionalidade climática: uma estação com chuvas intensas de verão, seguidas por um período de estiagem (IBGE, 1992).

Outro bioma de destaque encontrado no interior do Estado são as formações de cerrado. O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, estendendo-se originalmente por uma área de 2.045.064 km², dos quais apenas 20% desta área ainda é conservada. É caracterizado por pequenas árvores de troncos torcidos e recurvados e de folhas grossas, esparsas em meio a uma vegetação rala e rasteira, misturando-se, às vezes, com campos limpos ou matas de árvores não muito altas (WWF BRASIL, 2013). É um ecossistema muito rico em sua biodiversidade apresentando fisionomia e composição florísticas variáveis: a campestre, as savânicas e a floresta (TOLEDO-FILHO, 1984).

Com a finalidade de proteção dos fragmentos de biomas ainda existente, como já citado, áreas protegidas legalmente foram criadas. No

Estado de São Paulo existem 38 unidades de conservação denominadas Parques Estaduais, que ocupam uma área de 767.681,88 ha (FUNDAÇÃO FLORESTAL - SMA, 2013). Dentre estes parques protegidos por decretos, encontra-se o Parque Estadual do Vassununga (PEV). Foi criado pelo Decreto Estadual nº 52.546, de 26 de outubro de 1970, e teve seus limites alterados pelo Decreto Estadual nº 52.720, de 12 de março de 1971. Essa unidade tem 2.071,42 ha, divididos em seis glebas: Pé-de-Gigante, Capão da Várzea, Capetinga Leste, Capetinga Oeste, Praxedes e Maravilha, todas localizadas no município de Santa Rita do Passa Quatro, no Estado de São Paulo, com altitude variando de 590 a 740 m.

As glebas do Parque pertenciam a antiga Usina Açucareira Vassununga. Apresentam em sua área, duas diferentes unidades fitogeográficas, a Floresta Estacional Semidecidual e Cerrado. A área do parque está fragmentada pelo cultivo do entorno com cana-de-açúcar, eucalipto e pecuária (FUNDAÇÃO FLORESTAL - SMA, 2013). O desafio mais importante para o manejo do PEV é a minimização dos impactos causados pelos efeitos de borda em seus fragmentos e a ampliação da conectividade entre suas glebas e delas para com outros fragmentos importantes da região.

Quanto a macro e mesobiota encontradas nos diversos ambientes, sempre se soube da importância dos mesmos, entretanto na última década, estudos relacionados à microbiota ganharam notoriedade. Os microrganismos do solo contribuem para uma ampla quantidade de serviços essenciais para a função sustentável de todos os ecossistemas. Eles agem como os principais agentes de condução da ciclagem de nutrientes, regulação da dinâmica da matéria orgânica, sequestro de carbono e a emissão de gases de efeito estufa, afetando diretamente a estrutura física do solo (DANIEL, 2005).

Devido à vasta diversidade, às grandes populações e à longa história evolutiva, os microrganismos vêm contribuindo fortemente para a riqueza e a complexidade das interações no solo, incluindo desde simbioses altamente específicas a mutualismos difusos (BEARE et al., 1995).

2.3. Cultura da Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma monocotiledônea de médio porte pertencente à Família Poaceae. Essa planta forma rizomas e touceiras, produz colmos grossos, suculentos e ricos em açúcares (sacarose) divididos em nós e entrenós. Suas folhas são alternas e longas, apresentando o limbo com nervuras medianas, fortes e largas, com a base auriculada, possui ainda bainha formando um tubo que envolve o colmo (ROSA, 2009). A cultura da mesma é semi-perene, podendo produzir por 4 a 6 anos.

No Brasil o cultivo de cana-de-açúcar começou após a expedição de Martin Afonso de Souza, em 1532 na Serra do Mar, na Capitania de São Vicente. Originária da Ásia adaptou-se bem ao clima do Brasil, pois é própria para climas tropicais e subtropicais (THEODORO, 2011).

No início do século XX a cana-de-açúcar que já era extremamente explorada para produção de açúcar e cachaça, passa a ser candidata à fornecedora de combustível (etanol) fato impulsionado pela iminente fabricação de motores a álcool. Em 1931, o então presidente Getúlio Vargas criou um decreto que determinou a adição de 5% de etanol à gasolina. Adicionalmente, em 1933, criou o Instituto do Alcool e Açúcar (IAA), que favoreceu o crescimento do setor principalmente no Estado de São Paulo (ROSSETO, 2008). Em 1975, foi criado o programa Proálcool que visou à diminuição da importação de combustíveis fósseis que estavam com valores cada vez maiores devido à crise do petróleo de 1973 (NATALE-NETTO, 2007).

Com o crescente aumento da população, e consequente aumento da frota de veículos, a necessidade por alimentos e combustíveis aumentou principalmente aqueles combustíveis produzidos com um impacto menor ao meio ambiente, favorecendo então, a substituição dos combustíveis de origem fóssil e não renováveis pela bioenergia que apresenta inúmeras vantagens econômicas e ambientais (NOGUEIRA; LORA, 2003).

A cultura da cana-de-açúcar, uma das mais importantes atividades econômicas na história do Brasil, está novamente em fase expansão e desenvolvimento, sendo o país o maior produtor mundial. Relativamente fácil de ser implantada e manejada, com baixo custo, podendo atingir rendimentos de massa verde superiores a 120 t/ha/ano (TOWNSEND, 2000).

O total de cana moída na safra 2012/13 foi de 588,37 mil toneladas, com aumento de 5% em relação à safra 2011/12, que foi de 559,21 mil toneladas (UNICA, 2013). O Brasil é o maior produtor de açúcar e etanol de cana do mundo. A área cultivada com cana-de-açúcar que será colhida e destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2012/13 está estimada em 8,4 milhões de hectares. O estado de São Paulo é o maior produtor brasileiro com 52%, sendo assim 4,4 milhões de hectares. A área nacional de cana-de-açúcar, destinada à produção sucroalcooleira apresentou um crescimento de 1,5% ou 123 mil hectares em relação à safra passada (CONAB, 2013).

Os biocombustíveis, principalmente o etanol, são fontes energéticas que apresentam melhores atributos ambientais, sociais e econômicos frente aos derivados de petróleo. Além do mais, existe uma grande valorização dos produtos derivados de cana-de-açúcar frente a outros produtos agrícolas, aproveitamento na integra da matéria prima, além do baixo custo da produção do álcool e açúcar, comparado com produtos similares de outras fontes (THEODORO, 2011). Como ônus deste processo, existem os impactos ambientais causados por este tipo de cultivo, a monocultura. No Estado de São Paulo, áreas cobertas por mata natural foram gradativamente substituídas por canaviais. Esta substituição, em conjunto com cultivo contínuo, prolongado e, mais recentemente, intensivo, tem ocasionado mudanças nas características do solo, ar, recursos hídricos e até alteração na fauna local (ZORATTO, 2006).

Pode-se mencionar a contaminação de solos e águas proveniente dos agroquímicos utilizados, compactação e erosão dos solos, empobrecimento e/ou extinção da biota e microbiota associada à cana-de-açúcar bem como, a emissão de poluentes proveniente da prática de queima da palhada antes da colheita (GUARNIERI; JANNUZZI, 1992).

Parte da cana produzida no país, é colhida manualmente, sendo assim para facilitar o processo, a mesma deve ser queimada antes da colheita, o que libera na atmosfera toneladas de poluentes anualmente. Dentre os poluentes emitidos pela queima da cana-de-açúcar encontram-se CO, CO₂, NO, SO₂, CH₄, hidrocarbonetos não metânicos, sulfatos e material particulado além de compostos orgânicos voláteis (COV) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) (GONÇALES, 2006). Atualmente, a Lei Estadual nº 11.241 de 19 de

setembro de 2002, regulamenta o processo de queima da palhada de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, prevendo a eliminação completa dessa prática. Um protocolo de cooperação agroambiental foi estabelecido em 2007 através da União da Indústria de Cana-de-Açúcar do Estado de São Paulo antecipa os prazos legais para a eliminação da prática da queima, de 2021 para 2014 nas áreas onde já é possível a colheita mecanizada e de 2031 para 2017 nas áreas em que não existe tecnologia adequada para a mecanização (UNICA, 2013).

Além dos efeitos negativos já citados, a intensificação da agricultura causa significativa perda de biodiversidade e, conseqüentemente, ocasiona diversos efeitos negativos ao ambiente e também à produção agrícola. A redução da biodiversidade do solo é mais evidente quando se trata de sistemas de monocultura, impactando os microrganismos e diversos invertebrados, e também reduz a capacidade de autorregulação do solo.

2.4. Estudos de microrganismos independente de técnicas de cultivo

Recentes estimativas do número de espécies microbianas em um grama de solo têm ganhado muita atenção. Estas estimativas fazem com que o solo seja considerado abrigo de diversas populações de microrganismos não encontradas em nenhum outro habitat na Terra. Entretanto, não se observa um consenso nas estimativas do número de espécies por grama de solo. Considerando-se bactérias, por exemplo, esta faixa varia de 2000 a 8,3 bilhões de espécies (GANS et al., 2005; SCHLOSS; HANDESMAN, 2006)

Muitas espécies procariotas e eucariotas não podem ser isoladas facilmente de amostras ambientais ou não podem ser cultivadas “in vitro”. Para se conhecer a diversidade e atividade das espécies microbianas no solo, assim como sua diversidade funcional em resposta a diferentes fatores ambientais, foi necessário o desenvolvimento de novas abordagens adaptadas a estes organismos. Assim a metagenômica aparece como uma ferramenta extremamente poderosa para estes estudos (BAILLY et al, 2007).

A ecologia de microrganismos apresentou grande avanço com o surgimento de técnicas moleculares baseadas na análise do DNA de microrganismos retirados diretamente de amostras ambientais, sem a

necessidade de multiplicação de células isoladas previamente (PACE et al., 1986). Os estudos pioneiros baseados nestas técnicas, tornou possível analisar a estruturas de comunidades microbianas, utilizando as informações da sequência de nucleotídeos do DNA ribossômico (rDNA) (BENLLOCH et al., 1995).

A metagenômica aparece como alternativa, pois se trata de estudo independente de cultivo, do conjunto de genomas de comunidades microbianas, aplicados a exploração de consórcios microbianos em amostras ambientais, plantas ou outros hospedeiros (PETROSINO et al., 2009)

Estimativas indicam que estão descritos e caracterizados, apenas 10% de todos os microrganismos que existem na Terra. Tal valor está diretamente relacionado com a abordagem dependente de cultivo, pois esta limitou, seriamente, a avaliação taxonômica e filogenética como estimativa da diversidade, pois os métodos convencionais de cultivo não contemplam a maioria dos microrganismos (PACE, 1997). Estudos empregando técnicas moleculares revelaram que as técnicas de cultivo existentes eram incapazes de isolar certas espécies e que a diversidade genética de microrganismos na natureza é muito maior do que se imaginava (SILVEIRA et al., 2006). A maioria dos estudos metagenômicos, não inclui os eucariotos, possivelmente por se tratar da minoria em ambientes, ou porque são excluídos durante o processamento das amostras coletadas (filtração, centrifugação em gradiente de densidade), assim excluídos da biomassa que será submetida a extração de ácidos nucléicos (BAILLY et al., 2007).

Entre as técnicas independente de cultivo mais difundidas para o estudo da diversidade bacteriana, encontra-se com o uso do DNA ribossômico (rDNA) 16S, aplicada ao estudo da comunidade bacteriana de diferentes ambientes (PEDRINHO et al., 2009).

A região codificadora do 16S rRNA apresenta diversas porção, dentre elas algumas conservadas e outras hipervariáveis numeradas de 1 a 9 (V1 a V9) e estas são diversificadas entre as espécies bacterianas. Assim, essas sequencias se tornaram padrão na determinação de relações filogenéticas, na avaliação da diversidade em amostras ambientais e na detecção e quantificação de populações específicas (LIU; STAHL, 2002).

A metagenômica baseada em estudos de diversidade não nos revela informações relativas ao estado de expressão dos genes, sendo assim, o papel funcional de muitos genes ou organismos investigados em determinado ambiente permanecem desconhecidos. Para se superar esse desconhecimento uma nova abordagem na área da metagenômica é a tecnologia da Metatranscriptômica (URISCH et al., 2008). A metatranscriptômica é uma importante ferramenta nos estudos de dinâmica funcional de comunidades de microrganismos presentes em determinado ambiente (WARNECKE; HESS, 2009). Enquanto a genômica e metagenômica estudam um microrganismo ou comunidade microbiana potencial, a metatranscriptômica estuda um conjunto de genes transcritos em determinada condição ambiental. Esta técnica é extremamente poderosa para entendimento de padrões de expressão momentâneos de genes essenciais para sobrevivência de microrganismos em determinado nicho (WARNECKE; HESS, 2009).

Numerosos estudos do perfil de expressão têm sido realizados nos últimos anos buscando informações relacionadas a questões médicas, microbiológicas e ambientais correlacionados aos padrões de expressão gênica (QIU et al., 2008). A maioria destes estudos foram realizados através da técnica de microarranjos. Inicialmente eram experimentos restritos a um único organismo crescido em cultura pura sendo posteriormente empregada para estudos com diversos organismos (YOU et al., 2008). O uso da técnica de microarranjo constitui uma ferramenta eficiente para o estabelecimento de perfis das comunidades microbianas e quantificação das mudanças na microbiota do solo, em sedimentos e na água, assim como indicador de microrganismos envolvidos em sistemas de biorremediação (SPIRO et al., 2000).

2.5. Sequenciamento de alta performance

Com a evolução das estratégias moleculares para análises de genomas e sequências diversas, um aumento exponencial de novos dados ocorreu. Anteriormente baseado principalmente na tecnologia de sequenciamento desenvolvida por Sanger (1977), o avanço no conhecimento de sequências foi lento quando comparados com as novas tecnologias

emergentes de sequenciamento de alta performance ou sequenciamento de nova geração.

O grande número de projetos utilizando a abordagem metagenômica de diversos ambientes terrestres e aquáticos, dentre outros, paralelo ao desenvolvimento de novas tecnologias de sequenciamento de alta performance está facilitando o entendimento das comunidades microbianas ambientais (DELMONT et al., 2011). Além da importância ecológica, este entendimento tem considerável valor econômico. Vogel e cols. (2009) consideram que a comunidade microbiana do solo como uma “mina de ouro” para novos genes e para vias relacionadas à degradação de poluentes, biofilmes, produção de novas drogas.

As novas tecnologias de sequenciamento começaram a ser comercializadas em 2005 e estão evoluindo rapidamente. Todas essas tecnologias promovem o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida (CARVALHO; SILVA, 2010). Em comparação, o sequenciamento de bibliotecas de fragmentos 16S rRNA contendo milhares de clones, e a utilização de microarranjos, apresentam elevado custo além de dispêndio de tempo, prejudicando assim sua utilização como estratégias de rotina laboratorial (ZHOU et al., 2011)

As novas plataformas são capazes de gerar informação muitas vezes maior que o sequenciamento de Sanger (TAB. 2), com uma grande economia de tempo e custo por base para o sequenciamento. Estes sistemas utilizam um processo de clonagem “in vitro” e plataformas de realização automatizadas não sendo necessária a produção de clones bacterianos em grande escala e montagem das placas de sequenciamento e separação de fragmentos. A clonagem “in vitro” em suporte sólido permite que milhares de leituras possam ser produzidas de uma só vez com a plataforma (CARVALHO; SILVA, 2010).

As novas técnicas utilizadas incluem a plataforma 454 pirosequenciador da Roche, Solexa da Illumina, a plataforma da Applied Biosystems, denominada SOLiD System, e o HeliscopeTrue Single Molecule Sequencing (tSMS), da Helicos (MOROZOVA; MARRA, 2008).

Tabela 2: Técnicas de sequenciamento: estratégia e geração de dados

Tecnologia	Estratégia	Tamanho dos "reads"	Dados gerados por corrida
Sanger	Síntese por terminadores	900 pb	96 Kb
454 GS FLX	Pirosequenciamento	1000 pb	700 Mb
Illumina	Sequenciamento por síntese	100 pb	600 Gb
SOLiD	Sequenciamento por ligação	75 pb	160 Gb

A plataforma 454 Pirosequenciador foi o primeiro sistema de nova geração comercialmente disponível. Este sistema está baseado em um mecanismo de PCR em emulsão "in vitro" e a detecção em uma série de reações enzimáticas devido à quimioluminescência liberada (MOROZOVA; MARRA, 2008). O sistema requer que o DNA seja mecanicamente fragmentado, transformado em fragmentos fosforilados e ligado a adaptadores de sequência específica (um adaptador na extremidade 3' e outro na 5'). Estes mesmos adaptadores serão utilizados para ligação dos fragmentos de DNA à microesferas onde ficarão imobilizados durante a PCR. Após a amplificação, as microesferas são depositadas nas placas de sequenciamento (MARDIS, 2008).

O sequenciamento é realizado em ciclos, e a cada ciclo um tipo determinado de nucleotídeo é adicionado à reação. Se o nucleotídeo adicionado for incorporado à sequência em síntese, um sinal de luz é emitido, sendo a intensidade desse sinal um reflexo do número de nucleotídeos desse tipo específico que foram sucessivamente incorporados na molécula (CARVALHO; SILVA, 2010).

A plataforma SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) baseia-se em um processo de sequenciamento utilizando a enzima ligase, ao contrário dos outros sistemas que utilizam a polimerase. Como em outras plataformas o DNA deve ser fragmentado. Neste caso pode-se fragmentar o material de 60 a 90 pb ou de 1 a 10 Kb, com ambas as extremidades ligadas a adaptadores (MARDIS, 2008 b). A PCR em emulsão também é utilizada neste processo, entretanto as microesferas na qual estão associados os fragmentos de DNA são depositadas em uma lâmina de vidro. Primers específicos se unem às moléculas imobilizadas nas microesferas. Durante o processo de incorporação de novos nucleotídeos, fluorescência é emitida e captada (MOROZOVA; MARRA, 2008).

O sequenciamento baseado na plataforma Solexa/Illumina, é baseado na utilização de nucleotídeos terminadores marcados fluorescentemente como na técnica de Sanger. A diferença deste sistema em comparação com os anteriormente descritos, está no fato de a PCR ser realizada com as amostras imobilizadas em uma via sólida de vidro (PCR em fase sólida) (TURCATTI et al., 2008).

Na superfície sólida chamada de “flow cell”, adaptadores estão ancorados pela porção 5’ deixando livre a extremidade 3’ para o sequenciamento. Os fragments de DNA também possuem adaptadores capazes de se ligar aos adaptadores imobilizados. Após o ciclo de pareamento, o fragmento forma uma estrutura em “ponte” na superfície de sequenciamento e a extensão ocorre (Fig. 1), formando a fita complementar também em “ponte” (MARDIS, 2008).

No ciclo de desnaturação, as fitas são separadas e linearizadas. As cópias geradas permanecem agrupadas formando “clusters”. Estes “clusters” possibilitam a emissão de fluorescência durante a incorporação dos nucleotídeos terminadores. A leitura das bases é feita pela análise sequencial das imagens capturadas em cada ciclo de sequenciamento. Em geral, leituras de 25-35 bases são obtidas de cada cluster (CARVALHO; SILVA, 2010).

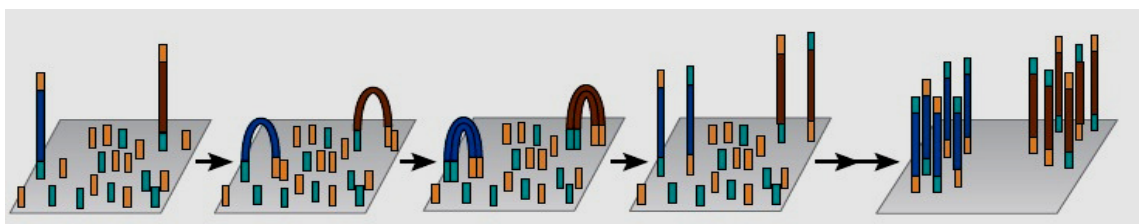


Figura 1: Sistema de Incorporação de nucleotídeos e sequenciamento em matriz sólida do sistema Solexa/Illumina. Adaptado de SHENDURE; JI (2008).

Como já citado, estas novas tecnologias são essenciais para a ciência atual, contribuindo com a descoberta de novas drogas, melhor entendimento de processos relacionados às mudanças climáticas, processos agrônômicos em geral, dentre outros. Contudo este ramo ainda carece de profissionais e suporte para armazenamento e processamento deste grande volume de dados gerados em apenas uma única corrida (DELMONT et al., 2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas da UNESP/FCAV, Jaboticabal-SP. A descrição experimental e os protocolos estão abaixo relacionados.

Os protocolos, quando não especificados pelo fornecedor dos kits ou reagentes, foram baseados em Sambrook e Russell (2001). Tais técnicas não oferecem risco para o meio ambiente e saúde humana, encaixando-se nos padrões de biossegurança (NB-1).

PARTE I: Área de estudo e amostragem do solo, obtenção e análise do DNA metagenômico

1. Áreas de estudo

1.1. Área 1: Santa Rita do Passa Quatro

Duas áreas localizadas no município de Santa Rita do Passa-Quatro (SRPQ), Leste do Estado de São Paulo (Brasil), foram utilizadas como ponto de coleta de solo sendo uma das áreas sob cultivo de cana-de-açúcar (próximo às coordenadas geográficas 21° 42'34" Sul e 47° 34'30" Oeste e altitude média de 589m) cuja colheita da mesma é realizada manualmente logo após a queima da palhada, e outra área de floresta, situada no Parque Estadual de Vassununga (próximo às coordenadas geográficas 21° 42'30" Sul e 47° 34'56" Oeste e altitude média de 602 m) (Fig.2).

Segundo a classificação climática de Köppen e Geiger (1928) baseada em dados mensais pluviométricos e termométricos, o tipo dominante na área é o **Cwa**, caracterizado pelo clima tropical de altitude, com chuvas no verão e seca no inverno, com a temperatura média do mês mais quente superior a 22°C. A temperatura média é de 21°C (mínima de 17,5°C e máxima de 23,5°C) e a precipitação varia de 24 a 278 mm/mês (CEPAGRI, 2013 – A).

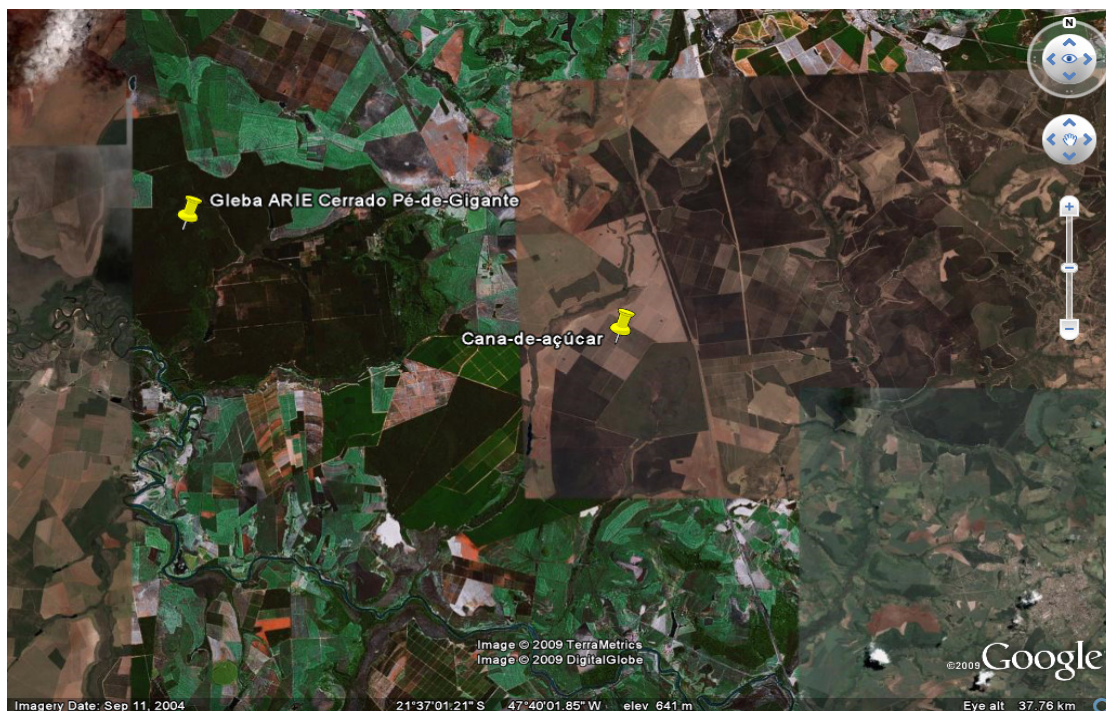


Figura 2: Áreas de coleta de solo em Santa Rita do Passa Quatro - SP. Área de floresta e cultivo com cana-de-açúcar. Imagens de satélite.

1.2. Área 2: Mococa

Outra área do estudo, referente ao trabalho de Macedo (2012), situada no Município de Mococa, nordeste do Estado de São Paulo (próximo às coordenadas geográficas 21° 25' Sul e 47°05' Oeste. A altitude média da área é de 645 m. A classificação climática de Köppen e Geiger (1928), classifica o clima do município como sendo do tipo **Aw**, sendo tropical chuvoso com inverno seco e mês mais frio com temperatura média superior a 18°C. O mês mais seco tem precipitação inferior a 60 mm. A temperatura média para o município é de 23° (variando de 21 a 25°C). As chuvas variam de 21 a 273 mm/mês (CEPAGRI, 2013 – B).

A referida área de estudo pertence à Usina Ipiranga, e foi originalmente convertida à partir da mata nativa e tem sido explorada com manejo manual com queima (MACEDO, 2012).

As amostragens também foram realizadas em uma área cultivada com cana-de-açúcar e outra de floresta (Fig. 3), sendo as coletas realizadas no mês de fevereiro de 2010.



Figura 3: Áreas de coleta de solo em Mococa - SP. Área de floresta e cultivo com cana-de-açúcar. Imagens de satélite. Adaptado de: MACEDO (2012).

2. Coleta do solo

As amostras dos solos foram retiradas em dez pontos de cada área escolhida (Fig. 4) a partir das coordenadas acima descritas para as áreas de Santa Rita do Passa Quatro. A partir do ponto referido como “**corner**”, os pontos **A** estavam a 1m, os pontos **B** a 10m e os pontos **C** a 100m de distância do corner.

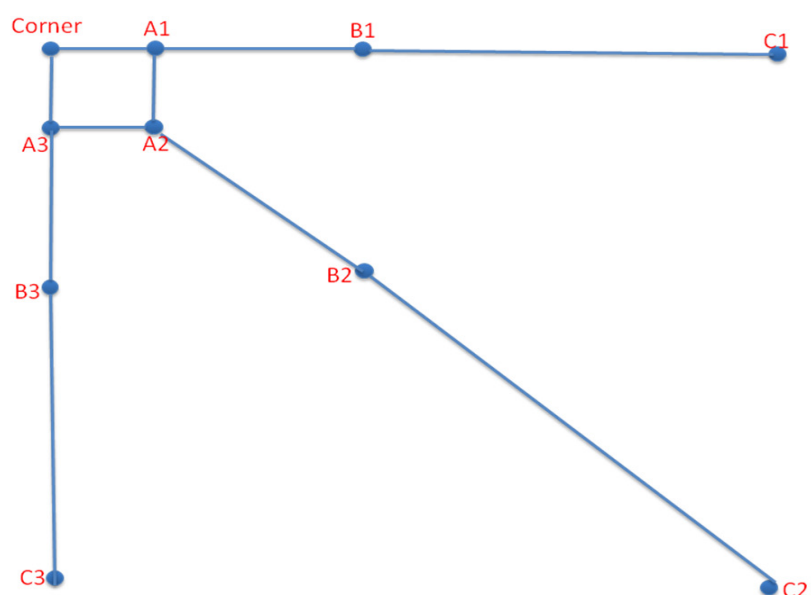


Figura 4: Metodologia de marcação dos pontos de amostragem de solo nas áreas de floresta e cana-de-açúcar em Santa Rita do Passa Quatro - SP.

As amostras foram coletadas em tubos de P.V.C. com 25 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro, introduzidos verticalmente no solo (Fig. 5). Os mesmos foram identificados, vedados com fita adesiva, acondicionados em caixas térmicas com gelo e enviados para o Laboratório de Análises de Solo e Planta para análise das propriedades físico-químicas, e para o Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) para a extração das amostras de DNA metagenômico, sendo ambos situados na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus Jaboticabal. Para análise das características físico-químicas, as amostras dos 10 pontos de cada área de coleta foram unidas, sendo assim analisado um “pool” representativo para cada área.



Figura 5: Tubos de P.V.C. utilizados para coleta do solo

Durante o ciclo da cana-de-açúcar coletas foram realizadas nos meses de fevereiro (coleta 1) e novembro de 2010 (coleta 2). Essas amostras permitiram a comparação na população em épocas do ano diferentes (Chuvoso – Fevereiro e Seca – Novembro). Sendo assim, as amostras foram nomeadas Floresta 1 e 2, e Cana 1 e 2.

As amostras da área de Mococa coletadas receberam tratamento similar, exceto quanto à casualização dos pontos de coleta descrito por

Macedo (2012). As amostras desta área foram coletadas em fevereiro, e receberam o nome de Floresta Mococa e Cana Mococa.

3. Extração do DNA metagenômico do solo

A extração do DNA total presente nas amostras dos solos, foi realizada utilizando o Kit FastDNA[®] SPIN Kit (BIO 101-QUANTUM BIOTECHNOLOGIES - Catálogo n.º (#6560-200) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante do produto. O material extraído foi utilizado para construção de bibliotecas de 16S para análise de diversidade e outros estudos.

4. Análise da integridade e quantificação do DNA metagenômico

A integridade do DNA metagenômico extraído das amostras foi estimada em gel de agarose a 0,8%, em tampão TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3). Uma alíquota de 5 µl do DNA obtido, mais 3 µl de tampão de carregamento (0,025% de azul de bromofenol (p:v) e 50% de glicerol (v:v) foi submetido à eletroforese. A análise foi realizada em uma cuba (modelo Max Cell EC 360M) e tampão TBE 1X adicionado de brometo de etídeo (0,5 µg/mL), durante aproximadamente 2h, à voltagem constante de 80 V. Os géis foram visualizados e documentados por um sistema de documentação de géis (GEL DOC Universal Hood II - BIO-RAD).

A concentração de DNA foi estimada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) com alíquotas de 2 µl da solução de DNA obtida. A leitura foi realizada nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm, e a relação 260/280 foi utilizada para estimar a pureza do DNA.

PARTE II: Construção das bibliotecas dos genes 16S rRNA do DNA metagenômico das amostras de solo

1. Amplificação por PCR da região 16S rDNA

Para avaliar a diversidade procariótica presente nos solos e sua relação com os ciclos biogeoquímicos, a região do gene 16S rRNA do DNA metagenômico foi amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

A reação de PCR foi realizada utilizando-se 100 ng do DNA metagenômico previamente extraído do solo, 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 μM de cada desoxirribonucleotídeo, 2,5 U de taq DNA Polimerase (Invitrogen), tampão de PCR 1X concentrado e 50 pMoles de cada oligonucleotídeo iniciador. A reação de PCR foi realizada como descrito por Pedrinho et al. (2009). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação do gene da subunidade ribossomal 16S estão descritos em DUNBAR (1999) e são: pAF (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') e pC5B (5'-TAC CTT GTT ACG ACT T-3') e geram um fragmento de aproximadamente 1500 pb.

Os produtos provenientes das reações acima descritas foram analisados em gel de agarose a 1%, em tampão TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3). A análise eletroforética e a visualização dos mesmos, foi realizada como descrito no item 4 (Parte I).

Após a amplificação do fragmento 16S, dos 10 diferentes pontos de coleta de solo em de cada local de coleta (Floresta 1 e 2; Cana-de-açúcar 1 e 2), o produto amplificado de cada ponto individualmente, foi misturado formando um "pool" contendo fragmentos dos 10 pontos amplificados para cada coleta.

2. Eluição e purificação dos produtos da PCR

Os produtos de PCR foram purificados através de uma eletroforese preparativa em gel de agarose de baixo ponto de fusão a 1,0% (p/v), em tampão TAE 1X (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA).

A região do gel contendo os fragmentos amplificados foi marcada e cortada. A recuperação e purificação dos fragmentos de DNA que foram utilizadas para a construção das bibliotecas de fragmentos 16S do gel de agarose, foram realizadas com a utilização do Kit GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, Catálogo nº 28-9034-70), de acordo com a descrição do fabricante. A integridade do DNA obtido também foi analisado através de eletroforese em gel de agarose a 1%, e posteriormente quantificado

em espectrofotômetro NanoDrop ND-100 para a determinação da concentração e pureza da amostra.

3. Clonagem em vetor pGEM® T Easy

A clonagem dos fragmentos de *16S rDNA* amplificados, foi realizada a partir de um “pool” dos produtos de amplificação dos diferentes pontos de coleta acima descrito. A ligação ao vetor foi realizada utilizando-se do Kit pGEM®-T Easy Vector (Promega, Catálogo nº A3600) de acordo com as instruções do fabricante. Aproximadamente 100 ng de DNA de dos fragmentos *16S* purificados foi utilizado no processo de clonagem, além de 3U da enzima T4 DNA Ligase e 50 ng do pGem Vector. Assim, quatro bibliotecas foram construídas, sendo elas: Floresta 1, Floresta 2, Cana 1 e Cana 2.

4. Transformação das células competentes

Nessa etapa de transformação, foram utilizadas células competentes de *Escherichia coli* DH5α preparadas quimicamente (HANAHAN, 1983), gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

O vetor contendo o inserto foi inserido nas células competentes através de choque térmico (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). Os clones transformados foram coletados aleatoriamente com o auxílio de palitos de madeira esterilizados por autoclavagem e os clones foram organizados em placas de 96 poços preenchidas com 100 µL de meio líquido “CircleGrow” (CG) acrescido de 100 µg/mL de ampicilina e incubados durante a noite em estufa B.O.D. a 37°C durante 22 horas. Após este período, foi adicionado 100 µL de glicerol 40% (v/v) estéril às culturas. As placas foram então seladas com adesivos e armazenadas a -80°C.

Em seguida, foi realizada a extração do DNA plasmidial segundo Sambrook e Russel (2001). Os clones provenientes da clonagem dos “pools” de *16S* foram analisados em gel de agarose a 0,8%, em tampão TBE 1X (Tris

89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3). A análise eletroforética e a visualização dos mesmos, foi realizada como descrito no item 4 (Parte I).

Para a validação da clonagem, o DNA plasmidial de clones, escolhidos aleatoriamente, foram submetidos a uma reação de restrição com a enzima EcoRI (Biolabs - Ipswich, MA). As condições utilizadas foram: 200 ng de DNA plasmidial; 1U de enzima, tampão 1_x em um volume final de 15 µL. A reação foi incubada a 37°C durante 1 hora. Os fragmentos foram confirmados por eletroforese em gel de agarose a 1%.

5. PCR para sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas em microplacas utilizando o kit “DNA Sequencing-Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ABI Prism”, Versão 3. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se de 0,4 µL dos terminadores Big Dye; 3,2 pmoles dos iniciadores “forward”; 100 ng de DNA plasmidial; e 4,6 µL de tampão 2,5 X (400 mM Tris-HCl, pH 9; 10 mM MgCl₂); completando-se a reação com H₂O mili-Q estéril para 10 µL. O oligonucleotídeo iniciador utilizado foi M13/pUC 1211 (“forward” 5’ – GTAAAACGACGGCCAGT – 3’).

As placas foram seladas com um adaptador de silicone e levadas ao termociclador. A reação foi realizada em um termociclador (MJ Research PTC-100) seguindo o programa: 2 minutos a 96°C e 40 ciclos de 10 segundos a 96°C, 20 segundos a 52°C e 20 segundos a 60°C. Após os 40 ciclos, 10 minutos a 72°C. Ao final do programa as amostras permaneceram a 10°C.

Após a reação, as amostras foram preparadas para o sequenciamento e precipitadas com 80 µL de isopropanol 75% e lavadas com etanol 70%, ambos processos com centrifugação a 3.220 xg por 5 minutos, a 20°C. Esta última operação foi repetida por duas vezes e as amostras foram secas em fluxo laminar por 1 hora na ausência de luz.

As amostras foram ressuspensas com 9 µL Hi-Di Formamide – Catálogo – P/N 4311320 (ABI Prism) e desnaturadas a 95°C por 5 minutos. O sequenciamento dos clones foi realizado no sequenciador capilar modelo ABI 3100 – Perkin Elmer.

6. Análise das sequencias

Para se verificar a qualidade das sequencias obtidas utilizou-se o programa “Sequencing Analysis 3.4”, que gerou os eletroferogramas que foram submetidos à análise pelo programa “Phred/Phrap” (GORDON et al., 1998) usado na detecção da confiabilidade de cada base sequenciada. A seleção das sequencias adequadas foi realizada pelo programa Phred/Phrap, o qual analisa a qualidade das sequencias com nível de exigência mínima de 400 bases, com qualidade Phred acima de 20 e gera arquivos no formato “fasta”.

Preliminarmente, as sequencias foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos, com sequencias depositadas no banco de dados GenBank acessado através do “site” do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”). A ferramenta utilizada para esta consulta foi o BLAST - “Basic Local Alignment Search Tools” (ALTSCHUL et al., 1997) no qual individualmente cada sequencia parcial foi analisada.

A análise comparativa das bibliotecas foi realizada através do programa Library Compare (LIBCOMPARE) que permite a comparação entre duas bibliotecas, do site Ribossomal Database Project II (RDP II) versão 10 (<http://rdp.cme.msu.edu/>) (limiar de confiança de 95%), que possui um sistema de classificação taxonômica (RDP Hierarchy) que segue a proposta do Manual Bergey’s (GARRITY et al., 2004).

Para se determinar a função dos microrganismos como participante ou não dos ciclos biogeoquímicos, após a análise das sequencias pela ferramenta BLAST, de posse do nome científico das mesmas, foi realizada uma busca em bancos de dados, livros e artigos diversos para a verificação da sua função/atividade, sendo possível agrupá-los.

PARTE III: Amplificação da região Vi (V1-V2) do 16S rDNA do DNA metagenômico do solo para análise da diversidade bacteriana baseada em Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

1. Amplificação por PCR da região Vi do 16S rDNA

A fim de se comparar a diversidade bacteriana contida nos solos referentes às coletas de SRPQ, pelo uso de outra estratégia experimental, um fragmento correspondente às regiões hipervariável 1 e hipervariável 2 (nomeado Vi) do gene 16S rRNA do DNA metagenômico foi amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para posterior sequenciamento pela plataforma Illumina®.

Foi utilizado na reação de PCR 120 ng do DNA metagenômico previamente extraído do solo, 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 μM de cada desoxirribonucleotídeo, 2,5 U de taq DNA Polimerase (Invitrogen), tampão de PCR 1X concentrado, 10 pMoles de cada oligonucleotídeo iniciador, além da adição de 0,6 μL de DMSO (P.A.). As reações foram realizadas em triplicata, em tubos de 0,2 mL. A reação ocorreu em um termociclador (Eppendorf – Mastercycler Gradient) seguindo o programa: 2 minutos a 95°C e 31 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 65°C e 90 segundos a 72°C. Após os 31 ciclos, 5 minutos a 72°C. Ao final do programa as amostras permaneceram a 4°C.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação do gene da porção Vi da subunidade ribossomal 16S estão descritos em YOUNG, et al. (1991) e são: Y1 (5'- TGG CTC AGA ACG AAC GCT GGC GGC -3') e Y2 (5'- CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3') e geram um fragmento de aproximadamente 300 pb.

Os produtos provenientes das reações acima descritas foram analisados em gel de agarose a 2%, em tampão TBE 1X. A análise eletroforética e a observação dos mesmos, foi realizada como descrito no item 4 (Parte I).

A amplificação do fragmento Vi do gene 16S, foi realizada individualmente seguindo o mesmo padrão descrito anteriormente. Após a amplificação dos 10 diferentes pontos de coleta de solo, de cada coleta (Floresta 1 e 2; Cana-de-açúcar 1 e 2), o produto amplificado dos pontos foi misturado formando um “pool” contendo fragmentos dos 10 pontos amplificados para cada coleta. Os mesmos receberam os nomes de: Floresta 1, Floresta 2, Cana 1 e Cana 2.

2. Eluição e purificação dos fragmentos de PCR da região Vi do 16S rRNA

Os produtos de PCR foram purificados através de uma eletroforese preparativa em gel de agarose de baixo ponto de fusão a 2,0%, em tampão TAE 1x. A região do gel contendo os fragmentos (~300pb) amplificados foi marcada e cortada. A recuperação e purificação dos fragmentos Vi foi utilizada para a construção das 4 bibliotecas realizadas com a utilização do Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, Catálogo nº A9281), de acordo com a descrição do fabricante. A integridade do DNA obtido também foi analisada através de eletroforese em agarose a 2% conforme item 2 (Parte II).

3. Quantificação das amostras (Qubit®)

Os “pools” contendo os fragmentos Vi do gene 16S rRNA, foram quantificados através do Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies). Este equipamento permite a quantificação de DNA, RNA e proteínas utilizando corantes fluorescentes específicos para cada tipo de molécula permitindo assim alta sensibilidade e especificidade. Para quantificação foram utilizados 1 ul da solução estoque dos produtos amplificados Vi. Para isto, foi utilizado o Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen® - Catálogo nº Q32851) seguindo o protocolo do fabricante. Após o preparo da amostra, a calibração do aparelho foi realizada com a solução Padrão 1 (P1), seguido da solução Padrão 2 (P2), ambas incluídas no kit. No aparelho Qubit® 2.0 Fluorometer, foi selecionada a opção DNA, carregando a amostra para realização da leitura.

4. Construção e validação das bibliotecas

As bibliotecas foram construídas seguindo o protocolo de preparo TruSeq® DNA sample preparation v2 (Illumina® - Catálogo nº FC-121-2001). Inicialmente, o material a ser trabalhado, deve ser fragmentado em insertos contendo de 300 a 500 pb. Entretanto, os fragmentos amplificados da região Vi contém aproximadamente 300 pb, sendo assim, foi dispensada a etapa de fragmentação do material.

Uma vez que os insertos contém o tamanho em pares de base compatível com o preconizado pelo sistema, as extremidades destes devem ser reparadas a fim de obter fragmentos com a extremidade “blunt-end”. Estas são geradas pela utilização de exonucleases fornecidas pelo kit. Algumas bases adenina são adicionadas na extremidade dos fragmentos, facilitando assim a ligação dos adaptadores na próxima etapa, pois estes contém bases timina na posição 3’, utilizando o princípio da complementaridade para ligação dos fragmentos aos adaptadores.

Os adaptadores contém a sequência de “primers” utilizados na reação de PCR. Após a ligação dos adaptadores, as amostras podem ser misturadas nas colunas da célula de leitura (“flow cell”). Uma vez ligados, os fragmentos devem ser purificados em gel preparativo de baixo ponto de fusão permitindo assim além da confirmação do tamanho desejado dos insertos, a remoção de adaptadores não ligados e demais produtos de reação.

Subsequentemente, os fragmentos passaram por uma fase de enriquecimento. Nesta fase, somente os fragmentos que contém adaptadores em ambas as extremidades são amplificados através de PCR, aumentando assim a quantidade de DNA na amostra. Os “primers” utilizados se ligam às extremidades dos adaptadores.

Para validação do tamanho dos fragmentos da amostra enriquecida pela PCR, uma alíquota de cada biblioteca foi analisada no Bioanalyzer® Agilent Technologies 2100 que utiliza uma plataforma microfluida para realização de eletroforese capilar. O kit utilizado foi o High Sensitivity DNA chip (Agilent® - Catálogo nº G2938-90321). Neste processo de validação foi utilizado 1 ul de uma solução diluída da biblioteca (1:50).

5. Normalização das amostras

As amostras analisadas previamente pelo sistema de Bioanalyzer® foram novamente quantificadas no Qubit® seguindo o mesmo protocolo acima descrito. Os valores obtidos em ng/ul foram então convertidos em nM. Assim, as bibliotecas foram preparadas a uma concentração inicial de 10 nM e após, diluídas a 2 nM.

Uma alíquota da biblioteca contendo 2 nM de fragmentos de DNA, foi quantificada através de PCR absoluta em Tempo Real em aparelho ABI 7500 (Applied Biosystems). O sistema utilizado foi o KAPA SYBR® FAST qPCR Kit (Illumina® - Catálogo nº KK4824) seguindo especificações do fabricante. Este sistema utiliza uma titulação de 2 a 20 pMoles da amostra em relação a uma reta padrão disponível no kit oferecendo assim, uma quantificação precisa da concentração do material.

6. Clusterização e sequenciamento

Para a clusterização do material, processo pela qual as bibliotecas serão mobilizadas na plataforma sólida (lâmina de vidro), foram utilizados 16 pMoles de cada biblioteca. Este processo foi realizado por um sistema automatizado chamado cBot Cluster Generation System (Illumina® - Catálogo nº SY-301-2002). Este equipamento liga os fragmentos da biblioteca à lâmina através dos adaptadores, unindo-os a oligonucleotídeos covalentemente ligados à superfície da lâmina ("flow-cell"). A indexação dos fragmentos à lâmina demora aproximadamente 5 horas e todos os reagentes e materiais foram fornecidos junto ao Paired-End Cluster Generation Kit v2 (Illumina® - Catálogo nº PE-401-2001) e os procedimentos realizados segundo protocolo do mesmo.

A corrida de sequenciamento durou aproximadamente 12 dias e foi realizada na plataforma Hiseq2500 (Illumina®). A análise consistiu em uma corrida de 200 ciclos, sendo: 100 ciclos iniciais de incorporação e leitura dos nucleotídeos, a realização da inversão da posição da fita de material genético na lâmina (leitura inversa ou "paired-end") e mais 100 ciclos de incorporação e leitura. A cada ciclo 1 nucleotídeo é incorporado à fita molde. Ao final destes ciclos, foram realizados mais 7 ciclos de leitura de "barcode" onde as amostras podem ser separadas através dos adaptadores únicos que receberam no início do processo de preparo das bibliotecas. Os procedimentos foram realizados com a utilização do kit TruSeq™ SBS Kit v3 - 200 Cycles (Illumina® - Catálogo nº FC-401-3001) segundo os protocolos do kit.

Ao final do sequenciamento, foi utilizado o "software" CASAVA 1.8.2 (Illumina®) que separa os "barcodes" convertendo o arquivo gerado denominado .BCL (captura imagens durante o sequenciamento) em um arquivo

.FASTQ que é um formato de texto dos nucleotídeos similar ao conhecido formato .FASTA.

7. Análise de dados

A comparação da diversidade das sequencias foi realizada utilizando o programa MOTHUR (SCHLOSS et al., 2009). Pelo software MOTHUR foram avaliados estimadores de riqueza como Chao 1 (CHAO, 1987) e ACE (Abundance-based Coverage Estimator) (CHAO e LEE, 1992), e índices de diversidade como Shannon e Simpson.

A análise das bibliotecas após a análise pelo software MOTHUR, foi realizada através do site Ribossomal Database Project II (RDP II) versão 10 (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Após este processo de classificação, foi calculada a porcentagem de ocorrência de cada filo em cada amostra.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parte I: Análise das características do solo e extração do DNA metagenômico do solo

1. Análise das características físico-químicas das amostras de solo

Várias propriedades químicas, físicas e biológicas podem ser usadas para caracterizar a qualidade do solo. Fatores como pH, granulometria, disponibilidade de nutrientes, afetam diretamente a produção vegetal, além de serem determinantes para a permanência de uma comunidade microbiana no solo (HE et al., 2007).

Os resultados das propriedades físico-químicas das amostras avaliadas nesse trabalho se encontram na tabela 3. Os valores encontrados para pH dos solos da área de Santa Rita do Passa Quatro não variaram entre as coletas, sendo que ambos se encaixaram na categoria solo ácido com pH variando de 5,4 a 6,5. Os menores valores de pH foram os encontrados para as amostras de solo coletadas nas áreas de cana 1 e cana 2 (5,5 e 5,4 respectivamente) enquanto em floresta 1 e floresta 2, os valores foram de 6,2 e 6,5, respectivamente caracterizando os mesmos como Levemente Ácidos (BRADY; WEIL, 1996). Para área de Mococa, os solos também foram caracterizados como ácidos, com pH variando entre 4,0 (Floresta) e 4,6 (Cana-de-açúcar).

Tabela 3: Valores das análises físico-químicas dos solos coletados nas áreas de Santa Rita do Passa Quatro (cana 1, cana 2, floresta 1, floresta 2) e nas áreas de Mococa (cana Mococa e floresta Mococa).

Amostra	pH	M.O.	P	K	Ca	Mg	Argila	Silte	Areia
	CaCl ₂	g/gm ³	mg/dm ³	mmolc/dc3			g/Kg		
Floresta 1	6.2	31	5	2.7	80	16	163	231	606
Floresta 2	6.5	29	18	2.6	100	13			
Floresta Mococa	4.0	20	6	1.6	6	4	140	158	702
Cana 1	5.5	11	4	0.6	13	14	86	95	819
Cana 2	5.4	14	4	1.2	17	16			
Cana Mococa	4.6	11	7	1.1	12	3	150	175	675

Outros estudos realizados comparando áreas de floresta, com alguma área cultivada, como o estudo de Silveira et al. (2006) utilizando solos cultivados com eucalipto, e o trabalho de Macedo (2012), os solos de floresta

apresentaram pH mais ácido. Fato este pode ser atribuído a correções do pH realizadas em áreas cultiváveis, através de processos como a calagem (cal virgem (CaO) ou cal hidratada ($\text{Ca}(\text{OH})_2$). A manutenção do pH do solo em determinados níveis, é extremamente importante para o solo, vegetação e microrganismos encontrados no mesmo.

As atividades agrícolas, principalmente o manejo inadequado do solo, podem causar um declínio no estoque de matéria orgânica do solo, alterando assim suas propriedades (CANELLAS et al., 2007). Essa matéria orgânica é constituída basicamente por dois grupos: produtos da decomposição dos resíduos orgânicos e do metabolismo microbiano; o segundo é representado pelas substâncias húmicas propriamente ditas, constituindo 85 % a 90 % da reserva total do carbono orgânico (ANDREUX, 1996).

Quanto ao teor de matéria orgânica, diferença acentuada foi observada quando se compara as amostras de solo cultivado com cana-de-açúcar com as de solo de Floresta, onde para solo de cana-de-açúcar foi observada 11g/dm^3 em cana 1 e 14g/dm^3 em cana 2. Em amostras de floresta, 31 e 29g/dm^3 respectivamente para floresta 1 e floresta 2.

Nos solos de Mococa os valores foram de 11g/dm^3 para cana-de-açúcar e 20g/dm^3 para floresta. Selle (2007) relata que grande parte desta matéria orgânica encontrada em ambientes é oriunda da degradação de produtos de origem animal e vegetal, através de agentes decompositores. Posteriormente carbono (C) pode ser liberado para a atmosfera, na forma de CO_2 ou imobilizado no solo na forma de matéria orgânica. A redução na cobertura vegetal do solo o torna mais suscetível a perder nutrientes através da lavagem ocasionada pelas chuvas (RIPOLI; RIPOLI, 2004). Dessa forma, o processo de degradação dos solos submetidos a diversos manejos constitui um grande desafio à agricultura sustentável (HE et al., 2007).

O sistema de colheita mecanizado (sem queima) favorece a permanência da matéria orgânica no solo cultivado, fato que não é observado no sistema de queima, no qual parte desta é liberada à atmosfera na forma de gases (CERRI et al., 2003). Canelas e cols (2007) observaram que o manejo em uma área por 55 anos ocasionou redução de 40% nos estoque de C do solo em relação à uma área que não sofreu queima. Além do C, observou-se redução de 35% no estoque de N da área. A diferença significativa observada

neste trabalho foi que a área de cana-de-açúcar 1, apresentou 64% menos matéria orgânica em relação a Floresta 1, enquanto na coleta 2, a diferença foi de 52% e Mococa, 45%.

Os níveis de potássio (K), fósforo (P), cálcio (Ca), enxofre (S) e magnésio (Mg) se apresentaram mais elevados nas áreas de floresta fato que está relacionado ao processo de ciclagem de nutrientes que acontece no solo destas áreas (MOTAVALLI et. al., 1995). O fósforo tem papel especial na cultura de cana, uma vez que a relação deste elemento com a produção e com a qualidade dos subprodutos da cana-de-açúcar é conhecida (SUNDARA et al., 2002). Teores de P_2O_5 maiores que 300 ppm facilitam a clarificação do caldo. O potássio possui importante ação na translocação de sacarose, e esta envolvido no processo de transporte e armazenamento desta molécula. Deficiência de K^+ pode ocasionar uma taxa fotossintética menor por fechamento dos estômatos (MALAVOLTA; HAAG, 1964 – A).

São variados os efeitos do Ca no crescimento e desenvolvimento vegetal. Atua como moderador da ação dos hormônios vegetais regulando a germinação e o crescimento, está relacionado com o geotropismo, fotossíntese e processos de divisão celular, entre outras funções, como aumento no turgor, expandindo o limbo foliar (MALAVOLTA, 2006 - B) Trabalhos de Fernandes e cols. (2010) demonstram que a adição de nitrato de cálcio em plantas de melão contribuiu significativamente para o aumento da área foliar, auxiliando a captação de luz e conseqüentemente a fotossíntese.

O Mg é constituinte da clorofila. Participa de processos vitais como fotossíntese, respiração, síntese de macromoléculas, absorção de íons principalmente o íon fosfato no qual o Mg exerce um efeito sinérgico na absorção do P, cofator enzimático iônico, na ativação de muitas enzimas e importante papel na regulação do pH celular (MALAVOLTA, 2006 – B).

Considerando a composição do solo, observamos que para a área de SRPQ, o teor de argila e silte, foram maiores para área de floresta enquanto o teor de areia foi maior nas áreas de cana-de-açúcar. No caso da área de Mococa, argila e silte foram observados em maior quantidade na área de cana-de-açúcar.

2. Análise do DNA metagenômico

A análise eletroforética em gel de agarose a 0,8% permitiu avaliar o padrão de concentração e tamanho aproximado do DNA metagenômico (FIG. 6 e 7). A relação entre as absorbâncias 260/280 nm foi utilizada como estimativa do grau de pureza do DNA. Esta relação é influenciada pelo pH e concentração de sais da solução na qual o referido ácido nucleico foi diluído. A integridade e qualidade do DNA são fatores importantes para sua análise, principalmente para os processos de clonagem e amplificação.

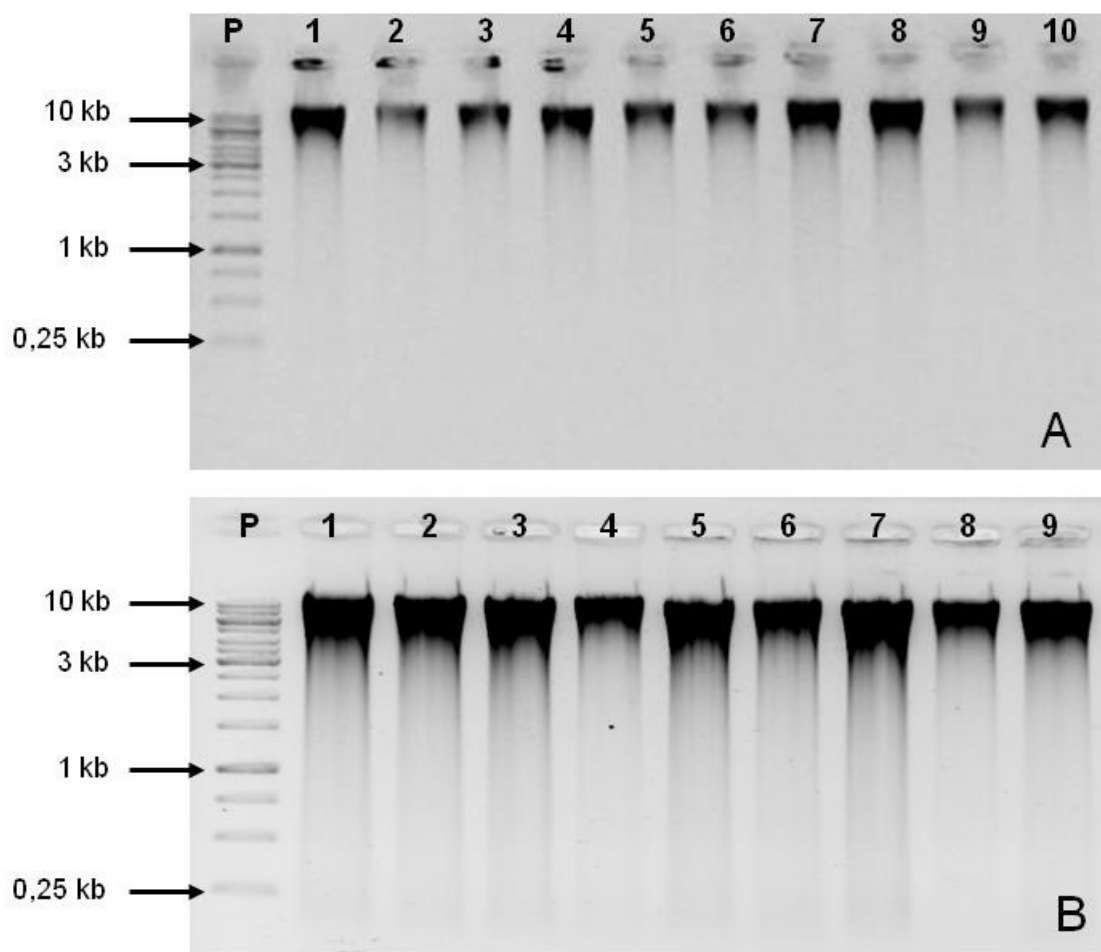


Figura 6: Perfil eletroforético do DNA metagenômico total em gel de agarose a 0,8% das amostras de solo de Floresta 1 (**A**) e Floresta 2 (**B**) extraídos com o kit FastDNA® SPIN (BIO 101) (onde, **P** – padrão de tamanho molecular 1kb DNA ladder Fermentas SM 1333 ; e os pontos de coleta: **1** – corner ; **2** – A1 ; **3** – A2 ; **4** – A3 ; **5** – B1 ; **6** – B2 ; **7** – B3 ; **8** – C1 ; **9** – C2 ; **10** – C3)

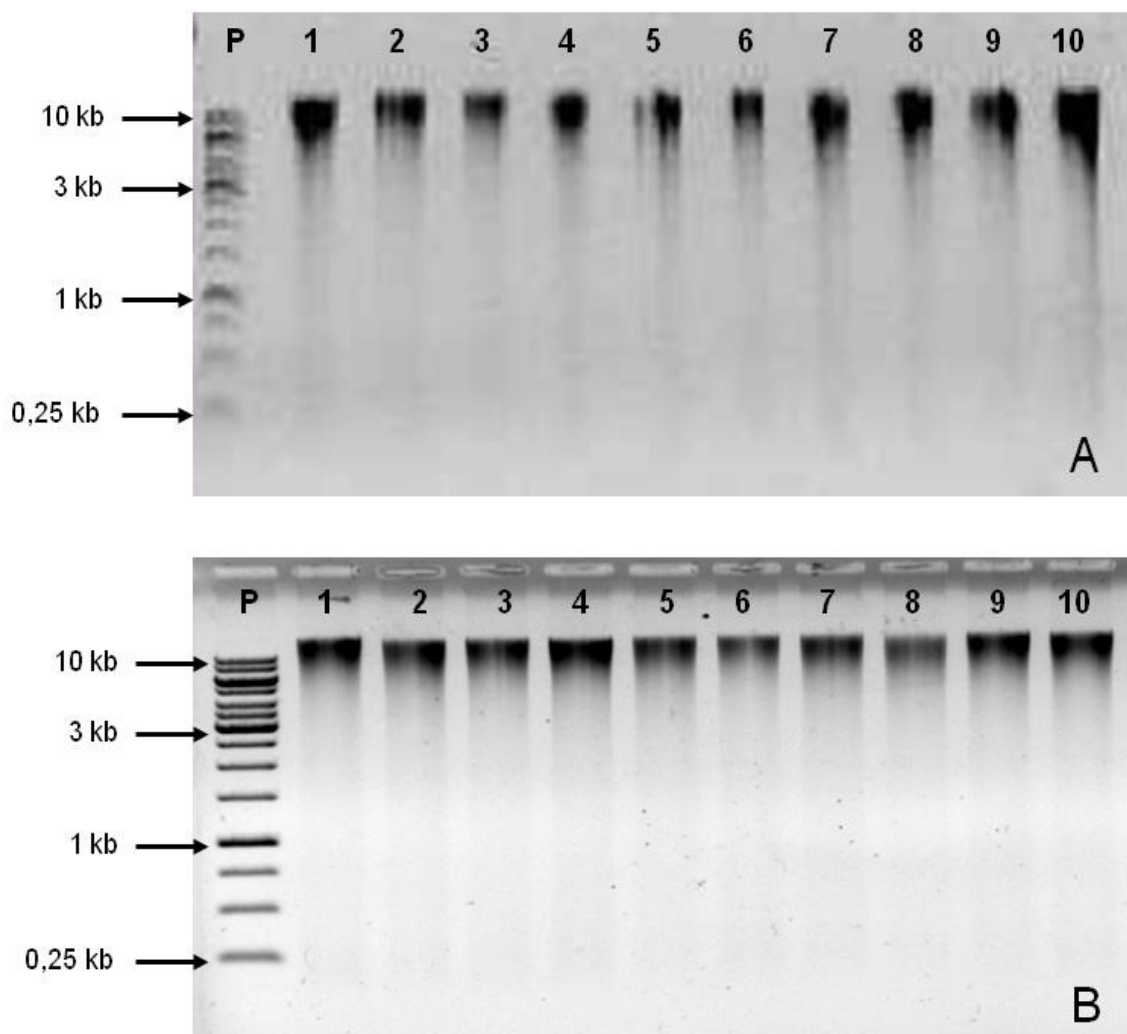


Figura 7: Perfil eletroforético do DNA metagenômico total em gel de agarose a 0,8% das amostras de solo cultivado com Cana-de-Açúcar. Cana 1 (**A**) e Cana 2 (**B**) extraídos com o kit FastDNA® SPIN (BIO 101) (onde, **P** – padrão de tamanho molecular 1kb DNA ladder Fermentas SM 1333 ; e os pontos de coleta: **1** – corner ; **2** – A1 ; **3** – A2 ; **4** – A3 ; **5** – B1 ; **6** – B2 ; **7** – B3 ; **8** – C1 ; **9** – C2 ; **10** – C3)

O rendimento médio para as extrações dos 10 pontos de cada coleta, foi entre 140 e 150 ng/μl para cana 1, cana 2 e floresta 1, entretanto, para floresta 2, o rendimento médio foi de aproximadamente 280 ng/μl. Os valores para cada ponto isoladamente se encontram plotados na tabela 4. Quanto à estimativa de pureza definida pela razão das absorbâncias 260/280 nm, verificou-se que as amostras das áreas de cana-de-açúcar, eram mais baixas que as das áreas de florestas. Esta razão é influenciada como já citado por diversas variáveis, entre elas pH, acúmulo de substâncias como ácidos húmicos, entre outras que podem ter sido co-extraídas, influenciando a

qualidade final do mesmo. Os ácidos húmicos possuem a capacidade de inibir a atividade da Taq DNA polimerase, enzima responsável pela amplificação em cadeia do DNA na técnica de PCR. Desta forma, o DNA extraído precisa ser purificado para remoção destes inibidores (COUTINHO et al., 1999).

Tabela 4: Rendimento médio de DNA metagenômico total obtido das diferentes amostras de solo, bem como a relação de absorbâncias 260/280 nm.

Quantificação DNA Metagenômico do solo - Coleta 01 e Coleta 02 (nanodrop)						
Amostra	[] ng/ul	260/280		Amostra	[] ng/ul	260/280
Ca Co - 1	160.2	1.37		Ca Co - 2	170.4	1.50
Ca A1 - 1	169.0	1.39		Ca A1 - 2	129.2	1.43
Ca A2 - 1	124.3	1.35		Ca A2 - 2	104.7	1.43
Ca A3 - 1	126.2	1.43		Ca A3 - 2	148.0	1.36
Ca B1 - 1	127.6	1.33		Ca B1 - 2	141.2	1.45
Ca B2 - 1	210.1	1.30		Ca B2 - 2	136.3	1.44
Ca B3 - 1	84.9	1.43		Ca B3 - 2	119.6	1.44
Ca C1 - 1	218.0	1.32		Ca C1 - 2	160.0	1.42
Ca C2 - 1	159.2	1.33		Ca C2 - 2	83.6	1.32
Ca C3 - 1	113.4	1.45		Ca C3 - 2	211.6	1.37
Fl Co - 1	205.3	1.84		Fl Co - 2	249.4	1.71
Fl A1 - 1	149.4	1.76		Fl A1 - 2	147.6	1.56
Fl A2 - 1	99.1	1.84		Fl A2 - 2	131.4	1.63
Fl A3 - 1	135.9	1.86		Fl A3 - 2	244.8	1.61
Fl B1 - 1	108.9	1.81		Fl B1 - 2	370.9	1.58
Fl B2 - 1	131.4	1.83		Fl B2 - 2	469.9	1.69
Fl B3 - 1	165.3	1.82		Fl B3 - 2	350.6	1.77
Fl C1 - 1	155.3	1.84		Fl C1 - 2	186.0	1.73
Fl C2 - 1	113.1	1.76		Fl C2 - 2	218.1	1.49
Fl C3 - 1	130.7	1.68		Fl C3 - 2	432.5	1.54

Ca: Área de cana-de-açúcar; Fl: Área de floresta; 1 e 2: Coleta 1 e Coleta 2.

PARTE II: Bibliotecas do gene 16S rRNA do DNA metagenômico do Solo

1. Amplificação e Clonagem dos Fragmentos 16S rDNA

Após a amplificação do fragmento 16 rDNA do material metagenômico, como acima descrito, foi observado um fragmento contendo aproximadamente 1500 pb, condizente com o tamanho molecular do mesmo que é de 1492 pb e algumas bandas inespecíficas (Fig. 8). As amostras nesse momento foram misturadas formando um “pool” de fragmentos amplificados para cada coleta e

assim, procedeu-se a purificação do mesmo através de eletroforese preparativa em gel de baixo ponto de fusão, obtendo uma banda única.

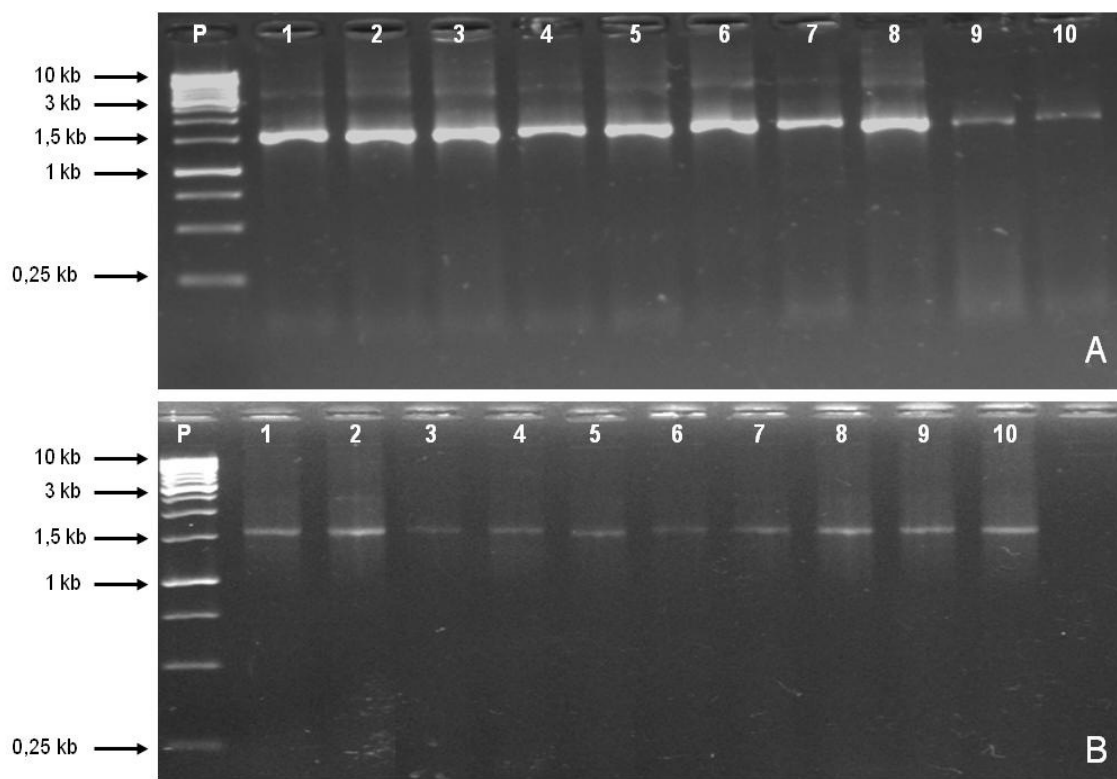


Figura 8: Perfil eletroforético dos fragmentos do gene 16S do DNA metagenômico em gel de agarose a 1,0 % das amostras de solo em Floresta (A) e Cana (B) extraídos com o kit FastDNA® SPIN (BIO 101) (onde, **P** – padrão de tamanho molecular 1kb DNA ladder Fermentas SM 1333 ; e os pontos de coleta: **1** – corner ; **2** – A1 ; **3** – A2 ; **4** – A3 ; **5** – B1; **6** – B2 ; **7** – B3 ; **8** – C1 ; **9** – C2 ; **10** – C3)

2. Clonagem e validação das bibliotecas do gene16S

As amostras purificadas foram clonadas em vetor pGEM®-T Easy Vector e foram obtidos por “pool” aproximadamente 200 clones para cada uma das em 4 bibliotecas.

A extração de DNA plasmidial e o perfil eletroforético de algumas placas estão ilustrados nas figuras 9 e 10.



Figura 9: Perfil eletroforético do DNA plasmidial dos clones obtidos em gel de agarose a 0,8 % das amostras de solo de Floresta 1.

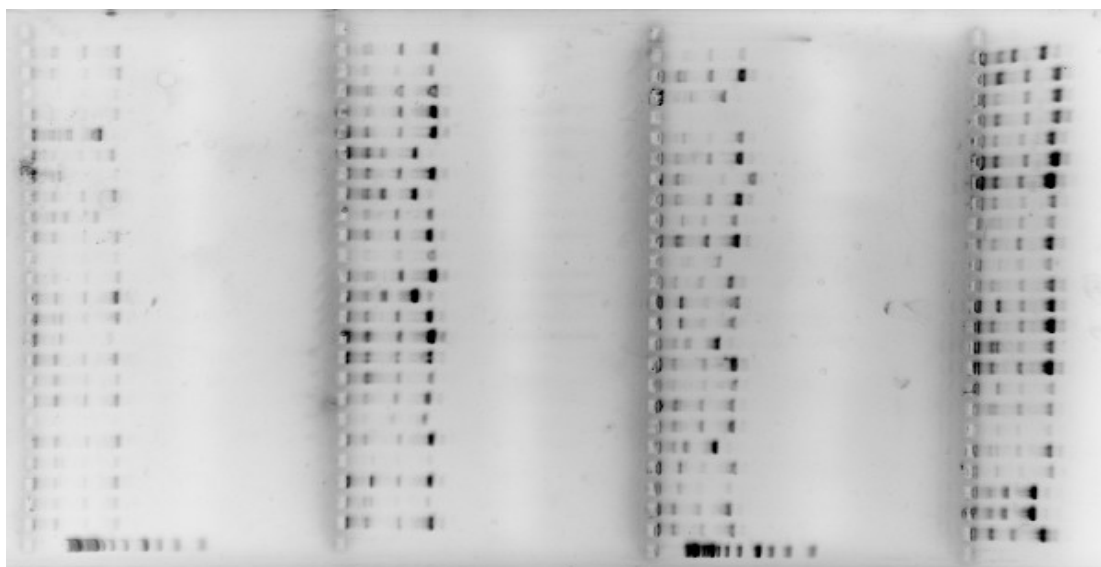


Figura 10: Perfil eletroforético do DNA plasmidial dos clones obtidos em gel de agarose a 0,8 % das amostras de solo de Cana 1.

3. Análise das bibliotecas de fragmentos 16S rDNA do DNA metagenômico do solo

3.1. Análise da diversidade bacteriana nos solos

3.1.1 Análise individual pelo banco NCBI

Através da análise individual das sequências dos clones obtidos para cada biblioteca através do NCBI (banco de sequências 16S), observou-se as sequências relacionadas aos filos em amostras de floresta, tanto na área de floresta 1, quanto na área de floresta 2 a predominância foi do Filo Proteobacteria, subdivisão Deltaproteobacteria, seguidos de Alphaproteobacteria, Acidobacteria e Firmicutes. Este fato permite aferir que, independente da época de coleta, a composição microbiana do solo permaneceu inalterada, tendo a predominância sempre dos mesmos grupos, sugerindo que a área em estudo se encontra em equilíbrio em relação à microbiota (Fig. 11).

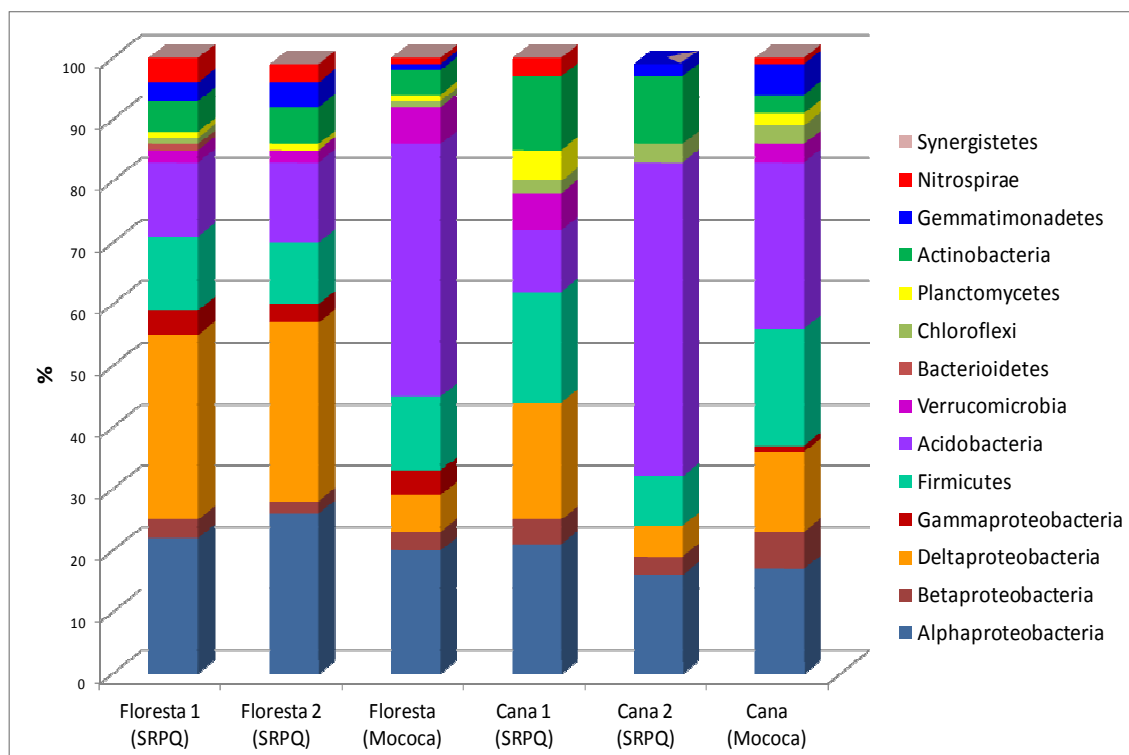


Figura 11: Composição dos filos encontrados nas amostras de floresta (1,2 e Mococa) e cana-de-açúcar (1, 2 e Mococa) através da comparação com NCBI baseado em sequências parciais de 16S RNA bacteriano.

Entretanto, quando a área de floresta de Santa Rita do Passa Quatro foi comparada com a área floresta de Mococa, a situação é totalmente modificada, uma vez que as análises para esta segunda área, identificou o grupo das Acidobacteria como predominante, seguido por sua vez por Alphaproteobacteria e Firmicutes, o que pode ser atribuído às diferenças físico-químicas.

Estudos de Bruce et al. (2010) para áreas de Floresta, revelaram que as sequencias para Acidobacteria podem variar de 29 a 54% e para Proteobacteria de 16 a 38%, o que corrobora os dados encontrados para Mococa. Dunbar et al. (2002) sugere ainda uma variação de Acidobacteria de 20% a 60% dependendo das condições do solo. Tal variação em escala tão grandiosa poderia explicar as diferenças encontradas neste estudo.

Nas amostras das áreas de cana-de-açúcar, o maior número de sequencias encontradas na área de cana 1 pertenceu ao filo Proteobacteria, mais especificamente à subdivisão Alphaproteobacteria, seguido da subdivisão Deltaproteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Acidobacteria (Fig. 11). Entretanto, para a segunda coleta (cana 2), as Acidobacteria predominaram com 51% de todas as sequencias obtidas, seguido por Alphaproteobacteria e Actinobacteria. A análise comparativa das sequencias obtidas na área de Mococa revelou que a maioria delas apresentou similaridade com Acidobacteria, Firmicutes, Alphaproteobacteria e Deltaproteobacteria.

A maior concentração de espécies bacterianas existentes está principalmente nos filos Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria, os quais podem responder por mais de 90% das espécies conhecidas (NUNES, 2006). Por outro lado, existem filos bacterianos com exemplares raros e pouquíssimos representantes.

O filo Proteobacteria é o maior e mais diverso grupo de bactérias, sendo extremamente diverso morfológica e metabolicamente sendo subdividido em 5 grupos: Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria e Gammaproteobacteria. Os seus representantes são comumente encontrados em solos cultivados e é de grande importância no ciclo global do nitrogênio (Alphaproteobacteria principalmente), no ciclo do enxofre (Deltaproteobacteria) (NUSSLEIN; TIEDJE, 1999). As Deltaproteobacterias apresentam alguns representantes com capacidade predatória que exerce sobre outros microrganismos, sendo capaz de liberar macromoléculas como algumas exoenzimas, por exemplo, proteases, lipases, nucleases, glucanases, estas todas de interesse biotecnológico (THOMAS et al., 2008). Este filo foi encontrado em todas as amostras analisadas.

Variações na frequência de aparecimento destes grupos podem ser observadas ao longo do ano, e são ocasionadas por diferenças em fatores

abióticos do solo como temperatura e umidade (BOSSIO et al., 1998). O clima tropical encontrado no Brasil está sujeito a várias alterações climática ao longo do ano e assim, podem interferir na composição da comunidade bacteriana em determinadas épocas (VAL-MORAES, 2008).

A utilização do solo por meio da agricultura pode alterar drasticamente suas características, influenciando diretamente a comunidade microbiana, sendo que a mesma deve se adaptar a tais mudanças na composição, fato este determinante para a permanência de uma comunidade no ambiente (VAL-MORAES, 2008). As alterações ocorreram em função das épocas em que ocorreram as avaliações e podem estar relacionadas às características biológicas particulares desses microrganismos associadas às condições químicas e físicas do solo (BERNARDES; SANTOS, 2006).

A abundância de indivíduos do grupo Acidobacteria em Cana 2 corrobora os dados obtidos por Macedo et al.(2012). O filo Acidobacteria, apresenta representantes amplamente distribuídos em amostras ambientais. Apesar de sua ampla distribuição, Kielak e cols (2009) ressaltaram que nos solos, o conhecimento sobre sua distribuição, função e diversidade ainda carecem de informações. Dini-Andreote et al. (2010) em trabalhos com solo cultivado com cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, também observaram que estes grupos bacterianos foram os mais abundantes, o que se encaixa com os resultados encontrados neste trabalho.

Foram encontrados indivíduos do filo Firmicutes em todas as amostras analisadas, especialmente nas áreas de cana 1 e cana Mococa. São conhecidos indivíduos aeróbicos e anaeróbicos, com capacidade de crescimento quando as fontes nutricionais estão abundantes, e de formar esporos em momentos de escassez (ATLAS; BARTHA, 1997). Neste grupo encontram-se os gêneros *Bacillus* e *Clostridium*.

Em todas as amostras, Actinobactérias também foram encontradas. Estas são bactérias Gram-positivas, com alto conteúdo de citosina e guanina (C+G) (VENTURA et al., 2007). São degradadoras da matéria orgânica como celulose, lignina e quitina, gerando biomassa protéica ou mesmo servindo como alimento para outros organismos (GAVA et al., 2002).

As Actinobactérias têm sido exploradas com relação à produção de diversas substâncias de aplicação farmacológica e industrial, incluindo

enzimas, inibidores enzimáticos e agentes imunomoduladores (NEVES; GAVA, 2008). Essa capacidade de inibir o crescimento de outros microrganismos, muitos deles patogênicos, pode favorecer os vegetais tornando-se agentes “protetores” da rizosfera contra a ação de agentes patogênicos (VASCONCELLOS, 2008).

3.1.2. Comparação das sequencias de diferentes bibliotecas no RDP

II

A segunda abordagem de análise, que utilizou o banco de dados RDP II para comparação das sequencias obtidas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA em diferentes amostras, mostrou que as frequências dos filos encontrados permaneceram as mesmas em cada área estudada. Entretanto, observou-se uma quantidade muito grande de sequencias que não foram identificadas (Fig. 12). Análises em amostras de cana 1 demonstraram que 31,7% das sequencias não foram classificadas, em área de cana 2, 27,8% e nas amostras de floresta, tanto 1 como 2, 42% de sequencias de cada área não puderam ser classificadas. No caso das sequencias obtidas para a área de Mococa, 9,7% delas não foram classificadas em cana e 15,5% em floresta. Nota-se claramente a diferença entre as áreas analisadas, sendo que Proteobacteria se sobressai para as áreas de Santa Rita do Passa Quatro, enquanto na área de Mococa o filo predominante foi Acidobacteria.

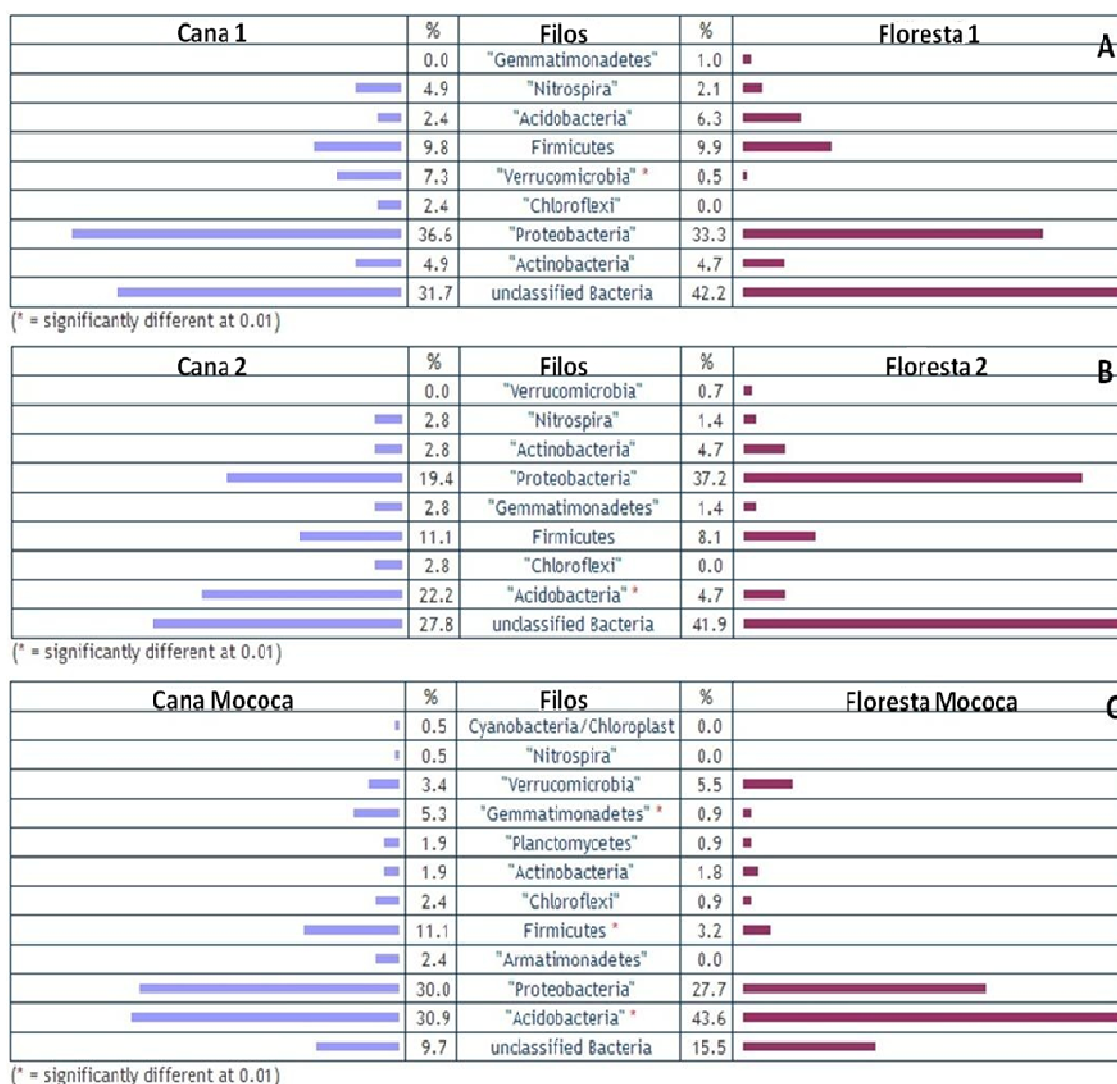


Figura 12: Diversidade bacteriana nos clones 16S rRNA com base na afiliação filogenética do RDP II – ferramenta Library Compare. **A** – Cana 1 x Floresta 1 ; **B** – Cana 2 x Floresta 2 ; **C** – Cana Mococa x Floresta Mococa.

A figura 13 (Florestas) e figura 14 (Cana-de-açúcar) ilustram as diferenças entre os filos em comparação com a época de coleta, período chuvoso (coleta 1) e período de seca (coleta 2), assim como em áreas diferentes no mesmo período (áreas de SRPQ e Mococa)

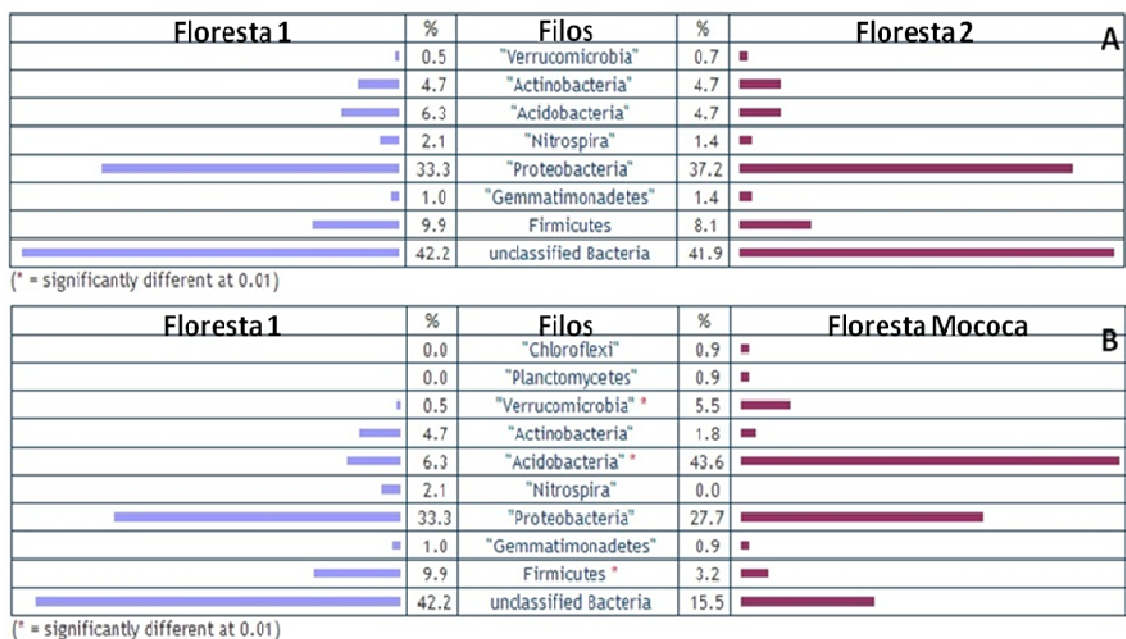


Figura 13: Diversidade bacteriana nos clones 16S rRNA com base na afiliação filogenética do RDP II – ferramenta Library Compare. **A** – Floresta 1 x Floresta 2 ; **B** – Floresta 1 x Floresta Mococa.

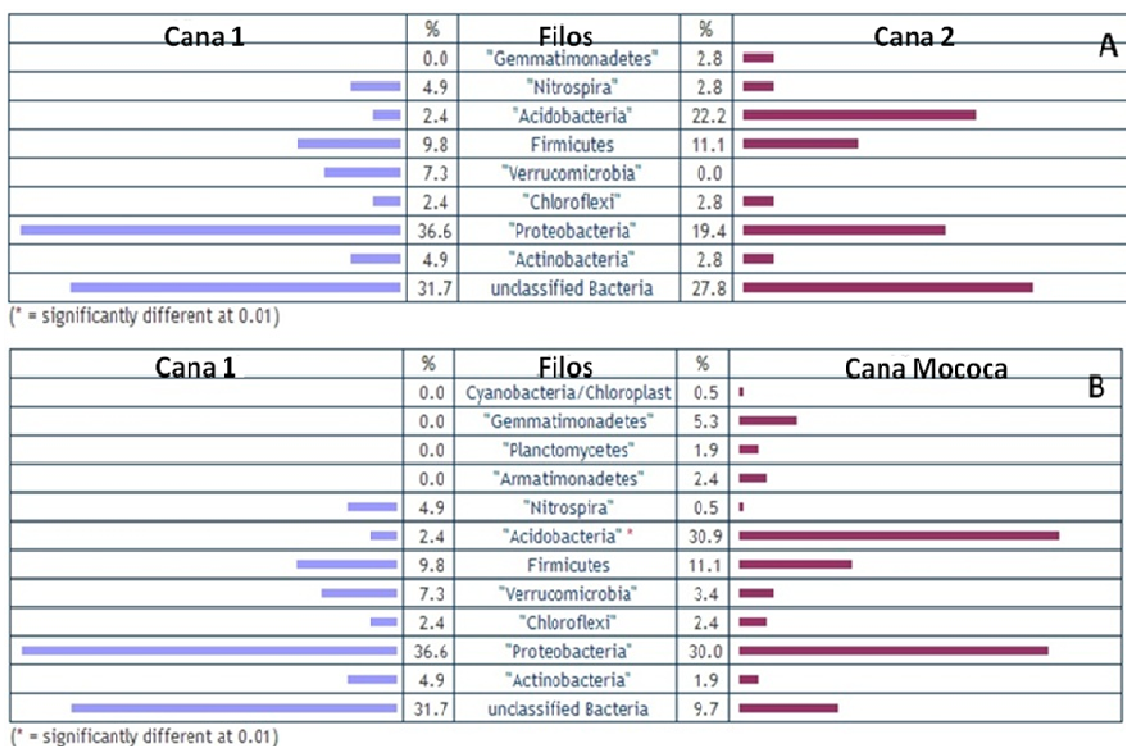


Figura 14: Diversidade bacteriana nos clones 16S rRNA com base na afiliação filogenética do RDP II – ferramenta Library Compare. **A** – Cana 1 x Cana 2 ; **B** – Cana 1 x Cana Mococa.

Como os filos Proteobacteria e Acidobacteria foram os mais expressivos em número de ocorrência, uma comparação específica para estes indivíduos foi realizada através do LIB COMPARE do banco RDP II (Fig. 15).

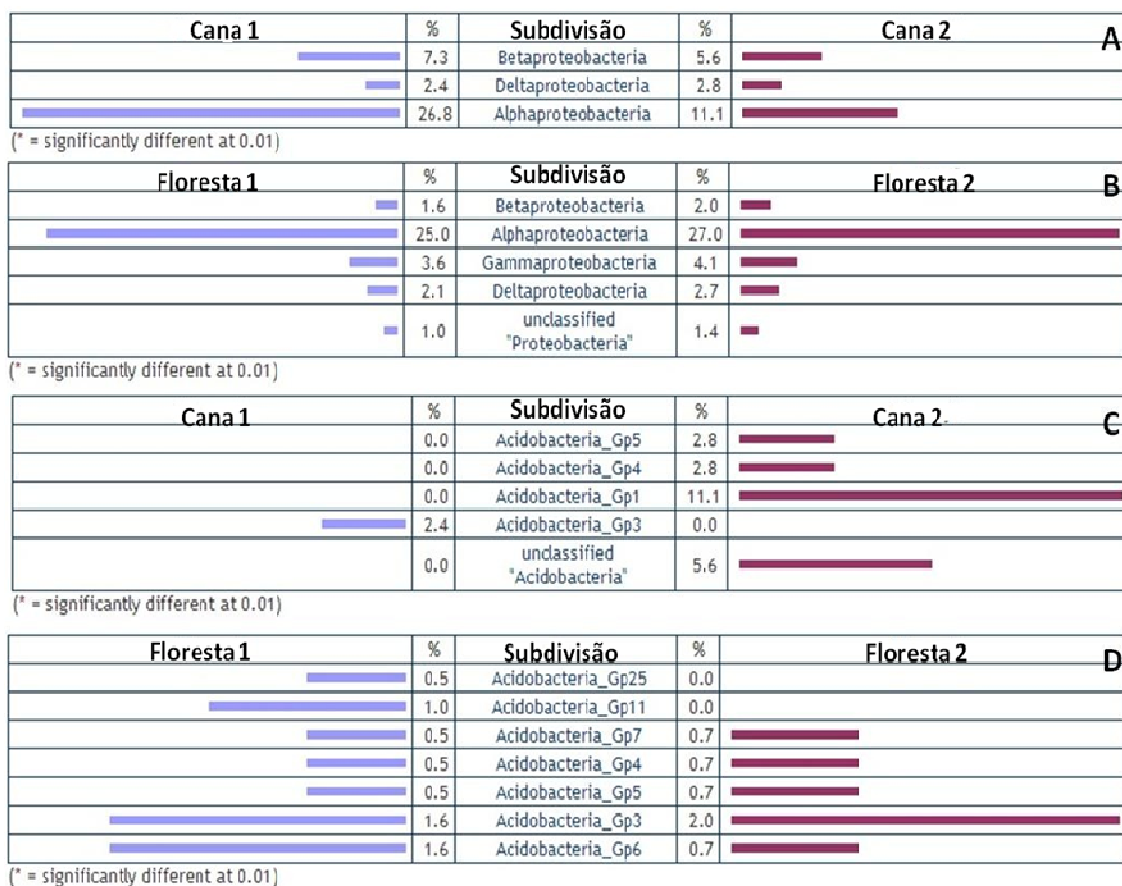


Figura 15: Diversidade bacteriana nos clones 16S rRNA com base na afiliação filogenética do RDP II – ferramenta Library Compare. **A** – Cana 1 x Cana 2 ; **B** – Floresta 1 x Floresta 2 ; **C** - Cana 1 x Cana 2 ; **D** - Floresta 1 x Floresta 2. **A** e **B** representam o filo Proteobacteria enquanto **C** e **D** representam Acidobacteria.

Foi observado que as Alphaproteobacteria foram predominantes dentro o filo Proteobacteria independente da biblioteca (cana 1 – 27%, cana 2 – 11%, floresta 1 – 25% e floresta 2 – 27%). Quanto às Acidobacteria, o subgrupo Gp3 foi predominante em Cana 1 (2,4%) enquanto em Cana 2, foi o subgrupo Gp1 (11%). Nas áreas de Floresta Gp3 foi o subgrupo com maior ocorrência.

O filo Acidobacteria possui 26 subgrupos baseados em semelhanças do gene 16S rRNA (BARNS et al., 2007). Os subgrupos Gp1, Gp2, Gp3, Gp4 e Gp6 foram encontrados em maior abundância em solos das Américas nos estudos de Jones et al. (2009). A razão C:N encontrada em um solo pode

favorecer alguns subgrupos de acidobacterias, como por exemplo, Gp4 e Gp7 são encontrados em maior frequência quando esta razão (C:N) é baixa, enquanto Gp16 quando esta razão é alta. O subgrupo Gp6 é tolerante a baixas concentrações de C e N, sendo assim, o aparecimento e predominância deste subgrupo pode ser um indicador de escassez nutricional no solo (WILL et al., 2010)

Para avaliar a relação da condição nutricional do solo e a diversidade microbiana, Smit et. al. (2001) com base em trabalhos da literatura, observaram que em solos com alto teor de nutrientes, dentre eles matéria orgânica, as proteobactérias (principalmente alpha e gammaproteobacteria) apresentaram altas taxas de ocorrência. Por outro lado, nos solos com quantidades reduzidas de nutrientes, as Acidobacterias são encontradas em frequência maior. Sendo assim, supõem-se uma relação entre Proteobacteria e Acidobacteria como indicadores da fertilidade de solos. As amostras de floresta (1 e 2) apresentaram maior quantidade de proteobacterias, enquanto as de cana (principalmente coleta 2 e cana Mococa) apresentaram uma porcentagem maior de Acidobacteria corroborando com os dados acima relatados.

O RDP utiliza como fonte de dados um banco com sequencias depositadas apenas do gene 16S rRNA de bactérias e arqueias e seu sistema de classificação taxonômica (RDP Hierarchy) segue a proposta do Manual Bergey's (Garrrity et al.,2004). Sendo assim, é um banco com número menor de sequencias que o NCBI, que analisa similaridade entre sequencias sendo um banco muito maior. Desse modo, para se fazer uma correlação entre os diferentes organismos e sua participação nos ciclos biogeoquímicos, foi utilizada a classificação feita pelo banco de genes do gene 16SrRNA que se encontra no NCBI.

3.2. Análise da atividade microbiana nos solos em relação aos ciclos biogeoquímicos

Os índices biológicos de qualidade de solo, que remete à microbiota encontrada no mesmo, podem demonstrar como estes agentes são importantes interagindo com plantas e animais, e suas relações com o clima do

ecossistema (KNOEPP et al., 2000). Sendo assim, os microrganismos atuam como indicadores biológicos.

Um indicador biológico pode ser definido como a presença ou ausência de uma determinada espécie em certa área, associada a dada condição ambiental. Uma dada espécie com ocorrência representativa em um nicho é selecionada e as alterações observadas nesta população são indícios das condições de outros componentes biológicos em um ecossistema (TURCO; BLUME, 1999).

Os microrganismos representam o grupo mais rico em diversidade bioquímica e molecular na natureza, constituindo a base de processos ecológicos, como os ciclos biogeoquímicos e a cadeia trófica, além de manterem relações vitais entre si e com os organismos superiores (HUNTER-CEVERA, 1998).

As bactérias do solo, especialmente as da rizosfera, participam de modo expressivo em diversos processos como decomposição, mineralização, fixação biológica de nitrogênio, e algumas ainda se associam com plantas e auxiliam o crescimento, como por exemplo, as bactérias promotoras de crescimento (PISA et al., 2011).

Os dados obtidos pelas sequências identificadas nos bancos NCBI e RDP, foram agrupados de acordo com o Filo/Classe a qual pertencem, e posteriormente os gêneros bacterianos encontrados foram agrupados de acordo com sua atividade/função, relacionados aos ciclos biogeoquímicos segundo dados encontrados na literatura (Tabelas 1 e 2 – Apêndice)

Muitos dos microrganismos identificados tanto em amostras de solo cultivados com cana-de-açúcar como de solos sob Floresta, foram classificados como participantes de algumas atividades biológicas ou ciclos biogeoquímicos nos solos. Entretanto, parte dos microrganismos encontrados (cana 1 – 43%, cana 2 – 17% e cana Mococa – 25% , floresta 1 – 34%, floresta 2 – 37% e floresta Mococa – 44%), não puderam ser correlacionados com nenhuma função específica no solo segundo descrição encontrada na literatura, sendo assim, a sua importância e funções ainda permanecem obscuras (Fig.16 e 17).

Considerando-se os organismos encontrados em amostras de Floresta, foi observado grande similaridade entre as proporções encontradas para cada ciclo (Fig.16) independente da área ou do mês da coleta. Pode se destacar a

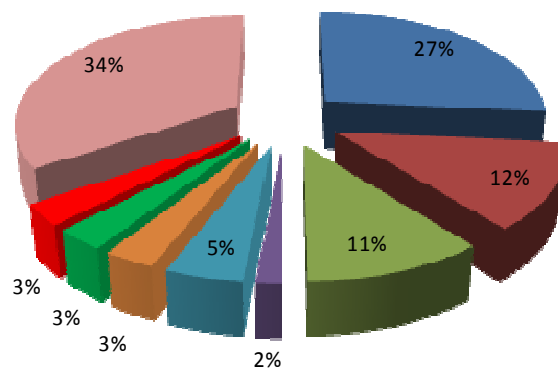
ausência de organismos relacionados ao metabolismo de P na área de floresta Mococa, entretanto os organismos incluídos na categoria “Função não relatada” podem ser responsáveis por tal atividade. O elemento fósforo é um macronutriente de grande importância, constituindo cerca de 0,2% de massa seca das plantas, sendo assim os microrganismos relacionados com este processo são essenciais para a manutenção de qualquer ecossistema.

As entradas de nutrientes em um ecossistema são devidas aos nutrientes oriundos do ar, às precipitações, à intemperização das rochas, à fixação biológica do nitrogênio e também à fertilização artificial. As saídas, por outro lado, são representadas pelas perdas por erosão, lavagens, volatilização e pela remoção de nutrientes pela colheita florestal (SELLE, 2007).

A vegetação devolve nutrientes ao solo por meio da circulação de matéria, que é representada pela deposição de serrapilheira, galhos grossos, troncos e pela morte de raízes, principalmente as finas (VOGT et al.; 1986 SELLE, 2007). Em solos com teor de M.O. elevado, a população microbiana tende a se manter mais estável ao longo do ano, provavelmente, em decorrência da riqueza de nichos ecológicos, pela heterogeneidade das fontes de carbono (DE FEDE et al., 2001).

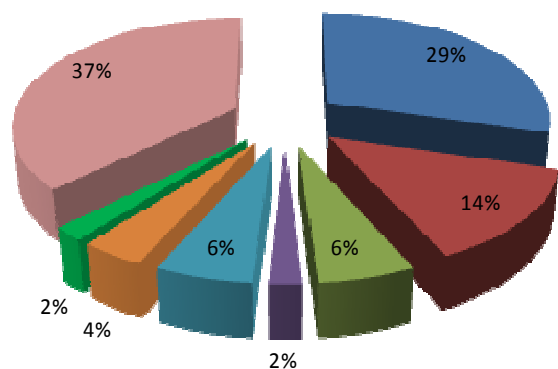
Sendo assim, atividades antrópicas, como a agricultura, podem deixar o solo suscetível à perda de nutrientes sendo necessária a suplementação artificial e como em áreas de cana-de-açúcar, por exemplo, o vegetal é removido, e não permite a decomposição da serrapilheira como acontece nos solos de floresta. Esta diferença de quantidades de nutrientes pode ser observada na análise físico-química do mesmo (Tab. 3), em que a quantidade verificada foi muito menor nos solos de cana que nos de floresta, o que permitem que esta área permaneça em equilíbrio quanto à atividade microbiana.

Floresta 1



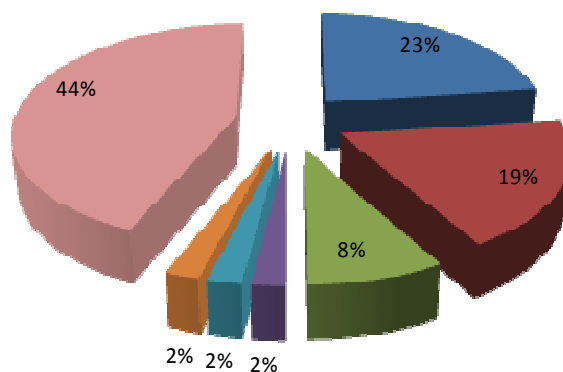
A

Floresta 2



B

Floresta Mococa



C

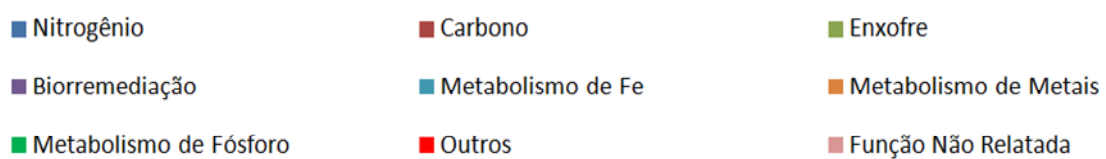


Figura 16: Porcentagem de organismos encontrados nas áreas de Floresta 1 (A), Floresta 2 (B) e Floresta Mococa (C) com função relacionada à ciclos biogeoquímicos relatados em literatura.

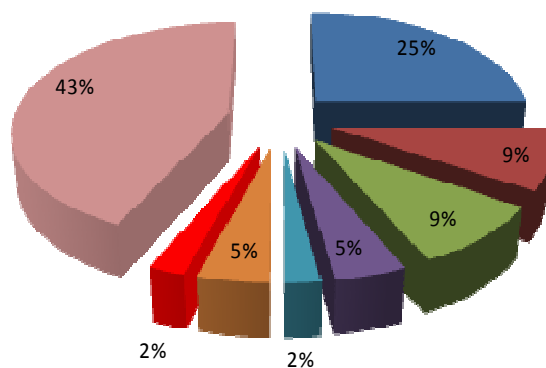
Na figura 17 encontram-se os dados da porcentagem de organismos relacionados às diversas funções biológicas nos solos sob plantio de cana-de-açúcar. Esses dados mostram que existe uma grande diferença entre os organismos estudados nas 3 amostras.

Nas amostras de Cana 1, 25% dos microrganismos encontrados estavam relacionados ao ciclo do N (fixação, nitrificação, desnitrificação, redutoras de nitrito e nitrato), 9% ao ciclo do C (incluindo degradação de matéria orgânica, metano), 9% relacionadas ao S, verificando-se ainda microrganismos relacionados com processos de biorremediação e metabolismo de metais (10%) e produção de compostos como antibióticos (2%). Proporções semelhantes foram observadas nas sequências obtidas do solo de Mococa (28% - N; 20% - C; 9% - S), mas esse solo ainda apresentou microrganismos relacionados à degradação de celulose e de poliésteres (3%) que não tinham sido relatados em outras áreas.

Por outro lado, nas amostras de solo Cana 2, foi observado que 41% dos microrganismos encontrados estavam relacionados com o ciclo do C e 12% ao do N. Este aumento das bactérias relacionadas ao ciclo do C pode ser atribuído ao manuseio do solo, no qual ocorreu a queima da palhada no ciclo anterior, disponibilizando assim, matéria orgânica em quantidades maiores, consequentemente carbono no sistema. Nesse caso, alterações no equilíbrio N e C devem ter estimulado o aparecimento diferenciado dos organismos envolvidos na ciclagem desses elementos. O restante dos organismos permanece similar a outras áreas. Há que se relatar uma mudança das épocas de coleta, em que cana 1 e Mococa foram coletadas no mês de fevereiro, considerado dentro de uma estação chuvosa, e cana 2 no mês de novembro. Assim, sugere-se que as condições do solo durante o ciclo anual em um cultivo pode ser um fator importante para o desenvolvimento de população diferente de microrganismos.

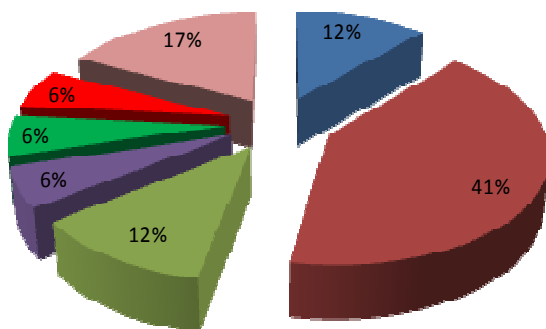
Em sistemas de cultivo, variações nas populações bacterianas podem ser detectadas ao longo das estações do ano. Estas variações estão diretamente ligadas a fatores como regime de chuvas e clima regional, estrutura e manejo do solo, ao teor e à qualidade dos resíduos vegetais disponíveis (ROGERS; Tate III, 2001; TIEDJE et al., 2001).

Cana 1



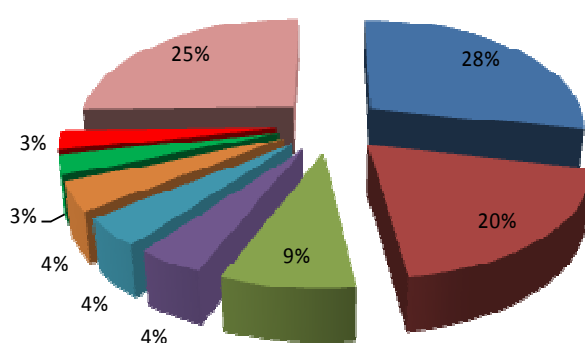
A

Cana 2



B

Cana Mococa



C

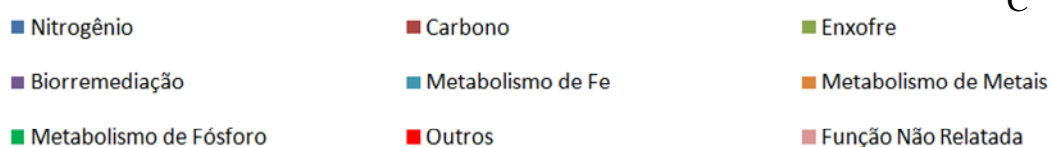


Figura 17: Porcentagem de organismos encontrados nas áreas de Cana 1 (A), Cana 2 (B) e Cana Mococa (C) com função relacionada à ciclos biogeoquímicos relatados em literatura.

Segundo Ripoli e Ripoli (2004) com a queimada da cana-de-açúcar o solo sofre um aquecimento de cerca de 160 a 200°C nas camadas superficiais, oxidando boa parte da matéria orgânica nessa camada. Este processo de oxidação pode transformar a matéria orgânica em moléculas que possam ser assimiladas de modo mais rápido nos ciclos da natureza (JARDIM; CANELA, 2004). O aumento de matéria orgânica também foi observado na análise físico-química do solo. Tal disponibilidade de compostos carbonados justificaria a presença de microrganismos relacionados a este ciclo.

Levando-se em consideração a estrutura e composição do solo, Sessitsch et al. (2001), observaram que a maioria dos microrganismos encontra-se em microagregados do solo, dependendo do tipo de adubação utilizada. Esses microhabitats oferecem condições favoráveis para o crescimento bacteriano, devido a disponibilidade de água e substrato, além de abrigo contra predação.

Os mesmos autores também observaram uma correlação entre a composição das partículas do solo e a diversidade microbiana. Foi observada uma maior diversidade nas frações silte e argila do solo e menor na fração areia. Nas frações silte e argila, houve o predomínio de bactérias da divisão *Holophaga* e *Prostheobacter*, enquanto na fração areia ocorreu o predomínio de Alphaproteobacteria. Os dados encontrados neste trabalho no qual estes organismos foram relatados nos solos estudados, corroboram com estes achados.

Seguindo os padrões no qual atua em determinadas funções (grupos funcionais), os microrganismos tendem a substituir ou compensar a ausência de um determinado membro da microbiota quando este é perdido, mantendo a continuidade dos processos biológicos (KENNEDY, 1999).

Torsvik e Øvreås (2002) relataram que o metabolismo microbiano (diversidade funcional) em uma área sem vegetação inicialmente é baixo. Entretanto, à medida que a vegetação se estabelece, a diversidade metabólica microbiana cresce rapidamente até atingir a estabilidade. A perda de elementos em um desses grupos funcionais, afeta significativamente os processos ecológicos em maior ou menor escala. Perdas significativas podem interromper até mesmo o fluxo energético do sistema uma vez que existe a participação de centenas de indivíduos durante determinado processo (PETERS et al., 2000).

A diversidade microbiana funcional tem sido estudada sob diversos pontos de vista e estratégias. Os microrganismos são um dos indicadores disponíveis mais sensíveis e a maioria é útil para classificar sistemas degradados ou contaminados, uma vez que a diversidade pode ser afetada rapidamente em função de estresses no ecossistema (MELLONI, 2007).

A utilização de substrato é considerada a chave para a sobrevivência, crescimento e competitividade de microrganismos no solo. A capacidade dos microrganismos utilizarem ou não estes substratos pode revelar a estrutura da comunidade microbiana do solo e indicar a diversidade funcional destes microrganismos.

Baseado no princípio de funcionalidade dependente do substrato, encontramos o sistema BioLog (ZAK et al., 1994; HEUER; SMALLA, 1997) que utiliza diferentes fontes de C para análise do tipo de metabolismo que grupos bacterianos exercem no solo. Uma limitação desta técnica é decorrente do fato de que os substratos encontrados comercialmente não refletem a diversidade de substratos encontrados no ambiente (KONOPKA et al., 1998).

Outra maneira de se analisar a diversidade funcional dos microrganismos do solo consiste no estudo de grupos microbianos específicos, como os fixadores de nitrogênio e os participantes no ciclo do S, entre outros, com grande potencialidade de utilização como indicadores da qualidade do solo em determinadas áreas (VISSER; PARKINSON, 1992; TURCO et al., 1994), ou ainda estudos funcionais através das atividades enzimáticas específicas. Estas exercem papel fundamental na sustentabilidade de ecossistemas, atuando na catalise de reações necessárias para decomposição de resíduos, ciclagem dos nutrientes, formação de matéria orgânica entre outros (CARNEIRO, 2000).

Estratégias moleculares têm se mostrado eficientes no monitoramento funcional de comunidade microbianas, sendo a técnica de microarranjo uma delas. Aplicações no monitoramento microbiano em diversos ambientes já são usadas, como as aplicadas a organismos diazotróficos (JENKINS, et al., 2004), metanotróficos (STRALIS-PAVESE, et al., 2004), biodegradadores de poluentes (BONCH-OSMOLOVSKAYA et al., 2003) e comunidades que oxidam amônia (ADAMCZYK, et al., 2003).

Neste trabalho utilizamos uma prática de designação de atividades através de um estudo “in silico” baseada em busca literária (artigos científicos, livros, comunicados técnicos) comparando as sequencias encontradas nas bibliotecas de DNA.

A maioria dos estudos moleculares é baseada no DNA de origem ambiental, entretanto este não reflete fielmente o funcionamento da comunidade microbiana do solo. Por isso a análise de RNAm (metatranscriptômica) seria o caminho ideal para um melhor entendimento do papel de cada organismo, oferecendo uma relação entre a expressão de determinado gene e a composição da microbiota local (URISH et al., 2008).

Os efeitos de práticas agrícolas como cultivo, rotação de culturas, fertilização e irrigação em atributos físicos e químicos do solo são bem documentados. No entanto, pouco é estudado sobre as alterações na microbiota do solo, suas atividades bioquímicas e o impacto destas na produtividade e sustentabilidade de sistemas.

Sendo largamente responsáveis pelas transformações dos elementos no solo, os microrganismos são indicadores eficientes em diversos ecossistemas, principalmente se sua diversidade estiver associada a outros fatores como atributos físico-químicos nos solos (MELLONI, 2007).

PARTE III: Análise da diversidade bacteriana baseada em sequenciamento de nova geração (NGS) da região Vi do gene 16S rRNA do DNA metagenômico do solo

1. Amplificação dos fragmentos Vi do 16S rDNA

Após a amplificação do fragmento Vi do gene 16 rDNA do material metagenômico, como anteriormente descrito, foi observado um fragmento contendo aproximadamente 300 pb, condizente com o tamanho molecular do mesmo e algumas bandas inespecíficas (Fig. 18). As amostras nesse momento foram misturadas formando um “pool” de fragmentos amplificados para cada coleta e assim, procedeu-se com a purificação do mesmo através de eletroforese preparativa em gel de baixo ponto de fusão, obtendo uma banda única (Fig. 19)

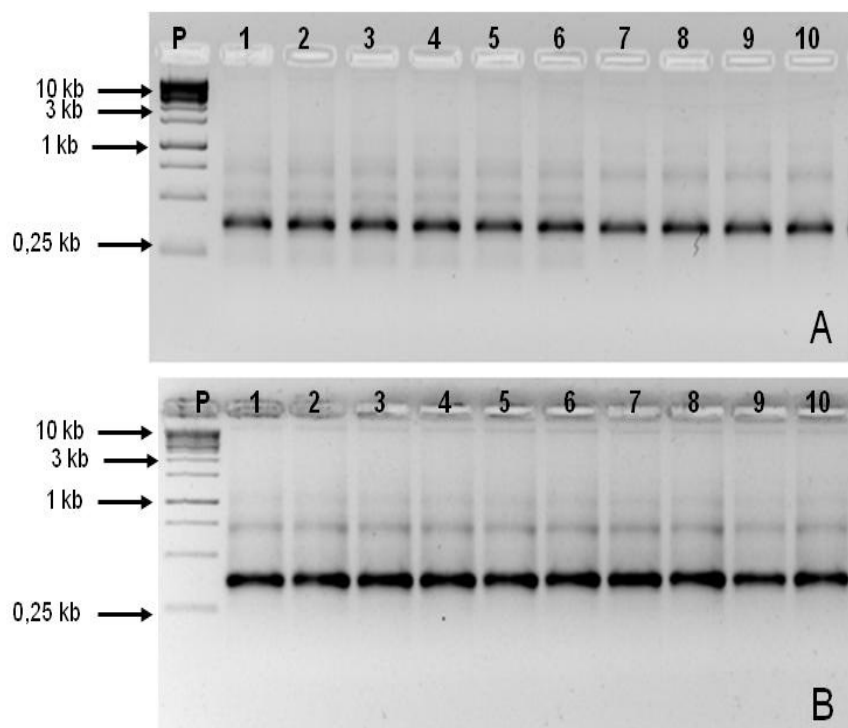


Figura 18: Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,0 % dos fragmentos da região Vi do gene 16S rRNA gerado a partir do DNA metagenômico das 10 amostras de solo Floresta 2 (A) e Cana 2 (B); **P** – padrão de tamanho molecular 1kb DNA ladder Fermentas SM 1333.

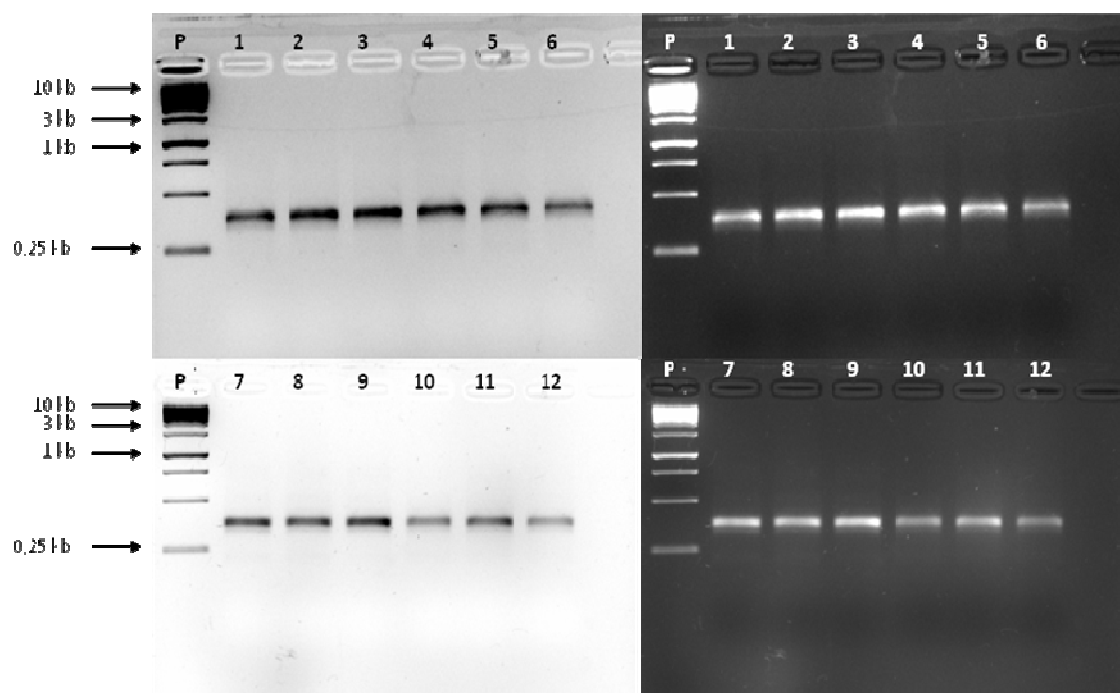


Figura 19: Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,0 % dos fragmentos da região Vi do gene 16S rRNA gerado a partir do DNA metagenômico das amostras de solo Floresta 1 (canaletas de 1 a 3), Floresta 2 (canaletas de 4 a 6), Cana 1 (canaletas de 7 a 9) e Cana 2 (canaletas de 10 a 12); **P** – padrão de tamanho molecular 1kb DNA ladder Fermentas SM 1333.

2. Validação das bibliotecas

Uma vez ligados os adaptadores nas extremidades dos fragmentos Vi, purificados via eletroforese preparativa e amplificadas por PCR de enriquecimento, as bibliotecas foram validadas através do sistema Bioanalyzer. Os eletroferogramas (Fig. 20) indicaram que os fragmentos gerados se encontravam dentro da faixa compatível de tamanho molecular, apresentando além do número de bases do fragmento, as bases dos adaptadores. Sendo assim, cada biblioteca foi considerada validada.

Além dos eletroferogramas, o sistema ainda apresenta um gel de eletroforese gerado virtualmente como ilustrado na figura abaixo. Assim, é possível observar a integridade do material através de dois parâmetros: 1) eletroferogramas e 2) gel com perfis das bandas do material genético analisado.

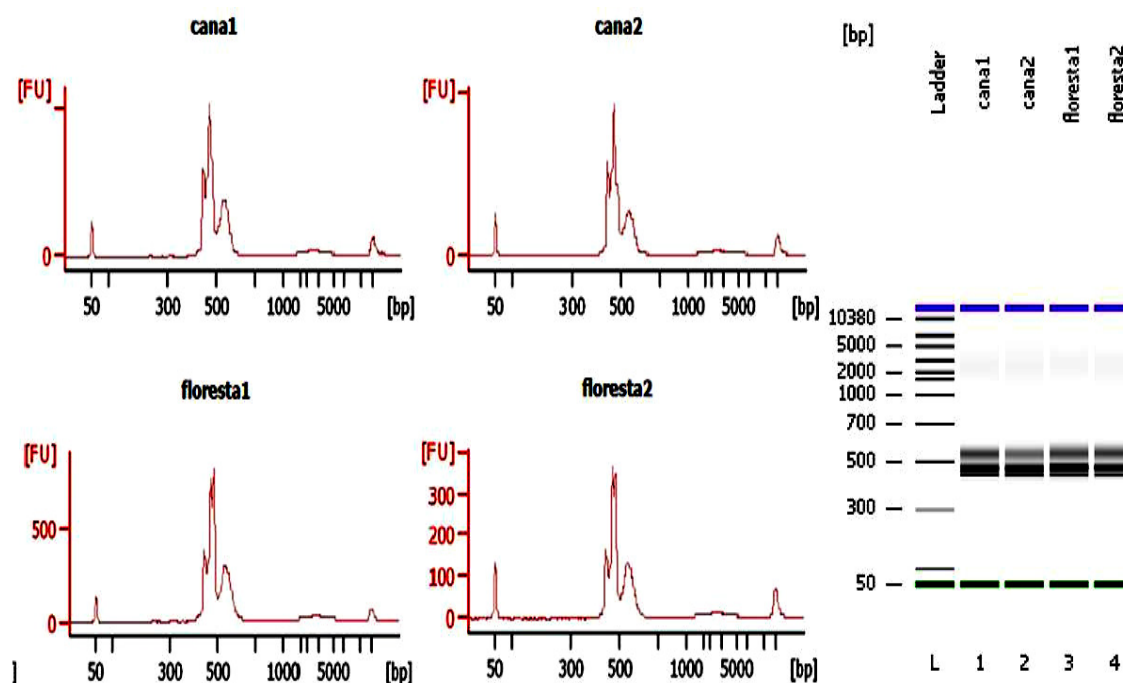


Figura 20: Análise das bibliotecas de Cana-de-açúcar (1 e 2) e de Floresta (1 e 2) através do sistema de eletroforese capilar Bioanalyzer® Agilent Technologies 2100, ilustrando os eletroferogramas e o gel com o bandeamento das bibliotecas. Detecção através do kit High Sensitivity DNA chip (Agilent® - Catálogo nº G2938-90321).

3. Análise das comunidades bacterianas dos solos baseadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs)

Aproximadamente 91 milhões de sequências do fragmento Vi com 100 pb cada foram obtidas através do sequenciamento anteriormente descrito, destas 30 milhões pertencentes a cana 1, 16 milhões a cana 2, 29 milhões floresta 1 e 16 milhões a área de floresta 2. O software MOTHUR foi utilizado para a análise das sequências das quatro bibliotecas (cana 1 e 2; floresta 1 e 2) a fim de estimar a quantidade de sequências necessárias para se atingir a estabilidade em número de Unidades Taxonômicas Operacionais (Fig. 21), além da utilização das mesmas para geração de alguns índices para estimativa de riqueza e diversidade (Tab. 5)

As análises pelo software MOTHUR foram realizadas considerando-se uma distância evolutiva de 0,05 para estimativa de gêneros. Geralmente estes dados (estimativa de diversidade e estrutura de comunidades) são analisadas em função da ocorrência de OTUs (SCHLOSS et al., 2009).

A partir da estimativa em OTUs fornecida pelo software MOTHUR, esses dados foram utilizados para a construção da curva de rarefação com 5% de distância evolutiva para determinação de diferentes táxons representativos de gênero com base nas sequências encontradas de cada área.

A forma de uma curva de rarefação indica se a amostragem utilizada foi suficiente para abranger a diversidade total de uma determinada comunidade (ROESCH et al., 2007). Esta metodologia tem sido extensamente utilizada e considerada uma medida eficaz dos índices de diversidade. Entretanto, é uma estratégia dependente do tamanho da amostra (HUGHES et al., 2001).

Foi observado através da análise de rarefação (Fig. 21), que foram necessárias aproximadamente 85,600 sequências para alcançar uma diversidade de ~11,000 OTUs em nível de gênero (azul) para amostra de cana 1. O número de OTUs distintas observadas para cana 2 (rosa) foi de aproximadamente 3,500 a partir de 32,800 sequências. Para floresta 1 e 2, foram encontradas aproximadamente 1,700 e 1,500 OTUs a partir de 19,700 e 16,000 sequências respectivamente (amarelo e ciano).

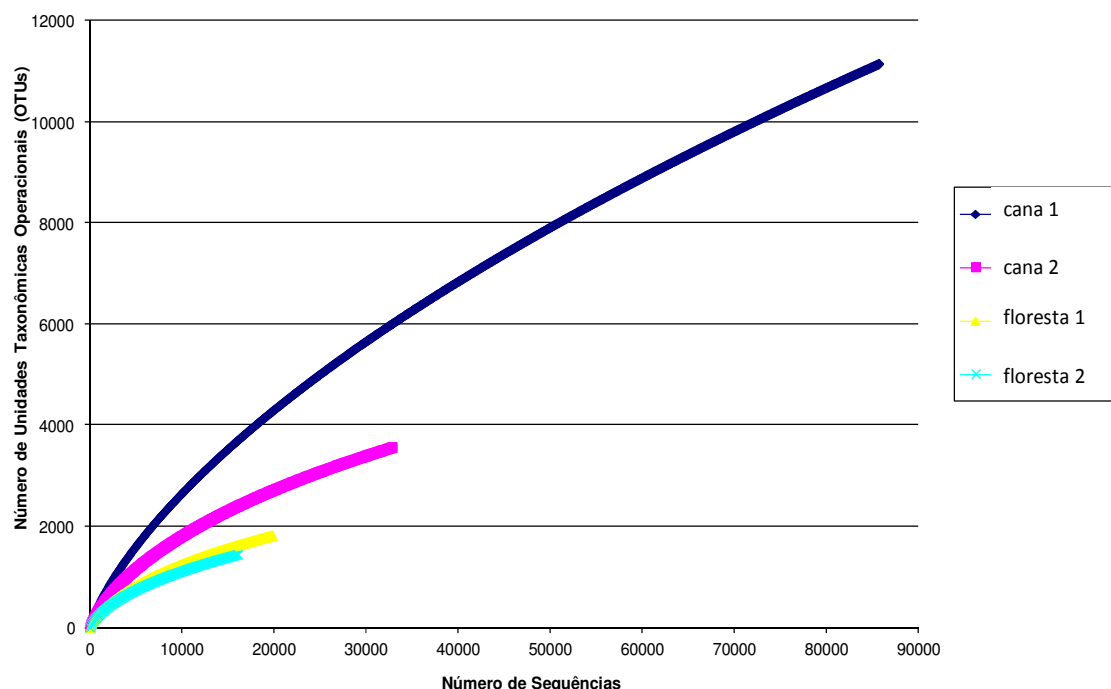


Figura 21: Curvas de rarefação calculada com distância evolutiva de 0.05 (5%) para gênero a partir das sequências obtidas através do sequenciamento do fragmento Vi do gene 16S rRNA.

Acosta-Martínez et al. (2008) postularam que em solos manejados o número máximo de OTUs a uma distancia genética de 3% deve ser no máximo de 3,400. Por outro lado, trabalhos de Will et al. (2010) encontraram em solos de pastagens até 6,230 OTUs. Diversos estudos tem relacionado o número de sequencias analisadas versus o número de OTUs encontradas. Um destes estudos de Roesch et al. (2007) analisando a comunidade bacteriana de solos de floresta no Canadá, observaram que utilizando 53,000 sequencias, encontraram 5,500 OTUs, entretanto quando foi reduzido o número de sequencias para 30,000 foram relatadas apenas 3,500 OTUs. Permitindo assim aferir, que o número de sequencias estudadas está diretamente relacionado com o número de OTUs na amostra.

Além da riqueza de OTUs observadas na curva de rarefação, os métodos de estimativa *ACE* (CHAO; MA; YANG, 1993) *CHAO1* (CHAO, 1984 e 1987), foram aplicados e podem ser observados na Tabela 5. Estas estimativas variam de acordo com o número de sequencias empregado na análise. Enquanto os índices ACE e Chao1 estimam a riqueza de OTUs em uma

amostra, os índices de Shannon-Wiener e de Simpson, observam a heterogeneidade da população microbiana em dada amostra.

Tabela 5: Riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais e índices de diversidade calculados a partir das sequências Vi do 16S rRNA.

GT	IS	Amostra	nº seq.	Estimativas de Riqueza de OTUs		Índices de Diversidade	
				ACE	Chao1	Simpson	Shannon
Espécie	0,05	Cana 1	85.665	44.019	27.179	0.013	6.45
		Cana 2	32.811	8.910	6.579	0.020	5.61
		Floresta 1	19.796	4.541	3.419	0.037	4.78
		Floresta 2	16.048	3.843	2.674	0.046	4.50

GT – Grupo Taxonômico ; **IS** – Índice de Similaridade para estimar ; **nº seq.** – Número de sequências.

No índice de riqueza de espécies ACE as sequências são agrupadas em raras e abundantes de acordo com sua frequência de observação. Segundo o estimador ACE, se uma OTU apresenta a ocorrência de mais de 10 sequências do mesmo organismo, este então é considerado abundante (HUGHES et al., 2001). O índice de CHAO1 usa o número de UTOs para estimar o número de espécies faltantes (CHAO, 1984).

Sendo assim, considerando as OTUs esperadas com a análise dos nossos dados, as estimativas de riquezas ACE e Chao1 (TAB. 5) foram maiores quando analisadas com o índice de similaridade a 0,05, determinando espécies.

O índice de Shannon-Wiener indica a diversidade de uma comunidade baseada em sua distribuição em dada amostra e no número de espécies encontradas na mesma. Assim, quanto maior o índice, maior o número de espécies retratadas. Por outro lado, o índice Simpson quanto mais próximo de zero o valor, maior a diversidade em dada amostra.

Trabalhos de Engelbrektson et al. (2010) relatam uma relação entre o tamanho do amplicon e a região do gene 16S rRNA utilizado podem influenciar diretamente a estimativas de riqueza e diversidade de uma amostra.

4. Análise da diversidade bacteriana nos solos através do RDP-II

Pela análise das sequências obtidas pelo sequenciamento para cada biblioteca através do software Mothur, posteriormente identificadas em

comparação com o banco de dados do RDP - II, aproximadamente 22,000 sequências únicas obtidas de uma amostra composta com sequências das quatro bibliotecas (cana 1 e 2 e floresta 1 e 2) foram analisadas e relacionadas aos filos. Em amostras de floresta foi observado que tanto em floresta 1, quanto em floresta 2 a predominância foi do Filo Proteobacteria, seguidos de Actinobacteria, Acidobacteria e Firmicutes.

Observa-se novamente, que independente da época de coleta, a composição microbiana do solo permaneceu inalterada, tendo a predominância sempre dos mesmos grupos, sugerindo que as populações bacterianas desta área de estudo encontram-se em equilíbrio (Fig. 22). Também foi observado que aproximadamente 50% das sequências não puderam ser classificadas.

Alocados na categoria “outros” representando 1% em amostras de cana e 2% em amostras de floresta, foram relatados representantes dos grupos: Armatimonadetes, Chloroflexi, Gemmatimonadetes, Nitrospirae e Planctomycetes.

Nas amostras das áreas de cana-de-açúcar, o maior número de sequências encontradas em cana 1 e 2 pertencem ao filo Proteobacteria, seguido de Firmicutes, Actinobacteria e Acidobacteria (Fig. 22) seguindo padrão similar ao encontrado para áreas de floresta. Estes mesmos filos bacterianos já haviam sido relatados quando a análise da diversidade foi estudada através do sequenciamento de bibliotecas 16S com a técnica de Sanger (Fig.11).

Apesar do grande número de sequências geradas pelo sistema de sequenciamento “high throughput” como é o caso da plataforma utilizada neste trabalho (Illumina®), o tamanho das mesmas é muito menor que as do sequenciamento pela metodologia de Sanger, fato este que pode dificultar o processo de identificação dos organismos.

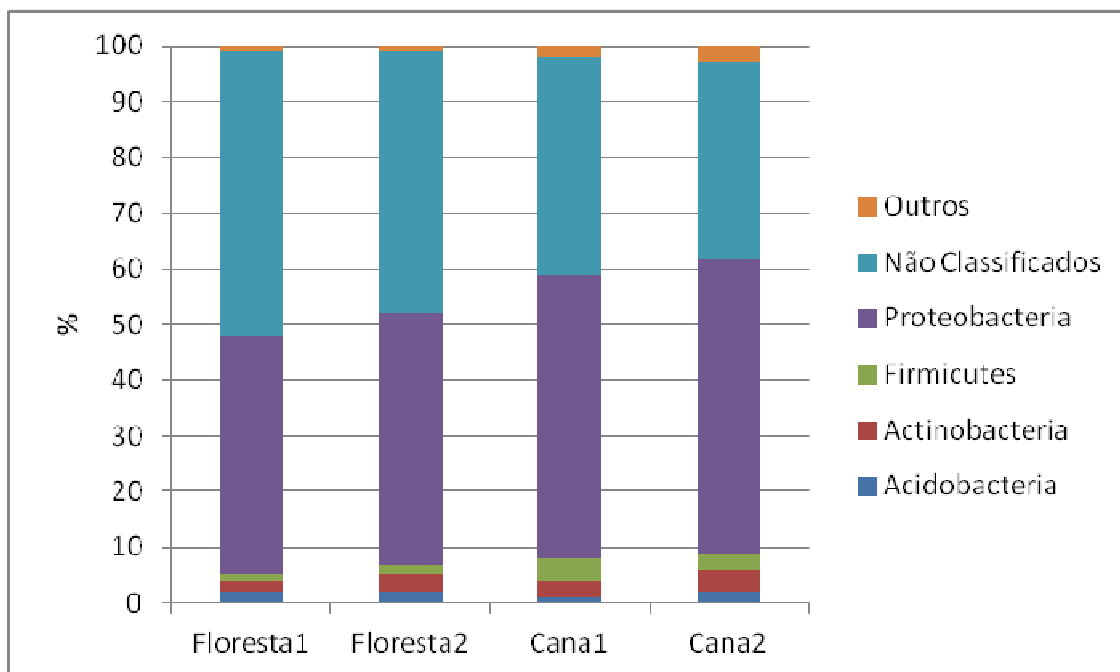


Figura 22: Composição dos filos encontrados em amostras de Floresta (1 e 2) e Cana-de-açúcar (1 e 2) através da comparação com RDP-II baseado em sequências do fragmento Vi do 16S rDNA bacteriano.

A análise de diversidade baseada no gene 16S rRNA utilizando tecnologias como Illumina® que produzem milhões de sequências é muito interessante para elucidação de relações ecológicas em ambientes complexos como solo. Entretanto existem diversas limitações nessas técnicas quando utilizadas em análises metagenômicas (VASILEIADIS et al., 2012).

Como já relatado, análises deste gene permitem o acesso à diversidade em amostras ambientais quando utilizado a sequência total do mesmo (~ 1500 pb). Entretanto, a utilização de fragmentos de regiões hipervariáveis têm sido extensamente utilizada (VILO e DONG, 2012). Regiões hipervariáveis do 16S rRNA, como V1, V3, V5, V6 estão sendo utilizadas em diversos estudos de microbiomas. A acurácia das informações obtidas utilizando apenas estas regiões ainda é muito questionável. Um dos principais debates é se a resolução filogenética de cada região hipervariável é a mesma.

O advento de novas tecnologias de análises destes resultados tem permitido um acesso cada vez maior a informações filogenéticas baseado no 16S rRNA. Uma das principais estratégias é a utilização do banco de dados RDP. A ferramenta Classifier, é extensamente utilizada na análise de resultados de sequenciamentos de nova geração em larga escala (VILO e

DONG, 2012). Liu e cols. (2008) relata que sequencias parciais do 16S podem alcançar classificação similar como o sequenciamento total do gene.

O trabalho de Vasileiadis et al. (2012) demonstrou que o uso das regiões variáveis pode facilitar a tarefa de classificação organismos envolvidos nos ciclos biogeoquímicos globais. Entretanto, os resultados de análise de filós baseado nas regiões variáveis do gene do 16S rRNA, demonstram queda nos índices de classificação taxonômica. Assim, existe um aumento no número de sequencias não classificadas. Esta composição de grupos não classificados reduz a capacidade de todas as regiões contribuírem para a identificação de táxons raros ou pouco frequentes em amostras. Um exemplo é a região V6 do gene 16SrRNA que apresenta particular dificuldade na identificação de Acidobacteria. Esses autores observaram que quando analisada a região V6 desse gene, observou-se a presença do dobro de sequencias não classificadas em relação ao gene completo. A média de sequencias não classificadas das outras regiões V é de uma vez e meia a mais. Em outros estudos relacionados, V3 e V4 mostraram-se regiões melhores para a identificação de OTUs do que as regiões V5 e V6 (HUSE et al., 2008).

O sequenciamento de apenas algumas porções do gene 16S rRNA, como as regiões V apresentam algumas falhas em relação ao sequenciamento total do gene em análises de comunidades bacterianas do solo. Entretanto, em alguns casos parecem representar em uma grande proporção o encontrado em sequenciamento completo desse gene (WANG e QIAN, 2009). A região V3 pode, por exemplo, atender as necessidades como técnicas de “screening” de diversas comunidades bacterianas do solo (VASILEIADIS et al., 2012).

Muitos estudos têm utilizado como ferramenta para aumentar a fidedignidade de classificação das sequencias um sistema de amplificação de sequencias combinadas, como a amplificação e análise de mais de uma região hipervariável unidas (exemplo: V1–V3, V3–V5, V6–V9 dentre outras combinações) (YILDIRIM et al., 2010; LAZAREVIC et al., 2010).

Vilo e Dong (2012) utilizando o banco RDP-II para análise de sequencias observaram a acurácia de classificação de 3 regiões combinadas e relataram que a região V1-V3 classificou 96,83% das sequencias em filo chegando até 76,90% em gênero. Similar a estes, a região combinada V3–V5 classificou 98,44% em filo e 77,15% em gênero. Por fim, V6–V9, classificou 96,43% em

filo e 72,65% em gênero. Por outro lado, quando as regiões hipervariáveis foram analisadas individualmente observou-se que as regiões V2 e V4 foram as que mostraram maior índice de classificação em filo, 85,99% e 89,28%, respectivamente. A região V3 apresentou acurácia de aproximadamente 45% das sequências classificadas em filo, o que é similar aos dados encontrados neste estudo analisando V1-V2. Outro achado importante a respeito é o fato de que determinadas regiões foram mais eficientes na identificação de determinados grupos bacterianos em uma mesma amostra.

Jeraldo et al. (2011) utilizando o banco de dados Greengenes, observaram que as regiões V1 - V3 foram as melhores para classificações filogenéticas. Chakravorty et al. (2007) avaliando as regiões V de 110 bactérias patogênicas ou provenientes de amostras ambientais, relataram que as regiões V2, V3 e V6 foram as mais eficientes na classificação do que V4, V5, V7 e V8.

A dificuldade de classificação das sequências geradas e a quantidade de sequências não classificadas, pode também estar associadas aos bancos de dados utilizados como comparação. O banco RDP apresenta apenas 5% das sequências depositadas oriundas de amostra de solos, sendo que as sequências predominantes são provenientes de amostras microbiomas humanos. A estratégia de sequenciamento utilizada na plataforma Illumina®, é outro fator que pode influenciar, sendo o sequenciamento “paired-end” o mais interessante, uma vez que pode produzir fragmentos maiores (BARTRAM et al, 2011).

As limitações encontradas neste tipo de abordagem, bem como limitações nas estratégias de sequenciamento e análise de dados, frequentemente têm gerado divergências entre qual a melhor abordagem e qual a melhor região hipervariável do gene 16S rRNA para ser escolhida a fim de representar os melhores índices de diversidade.

Entretanto, um ponto é claro. As estratégias utilizando as plataformas de sequenciamento de nova geração (NGS) apresentam uma série de vantagens sobre as estratégias de sequenciamento tradicionais como o sequenciamento de Sanger. Um dos principais pontos de vantagem se encontra na rapidez de execução experimental destas plataformas. Como dispensa a construção de bibliotecas plasmidiais e de outros vetores, excluindo clonagem, validação, coleta e seleção de clones, como antepassos ao sequenciamento, a velocidade

da geração de dados é muito grande. Outro ponto importante é a quantidade de dados gerados por corrida. Como observado na tabela 1, os sistemas de NGS é infinitamente maior, como por exemplo, neste, foram utilizadas aproximadamente 91 milhões de “reads” provenientes de apenas uma única corrida.

Essas plataformas ainda apresentam alguns pontos desfavoráveis. Como descrito acima, devido à quantidade de dados gerados e divergências entre as estratégias de análise ainda constituem um problema. Este acaba relacionando-se com o tamanho dos fragmentos gerados, em que o sequenciamento de Sanger ainda é capaz de gerar fragmentos maiores que no caso de análise de diversidade ainda são mais fiéis para definição taxonômica de microrganismos.

5. CONCLUSÕES

- Os filos bacterianos encontrados na área de Floresta permaneceram praticamente inalterados, independente da época de coleta. Assim, as áreas de Floresta apresentam um equilíbrio em relação à microbiota independente da área e época da coleta ou estratégia de sequenciamento.
- Ao se analisar as áreas cultivadas com cana-de-açúcar, Deltaproteobacteria e Firmicutes foram os mais frequentes em Cana 1 (período chuvoso). Entretanto, observamos aumento acentuado de Acidobacteria em Cana 2 (período seco).
- Nas análises do fragmento Vi para cana 1 e 2, a maioria das sequências pertenciam ao filo Proteobacteria, seguido de Firmicutes, Actinobacteria e Acidobacteria. Neste caso, a estratégia de sequenciamento e a época da coleta foram fatores que influenciaram na detecção da composição bacteriana neste tipo de solo cultivado.
- Foi observado, através do sequenciamento parcial da região Vi, que aproximadamente 50% das sequências não puderam ser classificadas. Apesar do número elevado de sequências geradas, o tamanho das mesmas é muito menor do que é encontrado nas estratégias tradicionais de sequenciamento do 16S rRNA, fato este que pode dificultar o processo de identificação.
- Quanto aos indivíduos identificados e com atividades relacionadas a diferentes ciclo biogeoquímicos observou-se que o padrão microbiológico foi similar para todas as amostras de solo de florestas, e os organismos relacionados ao ciclo do Nitrogênio foram os mais encontrados seguidos pelos envolvidos no ciclo de carbono e enxofre.
- Em áreas de Cana-de-açúcar, os principais organismos estavam relacionados ao ciclo do nitrogênio e carbono, exceto na amostra do período de seca (cana 2) em que os microrganismos relacionados ao ciclo do carbono foram os mais encontrados, coincidindo com o manuseio do solo requerido para o ciclo da cultura.

6. REFERENCIAS

ACOSTA-MARTÍNEZ, V.; DOWD, S.; SUN, Y.; ALLEN, Y. Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 2762–2770, 2008.

ADAMCZYK, J., HESSELSON, M., IVERSEN, N., HORN, M., LEHNER, A., NIELSEN, P.H., SCHLOTTER, M., ROSLEV, P., WAGNER, M. The isotope array, a new tool that employs substrate-mediated labeling of rRNA for determination of microbial community structure and function. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 69, p. 6875–6887, 2003.

ADUAN, R.E.; VILELA, M.F.; REIS-JR., F.B. **Os grandes Ciclos Biogeoquímicos do Planeta**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2004. 25p. (Embrapa-Cerrados. Documentos, 119).

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p. 3389-3402, 1997.

ANDREUX, F. Humus in world soils. In: PICCOLO., eds. **Humic Substances in terrestrial ecosystems**, Elsevier, Amsterdam, p.45-100, 1996.

ARAÚJO. E.S.; JANTÁLIA, C.P.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R. Importância do N das raízes de soja para a produtividade da cultura sucessora e para o balanço do N do sistema. **Circular Técnica**, Seropédica, n.14, p.1-4, 2006.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology; Fundamentals and Applications**, 4th ed. Addison-Wesley Pub, 306 pp., 1997.

BAILLY, J.; FRAISSINET-TACHET, L.; VERNER, M.C.; DEBAUD, J.C.; LEMAIRE, M.; WESOŁOWSKI-LOUVEL, M.; MARMEISS, R. Soil eukaryotic

functional diversity, a metatranscriptomic approach. **Isme Journal**, Geneva, v.1, p. 632–642, 2007.

BARNS, S.M.; CAIN, E.C.; SOMMERVILLE, S.; KUSKE, C.R. *Acidobacteria* Phylum Sequences in Uranium-Contaminated Subsurface Sediments Greatly Expand the Known Diversity within the Phylum. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 3113-3116, 2007.

BARTRAM, A.K.; LYNCH, M.D.J.; STEARNS, J.C.; MORENO-HAGELSIEB, G.; NEUFELD, J.D. Generation of multi-million 16S rRNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end Illumina reads. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, p. 3846–3852, 2011.

BEARE, M. H.; COLEMAN, D.C.; CROSSLEY JR.; D.A.; HENDRIX, P.F.; ODUM, E.P. A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. **Plant and Soil**, New York, v.170, p.5-22, 1995.

BERNARDES, C.M.; SANTOS, M.A. Microbial population as indicator of interference in different “cerrado” soil managements cultivated with soybean crop. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 22, p. 7-16, 2006.

BHASKAR, K.V.; CHARYULU, P.B.B.N. Effect of environmental factors on nitrifying bacteria isolated from the rhizosphere of *Setaria italica* (L.) Beauv **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.4, p. 1145-1146, 2005.

BENNDORF, D.; BALCKE, G. U.; HARMS, H.; VON BERGEN, M. Functional metaproteome analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater. **Isme Journal**, Geneva, v.1, p. 224-234, 2007.

BENLLOCH, S.; RODRÍGUEZ-VALERA, F.; MARTÍNEZ-MURCIA, A.J. Bacterial diversity in two coastal lagoons deduced from 16S rDNA PCR

amplification and partial sequencing. **FEMS Microbiology Ecology**, Delft v.18, p.267-280, 1995.

BONCH-OSMOLOVSKAYA, E.A.; MIROSHNICHENKO, M.L.; LEBEDINSKY, A. V.; CHERNYH, N.A.; NAZINA, T.N.; IVOILOV, V.S.; BELYAEV, S.S.; BOULYGINA, E.S.; LYSOV, Y.P.; PEROV, A.N.; MIRZABEKOV, A.D. Radioisotopic, culture-based, and oligonucleotide microchip analyses of thermophilic microbial communities in a continental high-temperature petroleum reservoir. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 69, p. 6143-6151, 2003.

BOSSIO, D. A.; SCOW, K. M.; GUNAPALA, N.; GRAHAM, K. J. Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management, season and soil type on phospholipids fatty acid profiles. **Microbial Ecology**, New York, v. 36, p. 1-12. 1998.

BRADY, N. C.; WEIL, R. R. **The Nature and Properties of Soils**. eleventh ed. Prentice Hall, New Jersey. 1996.

BRUCE, T.; MATINEZ, I.B.; MAIA-NETO, O.; VICENTE, A.C.P.; KRUGER, R.H.; THOMPSON, F.L. Bacterial community diversity in the Brazilian Atlantic Forest Soils. **Microbial Ecology**, New York, v. 60, p. 840–849, 2010.

CANELLAS, L.P.; BALDOTTO, M.A.; BUSATO, J.G.; MARCIANO, C.R.; MENEZES, S.C.; SILVA, N.M.; RUMJANEK, V.M.; VELLOSO, A.C.X; SIMÕES, M.L.; MARTIN-NETO, L. Estoque e qualidade da matéria orgânica de um solo cultivado com cana-de-açúcar por longo tempo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 31, p. 331-340, 2007.

CARNEIRO, M.A.C. **Características bioquímicas do solo em duas cronossequências de reabilitação em áreas de mineração de bauxita**. TESE. 166p. Lavras: UFLA, 2000.

CARVALHO, M.C.C.G.; SILVA, D.C.G. Next generation DNA sequencing and its applications in plant genomics. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, p. 735-744, 2010.

CEPAGRI (Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicada à Agricultura) 2013 (A). Disponível em: http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima_muni_531.html Acesso em: 31 jan 2013

CEPAGRI (Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicada à Agricultura) 2013 (B). Disponível em: http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima_muni_531.html Acesso em: 31 jan 2013

CERRI, C.C.; BERNOUX, M.; FEIGL, B.J.; PICCOLO, M.C.; CERRI, C.E.P. **Balanco de gases nos sistemas de produção**. In: **Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**, 29. 2003. Anais. Ribeirão Preto, Universidade Estadual de São Paulo, 2003. CD-ROOM

CHAKRAVORTY, S.; HELB, D.; BURDAY, M.; CONNELL, N.; ALLAND, D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria, **Journal of Microbiological Methods**, Langford Lane, v. 69, p. 330–339, 2007.

CHAO, A. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. **Biometrics**, Arlington, v. 43, p. 783–791, 1987.

CHAO, A. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. **Scandinavian Journal of Statistics**, Malden, v. 11, p. 265-270, 1984.

CHAO, A.; LEE, S.M. Estimating the number of classes via sample coverage. **Journal of the American Statistical Association**,_ Alexandria, v. 87, p. 210–217, 1992.

CHAO, A.; MA, M.C.; YANG, M.C.K. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. **Biometrika**, Oxford, v. 80, p. 193-201, 1993.

COMMITTEE ON METAGENOMICS: Challenges and Functional Applications, National Research Council, **The New Science of Metagenomics: Understanding Our Microbial Planet**, first ed. The Nacional Academies, Washington, 2007.

CONAB (Companhia Nacional do Abastecimento). Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 21 mai 2013.

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

CRAWFORD, N.M.; KAHN, M.L.; LEUSTEK, T.; LONG, S.R. **Nitrogen and Sulfur**. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (eds), **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, American Society of Plant Physiologists, Rockville, p.786, 2000.

DANIEL, R. The metagenomics of soil. **Nature Reviews Microbiology**. London, v. 3, p. 470 – 478, 2005.

DE FEDE, K. L.; PANACCIONE, D. G.; SEXTONE, A. J. Characterization of dilution enrichment cultures obtained from size-fractionated soil bacteria by BIOLOG® community-level physiological profiles and restriction analysis of 16S rDNA genes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 1555-1562, 2001.

DELMONT, T.O. ; MALANDAIN, C.; PRESTAT, E.; LAROSE, C.; MONIER, J.M.; SIMONET, P.; VOGEL, T.M. Metagenomic mining for microbiologists. **Isme Journal**, Geneva v.5, p. 1837-1843, 2011.

DIEBEL, M.W.; MAXTED, J.T.; ROBERTSON, D.M.; HAN, S.; ZANDEN, M.J.V. Landscape Planning for Agricultural Nonpoint Source Pollution Reduction III: Assessing Phosphorus and Sediment Reduction Potential. **Environmental Management**. New York. v. 43, p. 69–83, 2009.

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. **Plant Soil**, New York, v. 336, p. 337–349, 2010.

DUNBAR, J.; BARNS, S.M.; TICKNOR, L.O.; KUSKE, C.R. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v.68, p. 3035–3045, 2002.

ENGELBREKTSON, A.; KUNIN, V. ; WRIGHTON, K.; ZVENIGORODSKY, N.; CHEN, F.; OCHMAN, H.; HUGENHOLTZ, P. Experimental factors affecting PCRbased estimates of microbial species richness and evenness. **Isme Journal**, Geneva v. 4, p. 642–647, 2010.

FERNANDES, O.B.; PEREIRA, F.H.F.; ANDRADE JÚNIOR, W.P.; QUEIROGA, R.C.F.; QUEIROGA, F.M. Efeito do nitrato de cálcio na redução do estresse salino no meloeiro. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 23, p. 93-103, 2010.

FITTER, A. H.; GILLIGAN, C. A.; HOLLINGWORTH, K.; KLECZKOWSKI, A.; TWYMAN, R. M.; PITCHFORD, J. W. Biodiversity and ecosystem function in soil. **Functional Ecology**, London, v. 19, p. 369 – 377, 2005.

FRIAS-LOPEZ, J.; SHI, Y.; TYSON, G.W.; COLEMAN, M.L.; SCHUSTER, S.C.; CHISHOLM, S.W.; DELONG, E.F. Microbial community gene expression in ocean surface waters. **Proceedings of National Academy of Sciences**, Washington, v. 105, p. 3805-3810, 2008.

FUNDAÇÃO FLORESTAL – SMA (Secretaria do Meio Ambiente – Estado de São Paulo). Disponível em: <http://www.fflorestal.sp.gov.br>. Acesso em: 26 jan 2013.

GANS, J.; WOILINSKY, M.; DUNBAR, J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. **Science**, Washington, v. 309, p. 1387–1390, 2005.

GAVA, C. A. T.; PEREIRA, J. C.; FERNANDES, M. C.; NEVES, M. C. P. Seleção de isolados de estreptomicetos para controle de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, p. 1373-1380, 2002.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LIBURUN, T.G. **Taxonomic Outline of Prokaryotes**. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**., second ed. Springer, New York, 2004.

GILLER, K. E; BEARE, M. H.; LAVELLE, P.; IZAC, A.M.N.; SWIFT, M. J. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. **Applied Soil Ecology**, Langford Lane, v. 6, 3-16, 1997.

GONÇALES, T.M., Impacto da queima da palha da cana-de-açúcar na saúde. In: II Fórum Ambiental da Alta Paulista. 2006, Tupã. **Anais**, Tupã. 2006.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A grafical tool for sequence finishing. *Genome Research*. New York, v.8, p. 195-202, 1998.

GRACE, J. Carbon Cycle. **Encyclopedia of Biodiversity**. v.1, p. 609-629, 2001.

GUARNIERI, L.C.; JANNUZZI, R.M. *Proálcool: Impactos Ambientais*. **Revista Brasileira de Energia**, Itajubá, v. 2, 1992

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, Langford Lane, v. 166, p. 557-580, 1933.

HE, Z. L.; GENTRY, T.J.; SCHADT, C.W.; WU, L.; LIEBICH, J.; CHONG, S.C.; HUANG, Z.; WU, W.; GU, B.; JARDINE, P.; CRIDDLE, C.; ZHOU, J. GeoChip: a comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes. **Isme Journal**, Geneva, v.1, p. 67-77, 2007.

HENRY, S.; BAUDOUIN, E.; LÓPEZ-GUTIÉRREZ, J.C.; MARTIN-LAURENTA, F.; BRAUMAN, A.; PHILIPPOT, L. Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, Langford Lane, v. 59, p. 327-335, 2004.

HEUER, H.; SMALLA, K. Evaluation of community-level catabolic profiling using BIOLOG GN microplates to study microbial community changes in potato phyllosphere. **Journal of Microbiology Methods**, Amsterdam, v.30, p.49-61, 1997.

HUGHES, J. B.; HELLMANN, J.J.; RICKETTS, T. H.; BOHANNAN B. J. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v 67, p.4399-06, 2001.

HUNTER-CEVERA, J. C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 1, p. 278-285, 1998.

HUSE, S.M.; DETHLEFSEN, L.; HUBER, J.A.; WELCH, D.M.; RELMAN, D.A. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 4, (e1000255), 2008.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) **Manual Técnico da Vegetação Brasileira**. Rio de Janeiro, 1992.

JARDIM, F.W.; CANELA, M.C. Fundamentos de oxidação química no tratamento de efluentes e remediação de solos. **Caderno Temático**. IQ/Unicamp, UENF/RJ., Campinas, v. 1, p. 1 – 10, 2004.

JENKINS, B.D.; STEWARD, G.F.; SHORT, S.M.; WARD, B.B.; ZEHR, J.P. Fingerprinting diazotroph communities in the Chesapeake Bay by using a DNA macroarray. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 70, p.1767–1776, 2004.

JERALDO, P.; CHIA, N.; GOLDENFELD, N. On the suitability of short reads of 16S rRNA for phylogeny-based analyses in environmental surveys. **Environmental and Microbiology**. New Jersey, v. 13, p. 3000–3009, 2011.

JONES, R.T.; ROBESON, M.S.; LAUBER, C.L.; HAMADY, M.; KNIGHT, R.; FIERER, N. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. **Isme Journal**, Geneva, v. 3, p. 442–453, 2009.

JOHNSON, M.J.; LEE, K.Y.; SCOW, K.M. DNA fingerprint reveals links among agricultural crops, soil properties, and the composition of soil microbial communities. **Geoderma**, Langford Lane, v.114, p. 279-303, 2003.

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

KIELAK, A.; PIJL, A.S.; VAN VEEN, J.A.; KOWALCHUK, G.A. Phylogenetic diversity of *Acidobacteria* in a former agricultural soil. **Isme Journal**, Geneva, v. 3, p. 378–382, 2009.

KNOEPP, J.D.; COLEMAN, D.C.; CROSSLEY JR., D.A.; CLARK, J.S. Biological indices of soil quality: an ecosystem case study of their use. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 138, p. 357 – 368, 2000.

KREILEMAN, G.J.J.; BOUWMAN, A.F. Computing land use emissions of greenhouse gases. **Water, Air & Soil Pollution**. Dordrecht, v. 73, p. 231-250, 1994.

KONOPKA, A.; OLIVER, L.; TURCO, R.F. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. **Microbial Ecology**, New York, v.35, p.103-115, 1998.

KÖPPEN, W.; GEIGER, R. **Klimate der Erde**. Gotha: Verlag Justus Perthes. 1928. Wall-map 150cmx200cm

LAVELLE, P.A.; BRUSSAARD, L.; HENDRIX, P. **EARTHWORM Management in Tropical Agroecosystems**, first ed. CAB International, Wallingford. 1999.

LAZAREVIC, V.; WHITESON, K.; HERNANDEZ, D.; FRANÇOIS, P.; SCHRENZEL, J. Study of inter- and intra-individual variations in the salivary microbiota, **BMC Genomics**, London, v. 11: 523, 2010.

LEITÃO-FILHO, H.F. Considerações sobre a florística de florestas tropicas e subtropicais do Brasil. **IPEF**, Piracicaba, v. 45, p. 41-46, 1987.

LIU, X.Z.; ZHANG, L.M.; PROSSER, J.I.; HE, J.Z. Abundance and community structure of sulfate reducing prokaryotes in a paddy soil of southern China under different fertilization regimes. **Soil Biology & Biochemistry**, Langford Lane, v. 41, p. 687–694, 2009.

LIU, Z.; DeSANTIS, T.Z.; ANDERSEN, G. L.; KNIGHT, R. Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers, **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.36, (e120), 2008.

LIU, W.T.; STHAL, D.A. **Molecular Approaches for the Measurement of Density, Diversity and Phylogeny**. In: Manual of Environmental Microbiology, p.114, 2002.

MACEDO, H.S.; CARARETO-ALVES, L.M. **Comunidades bacterianas em solos cultivados com cana-de-açúcar sob manejo manual com queima e mecanizado**. Dissertação. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2012.

MALAVOLTA, E.; HAAG, H.P. Nutrição e adubação. In: MALAVOLTA, E. et al. **Cultura e adubação da cana-de-açúcar**. Potafos, São Paulo, p.237-278, 1964. (A)

MALAVOLTA, E. **Manual de Nutrição Mineral de Plantas**. Agronômica Ceres, São Paulo, 2006. (B)

MARDIS, E.R. Next-Generation DNA Sequencing Methods. **Annual Reviews of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v. 9, p. 387–402, 2008. (b)

MARDIS, E.R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. **Trends in Genetics**, Maryland Heights, v.24, p. 133-141, 2008.

MARQUES, N.K. **Análise morfológica e molecular de cianobactérias isoladas de efluentes de uma mina de urânio destivada com enfase em Alphanothece e sua capacidade de bioissorção do ^{226}Ra** . Dissertação. Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2006.

MELLONI, R. Quantificação Microbiana da Qualidade do Solo. In: SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S. (Eds.) **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. Campinas: IAC, p. 193-217, 2007.

MOTAVALLI, P. P.; PALM, C. A.; PARTON, Z W. J.; ELLIOTT, E. T.; FREY, S.D. Soil pH and organic C dynamics in tropical forest soils: evidence from laboratory and simulation studies. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 27, p. 1589 – 1599, 1995.

MOROZOVA, O.; MARRA, M.A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. **Genomics**, Langford Lane, v. 92, p. 255-264, 2008.

NATALE NETTO, J. **A saga do álcool**: fatos e verdades sobre os 100 anos do álcool combustível em nosso país. 1 ed., Novo século, Osasco, 2007.

NEVES, M. C. P.; GAVA, C. A. T. **Actinomicetos no solo**. Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa MG, 2008.

NOGUEIRA, L. A. H.; LORA, E. E. S. **Dendroenergia**: fundamentos e aplicações. 2. ed. Interciência, Rio de Janeiro:, 2003.

NUNES, G. L. **Diversidade e estrutura de comunidades de Bacteria e Archaea em solo de mangue contaminado com hidrocarbonetos de petróleo**. Dissertação – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 84 p. 2006.

NÜSSLEIN, K.; TIEDJE, J.M. Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Heidelberg, v. 65, p. 3622-3626, 1999.

PACE, N. R.; OLSEN, G. J.; WOESE, C. R. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. **Cell**, Maryland Heights, v.45, p.325-326, 1986.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, Washington, v.276, p.734-740, 1997.

PEDRINHO, E.A.N.; LEMOS, E.G.M.; PEREIRA, R.M.; SCAQUITTO, D.C.; VAL-MORAES, S.P.; SILVEIRA, E.L.; ALVES-CARARETO, L.M.; 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**, São Paulo, v.76, p.447-452, 2009.

PETERS, S.; KOSCHINSKY, S.; SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. C. Secession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism-based genetics profiles of small-subunit rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 930-936, 2000.

PETROSINO, J. F.; HIGHLANDER, S.; LUNA, R. A.; GIBBS, R. A.; VERSALOVIC, J. Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification. **Clinical Chemistry**, Washington, v.55, p.856-866, 2009.

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**, Ribeirão Preto, v. 44, p. 1215-1221, 2011.

QIU, J.; GUO, Z.; LIU, H.; ZHOU, D.; HAN, Y.; YANG, R.; DNA microarray-based global transcriptional profiling of *Yersinia pestis* in multicellularity. **Journal of Microbiology**, Heidelberg, v.46, p. 557–563, 2008.

RADMAN, R.; SAEZ, T.; BUCKE, C.; KESHAVARZ, T. Elicitation of plants and microbial cell systems. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Malden, v.37, p.91–102, 2003.

RIPOLI, T.C.C.; RIPOLI, M.L. **Biomassa de cana-de-açúcar : colheita, energia e ambiente**. 1 ed. Piracicaba, 2004.

ROESCH, L.F.; FULTHORPE, R.R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A.K.; KENT, A.D. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **Isme Journal**, Geneva, v. 1, p. 283-290, 2007.

ROESCH, L.F.W.; PASSAGLIA, L.M.P.; BENTO, F.M.; TRIPLETT, E.W.; CAMARGO, F.A.O., Diversidade de Bactérias Diazotróficas Endofíticas Associadas a Plantas de Milho. **Revista Brasileira de Ciencias do Solo**, Viçosa, v.31, p.1367-1380, 2007.

ROGERS, B. F.; TATE III, R. L. Temporal analysis of the soil microbial community along a toposequence in Pineland soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 1389-1401, 2001.

ROSA, M.S. **Bioativadores no desenvolvimento inicial de Cana-de-açúcar**. Trabalho de conclusão de curso. Universidade do Estado do Mato Grosso, Tangará da Serra. 2009.

ROSSETO, R. **A cana-de-açúcar e a questão Ambiental**. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M. de; ANDRADE LANDELL, M. G. de. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. p. 869-88

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

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of National Academy of Sciences**, Washington, v.74, p. 5463–5467, 1977.

SESSITSCH, A.; WEILHARTER, A.; GERZABEK, M. H.; KIRCHMANN, H.; KANDELER, E. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4215-4224, 2001.

SCHLESINGER, W.H. **Biogeochemistry: An analysis of global change**. 2nd. Ed.. Academic Press, San Diego p.588, 1997.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Toward a census of bacteria in soil. **PLOS Computational Biology**, San Francisco, v.2, p. 786–793, 2006.

SCHLOSS, P.D.; LARGET, B.R.; HANDELSMAN, J. Integration of Microb Ecol statistics: a test to compare gene libraries. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 5485–5492, 2004.

SCHLOSS, P.D.; WESCOTT, S.L.; RYABIN, T.; HALL, J.R.; HARTMAN, M.; HOLISTER, 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 and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 7537-7541, 2009.

SCHMEISSER, C.; STEELE, H.; STREIT, W. R. Metagenomics, biotechnology with nonculturable microbes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v.75, p.955–962, 2007.

SELLE, G.L. Ciclagem de nutrientes em ecossistemas florestais. **Bioscience Journal**, Umuarama, v. 23, p. 29-39. 2007.

SHENDURE, J., JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, p. 1135-1145, 2008.

SILVEIRA, E.L.; PEREIRA, R.M.; SCAQUITTO, D.C.; PEDRINHO, E.A.N.; VAL-MORAES, S.P.; WICKERT, E.; ALVES-CARARETO, L.M.; LEMOS, E.G.M. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, p.1.507-1.516, 2006.

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GOMMANS, S.; VAN DEN BROEK, J.; VAN, M. S.; WERNARS, K. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2284-2291, 2001.

SONI, S.K., RAHI, D.K., SONI, R. **Microbial Ecology and Pollution Management** In.: Soni, S.K (ed), **Microbes: A source of energy of 21st Century**. New India Publishing Agency, Nova Deli, p.575, 2007.

SPIRO, A.; LOWE, M.; BROWN, D. A bead-based methods for multiplexed identification and quantification of DNA sequences using flow cytometry. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, p.4258- 4265, 2000.

SUNDARA, B.; NATARAJAN, V.; HARI, K. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. **Fields Crops Research**, Amsterdam, v. 77, p. 43-49, 2002.

STRALIS-PAVESE, N.; SESSITSCH, A.; WEILHARTER, A.; REICHENAUER, T.; RIESING, J.; CSONTOS, J., MURRELL J. C.; BODROSSY, L. Optimization of diagnostic microarray for application in analysing landfill methanotroph communities under different plant covers. **Environmental and Microbiology**. New Jersey, v.6, p.347-363, 2004.

THEODORO, A.T., **Expansão da cana-de-açúcar no Brasil: Ocupação da cobertura vegetal do Cerrado**. Trabalho de conclusão de curso. Faculdade de Tecnologia de Araçatuba. 2011.

THOMAS, S.H.; WAGNER, R.D.; ARAKAKI, A.K.; SKOLNICK, J.; KIRBY, J.R.; SHIMKETS, L.J.; SANFORD, R.A.; LOFFLER, F.E.; The mosaic genome of *Anaeromyxobacter dehalogenans* strain 2CP-C suggests an aerobic common ancestor to the delta-proteobacteria. **PLoS One**, San Francisco, v. 3(5), 2008.

TIEDJE, J. M.; CHO, J. C.; MURRAY, A.; TREVES, D.; XIA, B.; AHOU, J. Soil teeming with life: new frontiers for soil science. In: REES, R. M.; BALL, B. C.; CAMPEBELL, C. D.; WATSON, C. A. (Org.). **Sustainable management of soil organic matter**. Wallingford: CAB International, p. 393-412, 2001.

TOLEDO FILHO, D. V. **Composição Florística e Estrutura Fitossociológica da Vegetação de Cerrado no Município de Luiz Antonio (SP)**. Dissertação. Campinas, UNICAMP, 1984 173p.

TODAR, K. **Procaryotes in the environment. Todar's Textbook of Bacteriology**. University of Wisconsin-Madison. 2006.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 5, p. 240–245, 2002.

TOWNSEND, C.R. **Recomendações técnicas para o cultivo da cana-de-açúcar forrageira em Rondônia.** EMBRAPA-CPAF Rondônia, v.21, p. 1-5, 2000.

TURCATTI, G.; ROMIEU, A.; FEDURCO, M; TAIRI, A.P. A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.36, (e25), 2008.

TURCO, R.F.; KENNEDY, A.C.; JAWSON, M.D. Microbial indicators os soil quality. In: DORAN, J.W.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F.; STEWART, B.A. (eds.) **Defining soil quality for a sustainable enviroment.** American Society of Agronomy, Madison, v.35, p.73-90, 1994.

TURCO, R. F.; BLUME, E. Indicators of soil quality. In: SIQUEIRA, J. O; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. G. R.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Org.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas.** Viçosa: SBCS ; Lavras: UFLA/DCS, p. 529-549, 1999.

UNICA (União da Indústria de Cana-de-açúcar). Disponível em: <http://www.unica.com.br> Acesso em: 21 mai 2013.

URICH, T.; LANZÉN, A.; QI, J.; HUSON, D.H.; SCHLEPER, C.; SCHUSTER, S.C. Simultaneous Assessment of Soil Microbial Community Structure and Function through Analysis of the Meta-Transcriptome **PLoS ONE**, San Francisco, v. 3 (6) (e2527), 2008.

VAL-MORAES, S.P.; CARARETO-ALVES, L.M; LEMOS, E.G.M. **Impacto do lodo de esgoto na comunidade bacteriana do solo: avaliação por microarranjo de DNA.** Tese. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2008

VASCONCELLOS, R.L.F. **Actinobactérias da rizosfera de *Araucaria angustifolia* com potencial biotecnológico**. Dissertação. Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.

VASILEIADIS, S.; PUGLISI, E.; ARENA, M.; CAPPA, F.; COCCONCELLI, P.S.; TREVISAN, M. Soil bacterial diversity screening using single 16S rRNA gene V regions coupled with multi-million read generating sequencing Technologies. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7 (e42671), 2012.

VELOSO, H.P. **Sistema fitogeográfico**. In **Manual técnico da vegetação brasileira**. IBGE, Série Manuais Técnicos em Geociências, Brasília, v.1, p. 8-38, 1992.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; SINDEREN, D. Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the evolutionary History of an Ancient Phylum. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 71, p. 495–548, 2007.

VILO, C.; DONG, Q. Evaluation of the RDP classifier accuracy using 16S rRNA gene variable regions. **Metagenomics**, Cairo, v. 1 (235551), 2012.

VISSER, S.; PARKINSON, D. Soil biological criteria as indicators of soil quality: soil microorganisms. **American Journal of Alternative Agriculture**, Cambridge, v. 7, p.33-37, 1992.

VOGEL, T.M.; SIMONET, P.; JANSSON, J.K.; HIRSCH, P.R.; TIEDJE, J.M.; VAN ELSAS, J.D.; et al. TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.7, (252), 2009.

VOGT, K. A.; GRIER, C. C.; VOGT, D. J. Production, turnover, and nutrient dynamics of above and belowground detritus of world forest. **Advances in Ecological Research**, Amsterdam, v. 15, p. 30 – 77, 1986.

WANG, Y.; QIAN, P.Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PLoS ONE**, San Francisco, v.4 (e7401), 2009.

WARNECKE, F.; HESS, M. A perspective: Metatranscriptomics as a tool for the discovery of novel biocatalysts. **Journal of Biotechnology**, Heidelberg, v. 142, 2009.

WILL, C.; THÜRMER, A.; WOLLHERR, A.; NACKE, H.; HEROLD, N.; SCHRUMPF, M.; GUTKNECHT, J.; WUBET, T.; BUSCOT, F.; DANIEL, R. Analysis of 16S rRNA Genes Revealed by Pyrosequencing-Based Composition of German Grassland Soils, as Horizon-Specific Bacterial Community. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.76, p. 6751–6759, 2010.

WWF Brasil. Disponível em: <http://www.wwf.org.br>. Acesso em: 26 ja n 2013.

YOU, Y.; FU, C.; ZENG, X.; FANG, D.; YAN, X.; SUN, B.; XIAO, D.; ZHANG, J., A novel DNA microarray for rapid diagnosis of enteropathogenic bacteria in stool specimens of patients with diarrhea. **Journal of Microbiological Methods**, Langford Lane, v. 75, p. 566–571, 2008.

YILDIRIM, S.; YEOMAN, C.J.; SIPOS, M.; TORRALBA, M.; WILSON, B.A.; GOLDBERG, T.L.; et al. Characterization of the fecal microbiome from non-human wild primates reveals species specific microbial communities, **PLoS One**, San Francisco, v. 5 (e13963), 2010.

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

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

ZHOU, H.W.; LI, D.F.; TAM, N.F.Y.; JIANG, X.T.; ZHANG, H.; SHENG, H.F.; QIN, J.; LIU, X.; ZOU, F. BIPES, a cost-effective high-throughput method for assessing microbial diversity. **The ISME Journal**, Geneve, v. 5, p. 741-749, 2011.

ZILLI, J.D.; CAMPO, R.J.; RIBEIRO, K. G.; GIANLUPPI, V.; SMIDERLER, O.J.; HUNGRIA, M. Utilização de Inoculantes de *Bradyrhizobium* no Cultivo de Soja nos Cerrados de Roraima. **Circular Técnica**, n.2, p.1-9, 2005.

ZORATTO, A.C. Principais impactos da cana-de-açúcar. In: II Fórum Ambiental da Alta Paulista. 2006, Tupã. **Anais**, Tupã. 2006.

APÊNDICE

Tabela 1S: Organismos Relatados em amostras de Solo de Cana-de-açúcar: Ca1 (cana-de-açúcar 1), Ca2 (cana-de-açúcar 2), Ca Mococa (cana-de-açúcar Mococa) e Não Relatado (NR) de acordo com a literatura.

Filo	Organismo	Ciclo / Atividade	Amostra	Referencia
Alphaproteobacteria	<i>Azospirillum</i>	Fixação N	Ca1 ; Ca Mococa	Garrity, 2004
	<i>Beijerinckia</i>	Fixação N	Ca1	Garrity, 2004
	<i>Bradyrhizobium</i>	Fixação N	Ca1 ; Ca2	Garrity, 2004
	<i>Blastochloris</i>	Metabolismo de Amônia	Ca2	Ramana et. al., 2011
	<i>Caedibacter</i>		Ca Mococa	NR
	<i>Hyphomicrobium</i>	Metabolismo de C	Ca1 ; Ca2 ; Ca Mococa	Urakami et. al., 1995
	<i>Mesorhizobium</i>	Fixação N	Ca1	Wang, et.al., 1999
	<i>Filomicrobium</i>		Ca2	NR
	<i>Pedomicrobium</i>	Oxidação de Mn	Ca1 ; Ca Mococa	Sly & Arunpairojana, 1986
	<i>Prosthecomicrobium</i>		Ca1 ; Ca Mococa	NR
	<i>Pseudolabrys</i>		Ca1 ; Ca Mococa	NR
	<i>Rhizobium</i>	Fixação N	Ca1 ; Ca Mococa	Valverde et. al., 2006
	<i>Rhodoplanes</i>	Denitrificação	Ca1 ; Ca Mococa	Garrity, 2004
	<i>Sphingomonas</i>	Biorremediação	Ca1 ; Ca2 ; Ca Mococa	White et. al., 1996
Betaproteobacteria	<i>Bordetella</i>		Ca Mococa	NR
	<i>Burkholderia</i>	Solubilização de P / Degradação Hidrocarbonetos	Ca Mococa	Valverde et.al., 2006
	<i>Derxia</i>	Fixação N	Ca Mococa	Ravi et. al., 1986
	<i>Herbaspirillum</i>	Fixação N	Ca Mococa	Valverde et. al., 2003
	<i>Massilia</i>	Redução de Nitrato	Ca Mococa	Weon et. al., 2008
	<i>Methyloversatilis</i>	Metilotrófico	Ca2 ; Ca Mococa	Kalyuzhnaya et. al., 2006
	<i>Pseudorhodoferax</i>		Ca1	NR
	<i>Stella</i>	Degradação de MO	Ca Mococa	Vasilyeva, 1985
	<i>Sterolibacterium</i>	Denitrificação	Ca1 ; Ca2 ; Ca Mococa	Tarlera et. al., 2003
Deltaproteobacteria	<i>Anaeromyxobacter</i>	Redução de nitrito e Nitrato	Ca1 ; Ca Mococa	Sanford et. al., 2002
	<i>Chondromyces</i>	Degradação de MO	Ca1 ; Ca Mococa	Garrity, 2004
	<i>Corallococcus</i>		Ca Mococa	NR

	<i>Desulfomonile</i>	Biorremediação (ex:biofenilas policloradas)	Ca Mococa	Sun et.al., 2001
	<i>Desulfotomaculum</i>	Redução de Sulfato	Ca Mococa	Imachi et. al., 2006
	<i>Desulfuromonas</i>	Redutora de S	Ca Mococa	Finstet et. al., 1997
	<i>Desulfocella</i>	Redução de Sulfato / Degradação de MO	Ca1	Garrity, 2004
	<i>Geothalkalibacter</i>	Redução de Fe e Mn	Ca Mococa	Greene et. al., 2009
	<i>Geobacter</i>	Metabolismo de S e Metais	Ca1 ; Ca Mococa	Bond, 2002
	<i>Haliangium</i>	Degradação de MO	Ca Mococa	Fudou et. al., 2002
	<i>Hyalangium</i>		Ca Mococa	NR
	<i>Geothermobacter</i>	Redução de Fe E degradação de MO	Ca Mococa	Kashefi et. al., 2003
	<i>Phaselicystis</i>	Redução de Sulfato	Ca2 ; Ca Mococa	Garcia et. al., 2009
	<i>Pelobacter</i>	Redução de Fe	Ca1 ; Ca Mococa	Richter et. al., 2007
	<i>Syntrophobacter</i>	Redução de Sulfato	Ca1	Garrity, 2004
	<i>Sorangium</i>	Degradação de Celulose	Ca Mococa	Jiang et. al., 2008
Gammaaproteobacteria	<i>Aquicella</i>		Ca1	NR
	<i>Gemmatimonas</i>	Acumuladora de P	Ca Mococa	Zhang, et al, 2003
	<i>Steroidobacter</i>	Denitrificante	Ca Mococa	Fahrbach et. al, 2008
Actinoproteobacteria	<i>Actinoallomurus</i>	Redução Nitrato	Ca Mococa	Tamura et. al. 2009
	<i>Actinoplanes</i>	Compostos Biotecnológicos	Ca1	Schwientek et. al., 2012
	<i>Catellatospora</i>	Redutor de Nitrito	Ca1	Lee et. al., 2000
	<i>Clavibacter</i>		Ca1	NR
	<i>Krasilnikov</i>		Ca1	NR
	<i>Iamia</i>	Redução Nitrato	Ca Mococa	Kurahashi, et. al. 2009
	<i>Marmoricola</i>		Ca1	NR
	<i>Microbispora</i>		Ca2	NR
	<i>Nocardioides</i>	Degradação Hidrocarbonetos	Ca1	Schippers et. al., 2005
	<i>Patulibacter</i>		Ca1	NR
	<i>Sphaerisporangium</i>		Ca1	NR
	<i>Solirubrobacter</i>		Ca Mococa	NR
	<i>Streptomyces</i>	Degradação de MO / Antibióticos	Ca2	NR
	<i>Thermoleophilum</i>		Ca1	NR
Firmicutes	<i>Anaeromusa</i>		Ca Mococa	NR
	<i>Bacillus</i>	Redução Nitrato, Prdução Sulfeto de H	Ca1 ; Ca2 ; Ca Mococa	Heyrman et.al., 2004

	<i>Clostridium</i>		Ca Mococa	NR
	<i>Cohnella</i>	Fixação de Nitrogênio	Ca Mococa	García-Fraile et.al. 2008
	<i>Geobacillus</i>		Ca Mococa	NR
	<i>Gracilibacter</i>		Ca Mococa	NR
	<i>Heliobacillus</i>		Ca Mococa	NR
	<i>Heliobacterium</i>	Fixação de N	Ca Mococa	Tang et. al., 2010
	<i>Luteolibacter</i>		Ca1	NR
	<i>Paenibacillus</i>	Metabolismo de C	Ca1 ; Ca2 ; Ca Mococa	Rivas et. al., 2005
	<i>Propionispora</i>	Degradação de Políesteres	Ca Mococa	Abou-Zeid et. al., 2004
	<i>Rummeliibacillus</i>		Ca Mococa	NR
	<i>Tumebacillus</i>		Ca2	NR
	<i>Thermoflavimicrobium</i>		Ca Mococa	NR
	<i>Thermosediminibacter</i>	Redução de S	Ca Mococa	Lee et. al., 2005
Planctomycetes	<i>Blastopirellula</i>		Ca Mococa	NR
	<i>Gemmata</i>	Oxidação de Amonio	Ca1 ; Ca Mococa	Wang, et.al., 2001
	<i>Planctomyces</i>		Ca1	NR
	<i>Schlesneria</i>		Ca1	NR
	<i>Zavarzinella</i>		Ca1 ; Ca Mococa	NR
Verrucomicrobia	<i>Prostheco bacter</i>		Ca1 ; Ca Mococa	NR
	<i>Verrucomicrobium</i>		Ca1 ; Ca Mococa	NR
Chloroflexi	<i>Anaerolinea</i>		Ca1 ; Ca Mococa	NR
	<i>Ktedonobacter</i>		Ca1 ; Ca Mococa	NR
	<i>Levilinea</i>	Degradação de MO	Ca Mococa	Yamada et. al., 2005
Nitrospirae	<i>Nitrospira</i>	Oxidação de Nitrito	Ca1 ; Ca2 ; Ca Mococa	Daims et. al., 2001
Acidobacteria	<i>Acidobacterium</i>	Degradação de MO	Ca2 ; Ca Mococa	Kishimoto et. al., 2001
	<i>Edaphobacter</i>		Ca1 ; Ca2 ; Ca Mococa	NR
	<i>Holophaga</i>	MEtano	Ca Mococa	Koch et. al., 2008
	<i>Terriglobus</i>	Metano	Ca Mococa	NR
Gemmatimonadetes	<i>Gemmatimonas</i>	Acumuladora de P	Ca1	Zhang, et. al., 2003

Tabela 2S: Organismos Relatados em amostras de Solo de Floresta: FI1 (Floresta 1), FI2 (Floresta 2), FI Mococa (Floresta Mococa) e Não Relatados (NR) de acordo com a literatura.

Filo	Organismo	Ciclo / Atividade	Amostra	Referencia
Alphaproteobacteria	<i>Afipia</i>		FI1 ; FI2	NR
	<i>Beijerinckia</i>	Fixação N	FI1 ; FI2	Garrity, 2004
	<i>Bradyrhizobium</i>	Fixação N	FI1 ; FI2 ; FI Mococa	Garrity, 2004
	<i>Blastobacter</i>	Metilotrófica	FI Mococa	Garrity, 2004
	<i>Caulobacter</i>		FI Mococa	NR
	<i>Devosia</i>	Fixação N	FI2 ; FI Mococa	Rivas et al, 2002
	<i>Filomicrobium</i>		FI Mococa	NR
	<i>Gluconacetobacter</i>	Fixação N	FI2	Perin et. al., 2004
	<i>Hyphomicrobium</i>	Metabolismo de C	FI1 ; FI2	Urakami et. al., 1995
	<i>Maricaulis</i>		FI1	NR
	<i>Mesorhizobium</i>	Fixação N	FI1 ; FI2	Wang, et.al., 1999
	<i>Methylocystis</i>	Metanotrófica	FI Mococa	McDonald et. al., 1997
	<i>Methylosinus</i>		FI1 ; FI2	NR
	<i>Methylovirgula</i>	Metabolismo de C	FI1 ; FI2	Vorob'ev et.al., 2009
	<i>Oceanibaculum</i>		FI1 ; FI2	NR
	<i>Pedomicrobium</i>	Oxidação de Mn	FI1 ; FI2	Sly & Arunpairojana, 1986
	<i>Prosthecomicrobium</i>		FI1 ; FI2	NR
	<i>Phyllobacterium</i>	Fixação de N	FI1 ; FI2	Garrity, 2004
	<i>Pleomorphomonas</i>	Fixação N	FI1	Xye 2005
	<i>Pseudolabrys</i>		FI2 ; FI Mococa	NR
	<i>Rhizobium</i>	Fixação N	FI1	Valverde et. al., 2006
	<i>Rhodoplanes</i>	Denitrificação	FI1 ; FI2 ; FI Mococa	Garrity, 2004
	<i>Rhodovibrio</i>		FI1	NR
	<i>Stella</i>	Degradação de MO	FI Mococa	Vasilyeva, 1985

Betaproteobacteria	<i>Denitratisoma</i>		Fl1 ; Fl2	NR
	<i>Derxia</i>	Fixação N	Fl Mococa	Shankar et al, 1986
	<i>Ideonella</i>	Fixação N	Fl Mococa	Noar 2009
	<i>Piscinibacter</i>		Fl Mococa	NR
	<i>Sterolibacterium</i>	Denitrificação	Fl1 ; Fl2	Tarlera et. al., 2003
Deltaproteobacteria	<i>Anaeromyxobacter</i>	Redução de nitrito e Nitrato	Fl1 ; Fl2 ; Fl Mococa	Sanford et. al., 2002
	<i>Chondromyces</i>	Degradação de MO	Fl1	Garrity, 2004
	<i>Desulfofrigus</i>	Redutor de Sulfato	Fl1	Garrity, 2004
	<i>Desulfomonile</i>	Biorremediação (ex:biofenilas policloradas)	Fl1 ; Fl2	Sun et.al., 2001
	<i>Desulfonauticus</i>	Redutor de Sulfato	Fl1 ; Fl2	Mayilraj 2009
	<i>Desulfuromonas</i>	Redutora de S	Fl1	Finstet et. al., 1997
	<i>Geobacter</i>	Metabolismo de S e Metais	Fl1 ; Fl2 ; Fl Mococa	Bond, 2002
	<i>Geothermobacter</i>	Redução de Fe E degradação de MO	Fl Mococa	Kashefi et. al., 2003
	<i>Geothermobacter</i>	Redução de Fe E degradação de MO	Fl Mococa	Kashefi et. al., 2003
	<i>Kofleria</i>		Fl1	NR
	<i>Pelobacter</i>	Redução de Fe	Fl1 ; Fl2	Richter et. al., 2007
	<i>Syntrophobacter</i>	Redução de Sulfato	Fl1 ; Fl2 ; Fl Mococa	Garrity, 2004
	<i>Stigmatella</i>		Fl1 ; Fl2 ; Fl Mococa	NR
Gammaaproteobacteria	<i>Alkalilimnicola</i>		Fl1	NR
	<i>Aquicella</i>		Fl1 ; Fl2 ; Fl Mococa	NR
	<i>Bordetella</i>		Fl2	NR
	<i>Ectothiorhodospinus</i>		Fl1 ; Fl2	NR
	<i>Halochromatium</i>		Fl Mococa	NR
	<i>Legionella</i>		Fl1 ; Fl Mococa	NR
	<i>Pseudomonas</i>	Fixação de N	Fl1 ; Fl2	Desnoues et. al., 2003
	<i>Pseudoxanthomonas</i>	Biorremediação	Fl Mococa	Kim et. al., 2008
	<i>Steroidobacter</i>	Denitrificante	Fl1 ; Fl2 ; Fl Mococa	Fahrbach et. al., 2008
	<i>Thiofaba</i>	Oxidação de S	Fl Mococa	Mori, 2008
Actinoproteobacteria	<i>Asanoa</i>	Metabolismo de C	Fl1 ; Fl2	Garrity, 2004
	<i>Actinomadura</i>		Fl Mococa	NR
	<i>Catelliglobospora</i>		Fl1 ; Fl2	NR

	<i>Eggerthella</i>	Redução Nitrato	Fl Mococa	Dewhirst et.al., 2001
	<i>Iamia</i>	Redução Nitrato	Fl1 ; Fl2	Kurahashi, et. al., 2009
	<i>Luedemannella</i>		Fl1 ; Fl2	NR
	<i>Microlunatus</i>	Acumuladora de P	Fl1	Nakamura et. al., 1995
	<i>Micromonospora</i>	Compostos Biotecnológicos	Fl1	Hirsch, 2009
	<i>Mycobacterium</i>		Fl1 ; Fl2 ; Fl Mococa	NR
	<i>Solirubrobacter</i>		Fl1 ; Fl2	NR
	<i>Streptomyces</i>	Degradação de MO / Antibióticos	Fl1 ; Fl Mococa	NR
	<i>Rhodococcus</i>		Fl1 ; Fl2	NR
Firmicutes	<i>Acetonema</i>		Fl Mococa	NR
	<i>Anaeromusa</i>		Fl Mococa	NR
	<i>Bacillus</i>	Redução Nitrato, Produção Sulfeto de H	Fl1 ; Fl2 ; Fl Mococa	Heyrman et.al, 2004
	<i>Brevibacterium</i>		Fl1 ; Fl2	NR
	<i>Caloramator</i>		Fl Mococa	NR
	<i>Cohnella</i>	Fixação de Nitrogênio	Fl1	García-Fraile et.al. 2008
	<i>Desulfosporosinus</i>	Redução de Sulfato	Fl Mococa	Ramamoorthy et. al, 2006
	<i>Heliorestis</i>		Fl Mococa	NR
	<i>Paenibacillus</i>	Metabolismo de C	Fl1 ; Fl2 ; Fl Mococa	Rivas et. al, 2005
	<i>Tumebacillus</i>		Fl1	NR
	<i>Thermaerobacter</i>		Fl2 ; Fl Mococa	NR
	<i>Thermo flavimicrobium</i>		Fl Mococa	NR
	<i>Thermolithobacter</i>	Redução de Fe	Fl1 ; Fl2	Sokolova et. al., 2007
Planctomycetes	<i>Blastopirellula</i>		Fl1 ; Fl2	NR
	<i>Gemmata</i>	Oxidação de Amonio	Fl Mococa	Wang, et.al., 2001
	<i>Thermodesulfovibrio</i>	Redução de Sulfato	Fl1	Sekiguchi et. al, 2008
	<i>Zavarzinella</i>		Fl Mococa	NR
Verrucomicrobia	<i>Prostheco bacter</i>		Fl Mococa	NR
	<i>Verrucomicrobium</i>		Fl1 ; Fl2 ; Fl Mococa	NR
Chloroflexi	<i>Ktedonobacter</i>		Fl Mococa	NR
Nitrospirae	<i>Nitrospira</i>	Oxidação de Nitrito	Fl1 ; Fl2 ; Fl Mococa	Daims et. al., 2001
	<i>Leptospirillum</i>	Oxidação de Fe	Fl1 ; Fl2	Coram, 2002
	<i>Thermodesulfovibrio</i>	Redução de Sulfato	Fl2	Sekiguchi et. al., 2008

Acidobacteria	<i>Acanthopleuribacter</i>		F11	NR
	<i>Acidobacterium</i>	Degradação de MO	F11 ; F12 ; F1 Mococa	Kishimoto et. al., 1991
	<i>Edaphobacter</i>		F11 ; F12 ; F1 Mococa	NR
	<i>Terriglobus</i>	Metano	F12 ; F1 Mococa	NR
Gemmatimonadetes	<i>Gemmatimonas</i>	Acumuladora de P	F11 ;F12	Zhang, et. al., 2003

REFERENCIAS APÊNDICE

ABOU-ZEID, D.M.; BIEBL, H.; SPROER, K.; MULLER, R.J. *Propionispora hippei* sp. nov., a novel Gram-negative, spore-forming anaerobe that produces propionic acid. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 951–954, 2004.

BOND, D. R.; LOVLEY, D.R. Electricity Production by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Electrodes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v. 69, p. 1548–1555, 2003.

CORAM, N.J.; RAWLINGS, D.E. Molecular Relationship between Two Groups of the Genus *Leptospirillum* and the Finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. Dominates South African Commercial Biooxidation Tanks That Operate at 40°C. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v. 68, p. 838–845, 2002.

DAIMS, H.,L.; JEPPE, L.; NIELSEN, J. L.; PER, H.; NIELSEN, P.H.; WAGNER, M. In Situ Characterization of *Nitrospira*-Like Nitrite-Oxidizing Bacteria Active in Wastewater Treatment Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 5273–5284, 2001.

DESNOUES,N.; LIN, M.; GUO, X.; MA, L.; LOPEZ, R. C.; ELMERICH, C. Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. **Microbiology**, Reading, v. 149, p. 2251–2262, 2003.

DEWHIRST, F.E.; PASTER,B.J.; TZELLAS, N.; COLEMAN,B.; DOWNES,J.; SPRATT, D. A.; WADE, A.J. Characterization of novel human oral isolates and cloned 16S rDNA sequences that fall in the family *Coriobacteriaceae*: description of *Olsenella* gen. nov., reclassification of *Lactobacillus uli* as *Olsenella uli* comb. nov. and description of *Olsenella profusa* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading v. 51, p. 1797–1804, 2001.

FAHRBACH, M.; KUEVER, J.; REMESCH, M.; HUBER, B.E.; KAMPFER, P.; DOTT, W.; HOLLENDER, J. *Steroidobacter denitrificans* gen. nov., sp. nov., a steroidal hormone-degrading gammaproteobacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 2215–2223, 2008.

FINSTER, K.; COATES, J. D.; LIESACK, W.; PFENNIG, N. *Desulfuromonas thiophila* sp. nov., a New Obligately Sulfur-Reducing Bacterium from Anoxic Freshwater Sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 47, p. 754-758, 1997.

FUDOU, R.; JOJIMA, Y.; IIZUKA, T.; YAMANAKA, S. *Haliangium ochraceum* gen. nov., sp. nov. and *Haliangium tepidum* sp. nov.: Novel moderately halophilic myxobacteria isolated from coastal saline environments. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 48, p. 109–115, 2002.

GARCÍA-FRAILE, P.; VELÁZQUEZ, E.; MATEOS, P.F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; RIVAS, R. *Cohnella phaseoli* sp. nov., isolated from root nodules of *Phaseolus coccineus* in Spain, and emended description of the genus *Cohnella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 1855–1859, 2008.

GARCIA, R.O.; REICHENBACH, H.; RING, M.W.; MULLER, R. *Phaselicystis flava* gen. nov., sp. nov., an arachidonic acid-containing soil myxobacterium, and the description of *Phaselicystidaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, p. 1524–1530, 2009.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LIBURUN, T.G. Taxonomic Outline of Prokaryotes. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, second ed. Springer, New York, 2004.

GREENE, A.C.; PATEL, B.K.C.; YACOB, S. *Geoalkalibacter subterraneus* sp. nov., an anaerobic Fe(III)- and Mn(IV)-reducing bacterium from a petroleum reservoir, and emended descriptions of the family Desulfuromonadaceae and the genus *Geoalkalibacter*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, p. 781–785, 2009.

HEYRMAN, J.; VANPARYS, B.; LOGAN, A. N.; BALCAEN, A.; DIAZ, M. R.; ANDREAS FELSKÉ, P. *Bacillus novalis* sp. nov., *Bacillus vireti* sp. nov., *Bacillus soli* sp. nov., *Bacillus bataviensis* sp. nov. and *Bacillus drenensis* sp. nov., from the Drentse A grasslands. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 47–57, 2004.

HIRSCH, A.M.; VALDÉS, M. *Micromonospora*: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 42, p. 536 – 542, 2010.

IMACHI, H.; SEKIGUCHI, Y.; KAMAGATA, Y.; LOY, A.; QIU, Y.L.; HUGENHOLTZ, P.; KIMURA, N.; WAGNER, M.; OHASHI, A.; HARADA, H. Non-Sulfate-Reducing, Syntrophic Bacteria Affiliated with *Desulfotomaculum* Cluster I Are Widely Distributed in Methanogenic Environments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 2080–2091, 2006.

JIANG, D.M.; ZHAO, L.; ZHANG, C.Y.; LI, J.; XIA, Z.J.; WANG, J.; WU, Z.H.; LI, Y.Z. Taxonomic analysis of *Sorangium* strains based on HSP60 and 16S rRNA gene sequences and morphology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 2654–2659, 2008.

KALYUZHNAIA, M.G.; DE MARCO, P.M.; BOWERMAN, S.; PACHECO, C.C.; LARA, J.C.; LIDSTROM, M.E.; CHISTOSERDOVA, L. *Methyloversatilis universalis* gen. nov., sp. nov., a novel taxon within the Betaproteobacteria represented by three methylotrophic isolates. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 2517–2522, 2006.

KASHEFI, K.; HOLMES, D. E.; BAROSS, J.A.; DEREK, R.; LOVLEY, D.R. Thermophily in the *Geobacteraceae*: *Geothermobacter ehrlichii* gen. nov., sp. nov., a Novel Thermophilic Member of the "Bag City" hydrothermal vent. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 2985-2993, 2003.

KIM, J.M.; LE, N.T.; CHUNG, B.S.; PARK, J.H.; BAE, J.W.; MADSEN, E.L.; JEON, C.O. Influence of Soil Components on the Biodegradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and *o*-, *m*-, and *p*-Xylenes by the Newly Isolated Bacterium *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 74, 7313–7320, 2008.

KISHIMOTO, N.; KOSAKO, Y.; TANO, T. *Acidobacterium capsulatum* gen. nov., sp. nov." An Acidophilic Chemoorganotrophic Bacterium Containing Menaquinone from Acidic Mineral Environment. **Current Microbiology**, New York, v. 22, p. 1 – 7, 1991.

KOCH, I.H.; GICH, F.; DUNFIELD, P. F.; OVERMANN, J. *Edaphobacter modestus* gen. nov., sp. nov., and *Edaphobacter aggregans* sp. nov., acidobacteria isolated from alpine and forest soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading v. 58, p. 1114–1122, 2008.

KURAHASHI, M.; FUKUNAGA, Y.; SAKIYAMA, Y.; HARAYAMA, S.; YOKOTA, A. *Iamia majanohamensis* gen. nov., sp. nov., na actinobacterium isolated from sea cucumber *Holothuria edulis*, and proposal of Iamiaceae fam. nov.. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, p. 869–873, 2009.

LEE, Y.J.; ROMANEK, C.S.; MILLS, G.L.; DAVIS, R.C.; WHITMAN, W.B.; WIEGEL, J. *Gracilibacter thermotolerans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermotolerant bacterium from a constructed wetland receiving acid sulfate water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 2089–2093, 2006.

LEE, Y.J.; WAGNER, I.D.; BRICE, M.E.; KEVBRIN, V.V.; MILLS, G.L.; ROMANEK, C.S.; WIEG, J. *Thermosediminibacter oceani* gen. nov., sp. nov. and *Thermosediminibacter litoriperuensis* sp. nov., new anaerobic thermophilic bacteria isolated from Peru Margin. **Extremophiles**, New York, v. 9, p. 375–383, 2005.

MCDONALD, I. R.; UCHIYAMA, H.; KAMBE, S.; YAGI, O.; MURRELL, J.C. The Soluble Methane Monooxygenase Gene Cluster of the Trichloroethylene-Degrading Methanotroph *Methylocystis* sp. Strain M. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 1898–1904, 1997.

MAYILRAJ, S.; KAKSONEN, A.H.; CORD-RUWISCH, R.; SCHUMANN, P.; SPROER, C.; TINDALL, B.J.; SPRING, S. *Desulfonauticus autotrophicus* sp. nov., a novel thermophilic sulfate-reducing bacterium isolated from oil-production water and emended description of the genus *Desulfonauticus*. **Extremophiles**, New York, v. 13, p. 247–255, 2009.

MORI, K.; SUZUKI, K.I. *Thiofaba tepidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel obligately chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium of the *Gammaproteobacteria* isolated from a hot spring. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 1885–1891, 2008.

NAKAMURA, K.; HIRAISHI, A.; YOSHIMI, Y.; KAWAHARASAKI, M.; MASUDA, K.; KAMAGATA, Y. *Microlunatus phosphovoms* gen. nov., sp. nov., a New Gram-Positive Polyphosphate-Accumulating Bacterium Isolated from Activated Sludge. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reding, v. 45, p. 17 – 22, 1985.

NOAR, J.D.; BUCKLEY, D.H. *Ideonella azotifigens* sp. nov., an aerobic diazotroph of the *Zetaproteobacteria* isolated from grass rhizosphere soil, and emended description of the genus *Ideonella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, p. 1941–1946, 2009.

PERIN, L.; BALDANI, J.I.; REIS, V.M. Diversidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolada de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília. v. 39, p. 763-770, 2004.

RAMANA, V.V.; KAPOOR, S.; SHOBHA, E.; RAMPRASAD, E. V. V.; SASIKALA, C.; RAMANA, V. *Blastochloris gulmargensis* sp. nov., isolated from an epilithic phototrophic biofilm. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 61, p. 1811–1816, 2011.

RAMAMOORTHY, S.; SASS, H.; LANGNER, H.; SCHUMANN, P.; KROPPESTEDT, S.M.; SPRING, S.; OVERMANN, J.; ROSENZWEIG, R.F. *Desulfosporosinus lacus* sp. nov., a sulfate reducing bacterium isolated from pristine freshwater lake sediments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 2729–2736, 2006.

RAVI, H. N.; SHANKAR, I. R.; NEW, P.B. Autotrophic Growth and Nitrogen Fixation in *Derxia gummosa*. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 132, p.1797-1803, 1986.

RICHTER, H.; LANTHIER, M.; NEVIN, K.P.; LOVLE, D.R. Lack of Electricity Production by *Pelobacter carbinolicus* Indicates that the Capacity for Fe(III) Oxide Reduction Does Not Necessarily Confer electron Transfer Ability to Fuel Cell Anodes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 5347–5353, 2007.

RIVAS, R.; MATEOS, P.F.; MOLINA, E.M.; VELÁZQUEZ, E. *Paenibacillus phyllosphaerae* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from the phyllosphere of *Phoenix dactylifera*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p.743–746, 2005.

RIVAS, R.; VELAZQUEZ, E.; WILLEMS, A.; VIZCAÍNO, N.; RAO, N.S.S.; MATEOS, P.F.; GILLIS, M.; DAZZO, F.B.; MOLINA, M.E. A New Species of *Devosia* That Forms a Unique Nitrogen-Fixing Root-Nodule Symbiosis with the Aquatic Legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 5217–5222, 2002.

SANFORD, R.A.; COLE, J.R.; TIEDJE, J.M. Characterization and Description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an Aryl-Halo-respiring Facultative Anaerobic *Myxobacterium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 893–900, 2002.

SEKIGUCHI, Y.; MURAMATSU, M.; IMACHI, H.; NARIHIRO, T.; OHASHI, A.; HARADA, H.; HANADA, S.; KAMAGATA, Y. *Thermodesulfovibrio aggregans* sp. nov. and *Thermodesulfovibrio thiophilus* sp. nov., anaerobic, thermophilic, sulfate-reducing bacteria isolated from thermophilic methanogenic sludge, and emended description of the genus *Thermodesulfovibrio*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 2541–2548, 2008.

SHANKAR, H.N.R.; KENNEDY, I.R.; NEW, P.B. Autotrophic Growth and Nitrogen Fixation in *Derxia gummosa*. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 132, p. 1797-1803, 1986.

SCHWIENSTEK, P.; SZCZEPANOWSKI, R.; RÜCKERT, C.; KALINOWSKI, J.; KLEIN, A.; SELBER, K.; WEHMEIER, U.F.; STOYE, J.; PÜHLER, A. The complete genome sequence of the acarbose producer *Actinoplanes* sp. SE50/110. **BMC Genetics**, London, v. 13, p. 112-130, 2012.

SLY, L.I.; ARUNPAIROJANA, V. Isolation of manganese-oxidizing *Pedomicrobium* cultures from water by micromanipulation. **Journal of Microbiological Methods**, Langford Lane, v. 6, p. 177 – 182, 1987.

SOKOLOVA, T.; HANEL, J.; ONYENWOKE R.U.; REYSENBACH, A.L.; BANTA, A.; GEYER, R.; GONZALEZ, J.M.; WHITMAN, W.B.; WIEGEL, J. Novel chemolithotrophic, thermophilic, anaerobic bacteria *Thermolithobacter ferrireducens* gen. nov., sp. nov. and *Thermolithobacter carboxydivorans* sp. nov. **Extremophiles**, New York, v. 11, p. 145–157, 2007.

SUN,B.; COLE, R. J.; TIEDJ, J. M. *Desulfomonile limimaris* sp. nov., an anaerobic sediments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 365–371, 2001.

TAMURA, T.; ISHIDA, Y.; NOZAWA, Y.; OTOGURO, M.; SUZUKI, K.I. Transfer of *Actinomadura spadix* Nonomura and Ohara 1971 to *Actinoallomurus spadix* gen. nov., comb. nov., and description of *Actinoallomurus amamiensis* sp. nov., *Actinoallomurus caesius* sp. nov., *Actinoallomurus coprocola* sp. nov., *Actinoallomurus fulvus* sp. nov., *Actinoallomurus iriomotensis* sp. nov., *Actinoallomurus luridus* sp. nov., *Actinoallomurus purpureus* sp. nov. and *Actinoallomurus yoronensis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, p. 1867–1874, 2009.

TANG. K.H.; YUE, H.; BLANKENSHIP, R. E. Energy metabolism of *Heliobacterium modesticaldum* during phototrophic and chemotrophic growth. **BMC Microbiology**, London, 10:150, 2010.

TARLERA, S.; DENNER, E.B.M. *Sterolibacterium denitrificans* gen. nov., sp. nov., a novel cholesterol-oxidizing, denitrifying member of the β -Proteobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p. 1085–1091, 2003.

URAKAMI, T.; SASAKI, J.; KEN-ICHIRO, S.; KOMAGATA, K. Characterization and Description of *Hyphomicrobium denitripcans* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 45, p. 528 – 532, 1995.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; GUTIÉRREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J.M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p. 1979-1983, 2003.

VALVERDE, A.; DELVASTO, P.; PEIX, A.; VELÁZQUEZ, E.; SANTA-REGINA, I.; BALLESTER, A.; BARRUECO, C. R.; BALBOA, C. G.; IGUAL, J. M. *Burkholderia ferrariae* sp. nov., isolated from an iron ore in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 2421–2425, 2006.

VASILYEVA, L.V. *Stella*, a New Genus of Soil Prostheco bacteria, with Proposals for *Stella humosa* sp. nov. and *Stella vacuolata* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 35, p. 518-521, 1985.

VOROB'EV, A.V.; BOER, W.; FOLMAN, L.B.; BODELIER, P.L.E.; DORONINA, N.V.; SUZINA, N.E.; TROTSSENKO, Y.A.; DEDYSH, S.N. *Methylovirgula ligni* gen. nov., sp. nov., an obligately acidophilic, facultatively ethylotrophic bacterium with a highly divergent *mxrA* gene. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, p. 2538–2545, 2009.

WANG, J.; JENKINS, C.; WEBB, L. R.; FUERST, J. A. Isolation of *Gemmata*-Like and *Isosphaera*-Like Planctomycete Bacteria from Soil and Freshwater. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 417– 421, 2002.

WEON, H.Y.; KIM, B.Y.; SON, J.A., JANG, H.B.; HONG, S.K.; GO, S.J.; KWON, S.W. *Massilia aerilata* sp. nov., isolated from an air sample **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 1422 – 1425, 2008.

WHITE, D. C.; SUTTONT, S. D.; RINGELBERG, D.B. The genus *Sphingomonas*: physiology and ecology. **Current Opinion in Biotechnology**, Amsterdam, v. 7, p. 301-306, 1996.

XIE, C.H.; YOKOTA, A. *Pleomorphomonas oryzae* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from paddy soil of *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 1233–1237, 2005.

YAMADA, T.; SEKIGUCHI, Y.; IMACHI, H.; KAMAGATA, Y.; OHASHI, A.; HARADA, H. Diversity, Localization, and Physiological Properties of Filamentous Microbes Belonging to *Chloroflexi* Subphylum I in Mesophilic and Thermophilic Methanogenic Sludge Granules. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 7493–7503, 2005.

ZHANG, H.; SEKIGUCHI, Y.; HANADA, S.; HUGENHOLTZ, P.; KIM, H.; KAMAGATA, Y.; NAKAMURA, K. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphateaccumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p. 1155–116, 2003.