**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Diversidade de *Bacteria* e *Archaea* em Espodossolos do litoral do Estado de
São Paulo**

Kelly Justin da Silva

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba

2010

Kelly Justin da Silva
Engenheiro Agrônomo

Diversidade de *Bacteria* e *Archaea* em Espodossolos do litoral do Estado de São Paulo

Orientador:
Prof. Dr. **MARCIO RODRIGUES LAMBAIS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba

2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Silva, Kelly Justin da
Diversidade de *Bacteria* e *Archaea* em Espodossolos do litoral do Estado de São Paulo /
Kelly Justin da Silva. - - Piracicaba, 2010.
72 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Bactérias 2. Espodossolos 3. Matéria orgânica do solo 4. Microbiologia do solo 5
Pseudomonas 6. Restinga I. Título

CDD 631.46
S586d

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais, Carlos e Rosane, ao meu irmão Abel e ao meu
namorado Rafael, **DEDICO**.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e à fé necessária para seguirmos.

A meus pais, Carlos Abel e Maria Rosane, pelo amor incondicional, carinho, conselhos e milhões de minutos ao telefone para matar a saudade.

A meu irmão, Abel, pelo amor, carinho e amizade.

Ao meu amor, Rafael de Armas, pela dedicação, paciência, conselhos e também ajuda na elaboração deste trabalho.

Às amigas e companheiras da república MinaSul Ana Paula Neto e Adriene Pedroza.

Aos amigos e amigas do Rio Grande do Sul, por não me deixarem esquecer a tradição do pago.

Ao Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais, pela orientação.

Ao Prof. Dr. Pablo Vidal-Torrado, pela orientação nos trabalhos a campo.

Ao Prof. Dr. Marino Tedesco, pela amizade e exemplo.

À FAPESP, pela bolsa concedida.

À Coordenação do PPG-Microbiologia Agrícola e à ESALQ, pela oportunidade.

Aos técnicos de laboratório, Wladimir, Denise, Fernando, Fátima e Luiz pelo auxílio.

Aos colegas de laboratório, Adriano, Alice, Elisa, Joze, Gisele, Giselle, Maryeimy, Rafael V., Sandra, Silvia, Thiago, Vivian e Winston, pelo convívio.

“Daí toda a diferença do Rio Grande – entre os demais, aparentemente iguais no patriotismo e na crença, mas há uma distância imensa que nos parte pelo meio, curtidos no pastoreio, entre o fogo e a fumaça, somos cruza de outra raça e gado de outro rodeio”

Jayme Caetano Braun.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 DESENVOLVIMENTO	21
2.1 Material e Métodos	21
2.1.1 Área de estudo e amostragem	21
2.1.2 Análises químicas	25
2.1.3 Extração do DNA metagenômico	26
2.1.4 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE)	26
2.1.5 Análise estatística dos perfis de bandas após PCR-DGGE	27
2.1.6 Clonagem e sequenciamento do gene rRNA 16S	27
2.1.7 Análise das sequências do gene rRNA 16S	29
2.2 Resultados e discussão	31
2.2.1 Caracterização química do solo	31
2.2.2 Estrutura de comunidades e diversidade de <i>Bacteria</i> em Espodossolos	35
2.2.2.1 Análises de PCR-DGGE	35
2.2.2.2 Análises das comunidades bacterianas nas manchas brancas através do sequenciamento de clones do gene rRNA 16S	41
2.2.3 Estrutura de comunidades e diversidade de <i>Archaea</i> em Espodossolos	51
2.2.3.1 Análises de PCR-DGGE	51
2.2.3.2 Análises das comunidades de arqueas nas manchas brancas através do sequenciamento de clones do gene rRNA 16S	58
3 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	65

RESUMO

Diversidade de *Bacteria* e *Archaea* em Espodossolos do litoral do Estado de São Paulo

Espodossolos são formados pelo processo de podzolização, o qual envolve a migração de complexos organometálicos ao longo do perfil do solo. No Brasil, esses solos ocorrem principalmente nas planícies litorâneas e região norte da Amazônia. Espodossolos bem-drenados podem apresentar manchas brancas empobrecidas em matéria orgânica, em relação às áreas adjacentes, nos horizontes mais profundos. Tem sido sugerido que essas manchas se desenvolvem pela degradação seletiva da matéria orgânica por micro-organismos do solo. No entanto, os micro-organismos que participam desse processo não são conhecidos. O presente estudo teve como objetivo comparar a estrutura de comunidades e a diversidade de *Bacteria* e *Archaea* nas manchas brancas, em relação ao solo adjacente. Foram estudados três perfis de Espodossolos, nas cidades de Bertioxa (BT) e Ilha Comprida (IC1 e IC2), no Estado de São Paulo. Em cada perfil foram amostrados os horizontes característicos, e nos horizontes mais profundos foram coletadas amostras das manchas brancas (M) e do solo adjacente às mesmas (S). Foram avaliados os atributos químicos do solo, bem como a estrutura das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* por PCR-DGGE e sequenciamento parcial do gene rRNA 16S. Os Espodossolos foram caracterizados como muito ácidos e pobres em nutrientes. A análise da estrutura das comunidades de procariotos por PCR-DGGE mostrou comunidades distintas de *Bacteria* e *Archaea* ao longo do perfil dos solos estudados. Porém, apenas a estrutura de comunidades bacterianas apresentou diferenças significativas nas manchas brancas, em relação ao solo adjacente. Com base no sequenciamento de clones do gene rRNA 16S, as comunidades bacterianas dos três perfis avaliados apresentaram menor diversidade nas manchas brancas em relação ao solo adjacente, sugerindo que nas manchas ocorreu a seleção de grupos específicos. Nas manchas brancas do perfil BT predominaram UTOs associadas ao filo *Proteobacteria*, com dominância de UTOs filogeneticamente associadas à *Pseudomonas*. Já nos perfis IC1 e IC2 predominaram UTOs associadas à *Acidobacteria* nas manchas brancas. Tanto *Pseudomonas* quanto *Acidobacteria* possuem alta capacidade metabólica e podem estar envolvidas na degradação seletiva da matéria orgânica durante a formação das manchas brancas. O sequenciamento de clones de *Archaea* mostrou a predominância de UTOs filogeneticamente relacionadas à *Crenarchaeota*, tanto nas manchas brancas como no solo adjacente, e que não houve diferenças significativas entre comunidades das manchas brancas em relação ao solo adjacente. Porém, as comunidades de *Archaea* dos diferentes locais de amostragem foram diferentes estatisticamente. Dessa forma, pode-se concluir que bactérias, principalmente *Pseudomonas* e *Acidobacteria* poderiam estar envolvidas na formação de manchas brancas em Espodossolos, e que a seleção de grupos bacterianos específicos nas manchas pode depender de condições ambientais específicas.

Palavras-chave: PCR-DGGE; rRNA 16S; *Pseudomonas*; *Acidobacteria*; *Crenarchaeota*; Espodossolos; Matéria orgânica

ABSTRACT

Diversity of *Bacteria* and *Archaea* in Podzols at coast São Paulo

Podzolic soil formation involves the migration of organometallic complexes along the soil profile, the so called podzolization process. In Brazil, podzols are observed mainly in the coastal plains and north Amazonia. Well-drained podzols often show organic matter depleted bleached mottles in deeper horizons, and it has been suggested that development of these mottles is due to the selective degradation of the organic matter by soil microorganisms. However, the microorganisms involved in this process are not known. The goal of the present study is to compare the *Bacteria* and *Archaea* community structures and diversity in bleached mottles and their immediate vicinity in different podzolic soil profiles. Three podzolic soil profiles, located in Bertioiga (BT) and Ilha Comprida (IC1 and IC2), São Paulo State, were studied. In each profile, samples were taken from the characteristic horizons, and from bleached mottles (M) and their immediate vicinity (S) in the deeper horizons. Chemical attributes of the soil samples, as well as *Bacteria* and *Archaea* community structure using PCR-DGGE and partial sequencing of the 16S rRNA gene were evaluated. The Podzols were characterized as very acidic and dystrophic. The analysis of the prokaryotic communities using PCR-DGGE showed distinct communities of *Bacteria* and *Archaea* along the soil profiles studied. However, only the bacterial community structures in the bleached mottles showed statistically significant differences from the communities in their immediate vicinity. Based on the analyses of 16S rRNA gene clone libraries, the bacterial communities from the three soil profiles evaluated showed lower levels of diversity in the bleached mottles, as compared to their immediate vicinities, suggesting the occurrence of selection of specific microorganisms. In the bleached mottles of the BT profile, OTUs assigned to *Proteobacteria* were the most abundant, with predominance of OTUs phylogenetically associated with *Pseudomonas*, whereas in the IC profiles, OTUs phylogenetically related to *Acidobacteria* predominate in the bleached mottles. *Pseudomonas* and *Acidobacteria* are known for their high metabolic capabilities and may be involved in the selective degradation of the organic matter during the development of the bleached mottles. Archaeal clone library sequencing showed the predominance of *Crenarchaeota* in the bleached mottles as well as in their immediate vicinity. No statistically significant differences between the archaeal community structure in the bleached mottles and their vicinities were observed in the soil profiles studied. However, the archaeal communities in BT and IC were significantly different. In conclusion, this study showed that *Pseudomonas* and *Acidobacteria* may be involved in the development of bleached mottles in Podzols, and that the selection of specific bacterial groups in the bleached mottles may depend on specific edaphic conditions.

Keywords: PCR-DGGE; 16S rRNA; *Pseudomonas*; *Acidobacteria*; *Crenarchaeota*; Podzols; Organic matter

1 INTRODUÇÃO

Os ambientes de restinga constituem importantes ecossistemas para a manutenção da vida marinha e terrestre ao longo da costa brasileira. Considerando a sua estrutura e a dinâmica dos processos que garantem o equilíbrio do sistema ecológico, as restingas são especialmente frágeis frente às intervenções antrópicas. Embora protegidos por lei, a pressão pelo uso urbano e agrícola desses ambientes se faz presente em muitos municípios litorâneos brasileiros.

Inúmeros estudos de caracterização botânica e biogeografia florística foram desenvolvidos nos ambientes de restingas paulistas, no entanto, são poucos os relatos dos solos costeiros, principalmente se considerarmos a classe de solos de maior ocorrência nesses ambientes que são os Espodossolos. Para esta classe de solos, os processos envolvidos na sua formação, genericamente conhecidos como podzolização, têm sido intensivamente estudados desde o final do século XIX, principalmente em regiões de clima frio ou temperado úmido.

Os Espodossolos são conhecidos também como Podzóis, termo amplamente utilizado em outros sistemas de classificação para caracterizar solos desenvolvidos a partir de sedimentos arenosos de regiões temperadas do Hemisfério Norte. O termo Podzol, utilizado em 1979 por Dockuev na Rússia, é constituído de “pod” significando sob, e “zola” significando cinza (McKEAGUE et al., 1983; DRIESSEN; DUDAL, 1989).

Esses solos ocorrem em aproximadamente 485 milhões de hectares em todo o mundo, principalmente em regiões de clima temperado do Hemisfério Norte, mas também em regiões tropicais, em menores proporções (DRIESSEN, 2001). Em todos os locais de ocorrência, são solos ácidos e de baixa fertilidade natural. No Brasil esses solos são encontrados principalmente nas planícies litorâneas e em algumas regiões no Norte da Amazônia, totalizando 14 milhões de hectares (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2005). Abrangem quase todas as regiões menos o Sul do país. Os Espodossolos estão distribuídos em 59,3% na região Norte, 16,3% no Centro-Oeste, 12,8% no Nordeste e 11,6% no Sudeste (BENEDETTI et al., 2008). Esse mesmo estudo mostrou que 75% dos Espodossolos do banco de dados foram descritos em altitudes iguais ou menores que 110 m, e que 92% de seus perfis estão localizados na zona tropical úmida (A), sendo 43% em domínio do clima Af, que se caracteriza

por uma boa distribuição de chuvas durante o ano e ausência de estação seca, clima típico da região da Amazônia ocidental (BOTTON et al., 2002).

De acordo com o atual Sistema Brasileiro de Classificação de Solos – SiBCS (EMBRAPA, 2006), os Espodossolos são constituídos por material mineral e apresentam horizonte B espódico, como horizonte diagnóstico (Bh, Bhs ou Bs) abaixo de quaisquer horizontes A ou E ou horizonte hístico com menos de 40 cm de espessura. Os horizontes B espódicos são formados pelo acúmulo de compostos amorfos de alumínio e ferro iluviados associados a materiais orgânicos. De forma geral, os horizontes espódicos ocorrem dentro de 200 cm a partir da superfície do solo ou 400 cm se os horizontes A + E ou hístico + E apresentam espessura superior a 200 cm. Os horizontes B espódicos podem se apresentar cimentados por matéria orgânica e alumínio, com ou sem ferro, onde são denominados “orsteins” (EMBRAPA, 2006). Os podzóis podem apresentar os seguintes horizontes: horizonte superficial com acúmulo de resíduos orgânicos (O), horizonte húmico com homogeneização biológica (Ah), horizonte eluvial de cor clara (E), horizonte com acúmulo de material orgânico ligado a ferro ou alumínio (Bh, Bhs, Bs) e faixas estreitas de acumulação de material orgânico no subsolo (BREEMEN; BUURMAN, 2002).

A Ordem dos Espodossolos está dividida em Espodossolos Humilúvicos, Ferrilúvicos ou Ferrihumilúvicos, de acordo com o acúmulo de matéria orgânica e ferro e coloração ferruginosa apresentada nos horizontes espódicos (EMBRAPA, 2006). Entretanto, esta terminologia é de certa forma contraditória aos resultados de trabalhos realizados com Espodossolos no Brasil, os quais mostram ser o alumínio, acompanhado da matéria orgânica, o principal elemento envolvido neste processo, uma vez que o ferro (Fe_2O_3) tem sido encontrado em quantidades muito pequenas. Trabalhos que corroboram esses dados foram realizados com Espodossolos na Ilha do Cardoso - SP (GOMES et al., 2007), no Parque Estadual do Ibitipoca – MG (DIAS et al., 2003) e em Bertoga – SP (MARTINS, 2009).

Buurman e Jongmans (2005) consideram que as teorias correntes que explicam o processo de formação dos Espodossolos, a podzolização, são baseadas em três processos não exclusivos mutuamente: (1) mobilização de complexos orgânico-metálicos não saturados dos horizontes A ou E, seguido de precipitação no horizonte B após saturação do complexo por metais (teoria do fulvato) (2) transporte de géis de alofana e proto-imogolita, com subsequente precipitação no horizonte B e adsorção ao húmus móvel (teoria da proto-imogolita); e (3) formação *in situ* de imogolita/alofana no horizonte Bs pela ação do ácido carbônico e subsequente ou concomitante

acumulação de ácidos fúlvicos nos precipitados ricos do horizonte Bs (teoria do fulvato-bicarbonato).

Espodossolos sobre areias quartzosas bem drenadas podem apresentar manchas brancas em todos os horizontes, mas principalmente nos horizontes espódicos. As manchas brancas são individualizadas, pobres em matéria orgânica e separadas por uma área adjacente de maior teor de matéria orgânica (BUURMAN et al., 2007). Estudos de caracterização da microbiota em Espodossolos, bem como a sua relação com os processos de formação das manchas brancas são escassos. Pela análise do perfil de ácidos graxos de fosfolipídeos (PLFA), Buurman et al. (2007) observaram que as manchas brancas de cinco perfis de podzóis do sul da Holanda apresentaram grande quantidade de fungos e/ou actinomicetos, se comparado a bactérias. Entretanto as diferenças observadas não foram significativas estatisticamente.

A variação nos perfis de PFLA e compostos orgânicos, observados nas manchas brancas e áreas adjacentes, sugerem uma complexa sucessão de populações microbianas durante a degradação seletiva da matéria orgânica. Além disso, Buurman et al. (2007) avaliaram a matéria orgânica das manchas brancas por pirólise-GC/MS e observaram que as manchas brancas são enriquecidas com metilcetonas (C_{25} , C_{27} e C_{29}), o que pode refletir um aumento de populações microbianas capazes de oxidar alcanos. Porém, compostos fenólicos resultantes da pirólise de aminoácidos, taninos ou lignina, não foram detectados nas manchas brancas. Uma menor concentração de siringol nas manchas brancas, se comparado a guaiacol, também foi observada. Esses dados sugerem que nas manchas brancas ocorre seleção de populações de micro-organismos específicos capazes de degradar moléculas orgânicas complexas, embora o papel das populações microbianas envolvidas no desenvolvimento das manchas brancas ainda não tenha sido avaliado.

Bacteria e *Archaea* são os domínios dentro do grupo dos procariotos, bastante abundantes, e responsáveis por inúmeras transformações no solo. Bactérias são mais estudadas do que arqueas, provavelmente pela maior facilidade em cultivá-las e pelo maior conhecimento de suas exigências nutricionais.

Micro-organismos do domínio *Bacteria* são possivelmente os mais abundantes no planeta (TORSVIK; ØVREÅS, 2002) e estão distribuídos em 53 filos (RAPPE; GIOVANNONI, 2003). As bactérias podem ter papéis importantes no solo como: degradação da matéria orgânica, nitrificação, desnitrificação, fixação biológica do N_2 , e oxidação/redução de enxofre, ferro,

manganês, entre outros (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). O primeiro trabalho realizado para estimar a diversidade de bactérias no solo, utilizando técnicas moleculares, apontou para aproximadamente 10.000 espécies de bactérias por grama (TORSVIK et al., 1990). Gans, Wolinsky e Dunbar (2005), também trabalhando com técnicas moleculares, estimaram em 100.000.000 de espécies de procariotos por grama de solo. Porém um estudo mais recente, utilizando pirosequenciamento com amostras de solo de quatro locais diferentes (Rio Grande do Sul, Flórida, Illinois e Ontário), com 25 mil clones de cada local, sugere que a riqueza de bactérias no solo não seja maior que 52.000 espécies em um grama (ROESCH et al., 2007).

O domínio *Archaea* foi dividido inicialmente em dois filós, *Crenarchaeota* que contém as arqueas hipertermofílicas redutoras de enxofre e *Euryarchaeota* que compreende as espécies metanogênicas, halofílicas extremas e algumas hipertermofílicas (WOESE; FOX, 1977). Mais recentemente foram propostos mais dois filós para classificação das arqueas, *Korarchaeota* que engloba organismos hipertermofílicos isolados de fontes termais terrestres, porém ainda não cultivados em laboratório (HUBER et al., 2002) e o filo *Nanoarchaeota* que compreende os hipertermofílicos, parasitas de *Ignicoccus* (WATERS et al., 2003). As arqueas compreendem aproximadamente 10% dos filotipos dos bancos de dados genômicos, e representam importantes papéis nos ciclos energéticos globais (ROBERTSON et al., 2005), principalmente na transformação de carbono e nitrogênio (GATTINGER et al., 2006).

A riqueza de micro-organismos do solo caracteriza o mesmo como um ambiente muito complexo, pois cada grupo possui necessidades nutricionais e ambientais distintas, dessa forma, uma grande variedade de microambientes coexiste no solo. Nesse ecossistema, a diversidade e as estruturas das comunidades microbianas podem ser controladas por propriedades do solo como, material de origem, quantidade e qualidade da matéria orgânica, saturação com água, granulometria, características químicas e também pela vegetação (AGNELLI et al., 2004; SESSITSCH et al., 2001). Em vista disso, compreender a relação entre a comunidade microbiana e o funcionamento desses ecossistemas é um dos maiores desafios da microbiologia do solo atualmente.

Os estudos sobre ecologia microbiana do solo têm avançado muito com a utilização de métodos moleculares independentes de cultivo, considerando-se que mais de 99% dos micro-organismos do solo não são cultiváveis (MALIK et al., 2008). Dentro das técnicas moleculares, as de *fingerprinting* são utilizadas a fim de se obter uma ampla caracterização da estrutura das

comunidades microbianas. Em estudos de ecologia microbiana essas técnicas vêm sendo muito utilizadas, devido à rapidez na obtenção de resultados que permitem avaliar muitas amostras de um ou mais ambientes simultaneamente.

Uma das técnicas de *fingerprinting* é a de PCR-DGGE (eletroforese em gel com gradiente desnaturante), a qual consiste na amplificação de fragmentos do gene rRNA 16S a partir do DNA metagenômico e separação dos amplicons, baseado no conteúdo de G+C, por eletroforese em gel com gradiente desnaturante, gerando um perfil de bandas que representa a estrutura da comunidade microbiana (AGNELLI et al., 2004). A PCR-DGGE é uma técnica para análise comparativa, sendo que amostras com padrões de bandamento de amplicons diferentes caracterizam estruturas de comunidades distintas (LAMBAIS et al., 2005). Outra técnica amplamente utilizada para a caracterização da comunidade microbiana é o sequenciamento de clones do gene rRNA 16S (RONAGHI; UHLÉN; NYRÉN, 1998). Essas técnicas, associadas a algoritmos estatísticos específicos, permitem a comparação precisa das comunidades microbianas e sua relação com variáveis ambientais (LAMBAIS et al., 2005; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2006).

Ambientes como os Espodossolos de restinga, cujas comunidades microbianas são pouco conhecidas, podem representar grandes bancos genéticos para a pesquisa e desenvolvimento de produtos biotecnológicos, considerando-se que os micro-organismos representam as formas de vida mais abundantes e diversificadas do planeta, e detêm a maior proporção da diversidade genética existente (LAMBAIS et al., 2005).

A hipótese desse estudo é que o desenvolvimento das manchas brancas, em Espodossolos, pode estar relacionado à atividade de grupos específicos de *Bacteria* e/ou *Archaea*, nas manchas em relação ao solo adjacente.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar as comunidades de *Bacteria* e *Archaea* nas manchas brancas e compará-las com as do solo adjacente, em três perfis de Espodossolos, através de PCR-DGGE e sequenciamento de clones do gene rRNA 16S, a fim de estabelecer uma relação entre a ocorrência de micro-organismos específicos e a formação das manchas brancas.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e Métodos

2.1.1 Área de estudo e amostragem

Este estudo foi realizado em Espodossolos de Bertioga (SP) e Ilha Comprida (SP), distantes aproximadamente 300 km (Figura 1). Em Bertioga foram coletadas amostras de um perfil (BT) e em Ilha Comprida de dois perfis (IC1 e IC2), a fim de comparar a diversidade microbiana nas manchas brancas e no solo adjacente, em diferentes regiões e também entre perfis do mesmo local. Em Bertioga, o perfil encontra-se na praia de Itaguapé (23°46'44S, 45°58'17W) (Figura 2), e em Ilha Comprida, na localidade de Trincheira estão o Perfil 1 (IC1 - 25°03'08.89S, 47°54'48.34W) e Perfil 2 (IC2 - 25°03'09.60S, 47°54'27.86W) (Figura 3). As amostras de solo foram coletadas no dia 12 de maio de 2008 em Bertioga e no dia 29 de abril de 2009 em Ilha Comprida. A vegetação predominante nestes dois locais é a restinga. As amostras foram coletadas de perfis de Espodossolos que apresentavam manchas brancas. Todos os horizontes discriminados foram amostrados, e nos horizontes mais profundos foram coletadas amostras das manchas brancas e do solo adjacente. Sendo em Bertioga no horizonte Bh (BT-S = solo adjacente; BT-M = mancha branca), em Ilha Comprida IC1 no horizonte Bh1 (IC1-S; IC1-M), e em IC2 no horizonte Bh (IC2-S; IC2-M). As amostras foram coletadas em triplicata (Figura 4). O solo coletado foi armazenado a 4 °C para análises químicas e a -80 °C para análises de DNA.

Figura 1 - Localização dos municípios de Ilha Comprida e Bertioga no litoral do Estado de São Paulo, Brasil

Figura 2 - Localização do perfil do Espodossolo estudado em Bertioga/SP

Figura 3 - Localização dos perfis (Perfil 1 “IC1” e Perfil 2 “IC2”) de Espodosolos estudados em Ilha Comprida/SP

Figura 4 - Perfis de Espodossolos estudados, com detalhes da coleta de solo. Letras representam os horizontes e números os pontos de coleta de solo. **A.** Perfil amostrado em Bertioga (BT); **B.** Perfil amostrado em Ilha Comprida (IC1); **C.** Perfil amostrado em Ilha Comprida (IC2); e **D.** detalhe das manchas brancas (D.1 em BT; D.2 em IC1; D.3 em IC2)

2.1.2 Análises químicas

As amostras de solo de BT e de IC foram secas em estufa a 60 °C, moídas e passadas em peneira de 2 mm. A caracterização química foi realizada em amostras de todos os horizontes discriminados dos Espodossolos em estudo. Os atributos foram mensurados conforme a metodologia proposta por Raij et al. (2001). Teores totais de ferro e alumínio (Fe_t e Al_t) foram determinados de acordo com o método EPA 3050 B, proposto pela Agência de Proteção Ambiental (USEPA) dos Estados Unidos (<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3050b.pdf>). Os teores totais de carbono (C), nitrogênio (N) e enxofre (S) foram determinados em analisador elementar Flash EA 1112 (Thermo Finningan Itália, Milão, Itália).

Os dados químicos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando-se o programa Assistat versão 7.5 Beta (ASSIS, 2009) e as médias comparadas pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

2.1.3 Extração do DNA metagenômico

O DNA metagenômico foi extraído utilizando-se o “Fast DNA kit” (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do DNA foi determinada por eletroforese em gel de agarose 0,5X TBE-0,8%, depois de corado com “Sybr Green” (Invitrogen, São Paulo, Brasil). A concentração do DNA foi determinada por fluorometria usando um fluorômetro Qubit (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

2.1.4 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE)

As análises das estruturas das comunidades de bactérias e arqueas, nos Espodossolos estudados, foram feitas por PCR-DGGE. A região V3 do gene rRNA 16S de *Bacteria* foi amplificada por PCR utilizando-se o DNA metagenômico extraído e os iniciadores BA338fGC (5' GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGA CTC CTA CGG GAG GCA GCA G 3') e UN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (ØVREÅS et al., 1997). A amplificação do gene rRNA 16S foi feita em solução tampão para DNA polimerase Taq contendo 0,2 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 1 U DNA polimerase Taq (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 5 pmol dos primers e 10 ng do DNA metagenômico. As condições de amplificação da PCR foram 5 min a 95 °C; 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C e 1 min a 72 °C e extensão final por 10 min a 72 °C. A concentração dos produtos da PCR (amplicons) foi determinada por fluorômetro Qubit (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

Para amplificação do gene rRNA 16S de *Archaea* foram utilizados os iniciadores ARCH21f (5' TTC YGG TTG ATC CYG CCI GA 3') e ARCH958r (5' YCC GCG GTT GA(I/C) TCC AAT T 3') (MOYER et al., 1998). Os amplicons resultantes foram utilizados como molde para uma nova amplificação com os iniciadores ARCH340fGC (5' CGC CCG CCG CGC GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC CTA CGG GGY GCA SCA G 3') e ARCH519r (5' TTA CCG CGG CKG CTG 3') (ØVREÅS et al., 1997). As amplificações foram feitas nas

mesmas condições descritas para *Bacteria*. A amplificação foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf), nas seguintes condições: 95 °C por 5 min, 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 53 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 min; 72 °C por 6 min. A quantificação dos amplicons resultantes foi feita conforme descrito acima para *Bacteria*.

Quantidades iguais de amplicons (300 ng) foram analisadas através de eletroforese em gel com 8% (m/v) de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1, m:m), contendo um gradiente de 15 a 55% de formamida e uréia (ØVREÅS et al., 1997). A eletroforese foi realizada à 200 V e 60 °C constantes, utilizando-se um sistema “DCode” (BioRad, Hercules, CA, USA), e tampão 1X TAE buffer. O DNA foi corado com “Sybr Green” (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e a aquisição das imagens dos géis foi feita por densitometria usando um densitômetro a laser Storm 845 (GE Healthcare, Waukesha, Wisconsin, USA). Os perfis de amplicons foram analisados com o programa “Diversity Database” (BioRad, Hercules, CA, USA).

2.1.5 Análise estatística dos perfis de bandas após PCR-DGGE

As análises estatísticas para a comparação de comunidades de *Bacteria* e *Archaea* foram feitas a partir da análise de ANOSIM, usando o programa PRIMER 5 (PRIMER-E, 2001). Além disso, os perfis de bandas após DGGE foram analisados por agrupamento hierárquico utilizando-se o programa Systat 11.0, com base em dados binários (presença e ausência de bandas), pelo método de concordância simples (“simple matching”), com algoritmo de Ward e distância euclidiana como unidade de medida.

2.1.6 Clonagem e sequenciamento do gene rRNA 16S

Para avaliar a diversidade de bactérias e arqueas nas manchas brancas e solo adjacente, dos Espodossolos estudados, foram sintetizadas bibliotecas de clones do gene RNA 16S. Para isso o DNA extraído do solo, das três repetições de cada amostra, foi amplificado separadamente por PCR e posteriormente os produtos das repetições foram misturados, formando uma amostra composta.

A região V1-V3 do gene rRNA 16S de *Bacteria* foi amplificada por PCR utilizando-se o DNA metagenômico extraído e os iniciadores PRBA63f (5' GGA TCC CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC 3') e UN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (LAMBAIS et al., 2006). A amplificação foi feita em solução tampão para DNA polimerase Taq, contendo 0,2 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 5 pmol dos primers e 10 ng do DNA metagenômico. As condições de amplificação foram de 5 min a 95 °C; 30 ciclos 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C e 1 min a 72 °C e extensão final a 72 °C por 10 min.

Para amplificação do gene rRNA 16S de *Archaea*, foram utilizados os iniciadores ARCH21f (5' TTC YGG TTG ATC CYG CCI GA 3') e ARCH958r (5' YCC GGC GTT GA(I/C) TCC AAT T 3') (MOYER et al., 1998). A partir dos amplicons resultantes foi feita uma segunda amplificação com os iniciadores ARCH21f (5' TTC YGG TTG ATC CYG CCI GA 3') e ARCH519r (5' TTA CCG CGG CKG CTG 3') (ØVREÅS et al., 1997). A reação foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf), nas seguintes condições: 95 °C por 5 min, 30 ciclos de 95 °C por 30 seg, 53 °C por 30 seg e 72 °C por 1 min, 72 °C por 6 min.

Os amplicons foram purificados usando o kit Invisorb Fragment CleanUp (Invitex, Berlin, Alemanha) e ligados em “pGEM-T Easy Vector” (Promega, Madison, WI, USA) a 4 °C durante a noite, de acordo com as instruções do fabricante. O produto de ligação foi transformado em células competentes de *Escherichia coli* DH5α por choque térmico, e as células transformadas foram plaqueadas em ágar LB, contendo ampicilina (100 mg mL⁻¹) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactosídeo). Colônias contendo o plasmídeo recombinante foram selecionadas e cultivadas em meio líquido LB contendo 100 mg mL⁻¹ de ampicilina a 37 °C durante a noite. Os plasmídeos foram extraídos através de lise alcalina. As soluções de ácidos nucléicos foram incubadas com 15 µg de RNase por 20 min a 37 °C. O DNA foi precipitado com equivalente volume de isopropanol gelado, por 5 min a 4°C e centrifugado a 4000 rpm por 40 min a 4 °C. O pélete de DNA foi lavado com etanol gelado 70%, seco e solubilizado em água destilada esterilizada. A concentração de DNA foi determinada espectrofotometricamente a 260 nm. O sequenciamento foi executado utilizando-se 200-500 ng do DNA plasmidial, 10 pmol do iniciador M13f (5' GTA AAA CGA CGG CCA G 3') (LAMBAIS et al., 2006), 2 µL de “DYEnamic ET Terminator” (GE Healthcare, São Paulo, Brasil), 2 µL de tampão de sequenciamento (200 mM Tris-HCl pH 9,0 e 5 mM MgCl₂.6H₂O) e H₂O ultrapura para um volume final de 10 µL, em 25 ciclos de 20 seg a 95 °C, 15 seg a 50 °C e 1 min a 60 °C. Os

produtos da PCR foram precipitados com etanol, lavados e solubilizados em formamida deionizada. A eletroforese foi feita utilizando-se um sequenciador automático ABI 3100, de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil).

2.1.7 Análise das sequências do gene rRNA 16S

As sequências foram processadas com o programa PHRED (EWING; GREEN, 1998) para a remoção de bases com baixa qualidade (parâmetro de qualidade >20) e sequências do vetor. Para a afiliação filogenética das sequências do gene rRNA 16S utilizou-se o programa SeqMatch (COLE et al., 2009), o qual compara as sequências obtidas com as sequências do banco de dados do Ribosomal Database Project II (release 10, update 19, Mar 31, 2010). Baseado na distância evolutiva entre as sequências que serão classificadas e aquelas de maior similaridade no banco de dados, serão definidas possíveis classificações em diferentes níveis taxonômicos.

Para o agrupamento em unidades taxonômicas operacionais (UTOs) foi utilizado o programa DOTUR (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005). Para tanto, uma matriz de distância evolutiva foi calculada com o DNADIST (algoritmo de Jukes-Cantor) do programa PHYLIP 3.63 (FELSENSTEIN, 2006), a partir do alinhamento feito no Clustal X 2.0 (LARKIN et al., 2007), com definições de parâmetros padrão, exceto “gap-opening penalty” (10.0) e “gap-extension penalty” (0.1).

Os números de UTOs e de sequências de cada UTO foram computados e utilizados pelo programa SPADE 3.1 (Species Prediction and Diversity Estimation) para o cálculo dos índices de diversidade de Shannon e a recíproca do índice de Simpson, bem como para a estimativa de riqueza de UTOs pelos métodos não-paramétricos ACE e Chao1 (CHAO; CHEN, 2006), além da estimativa da cobertura de amostragem. As comparações entre as bibliotecas de clones do gene rRNA 16S foram feitas utilizando-se o programa S-LIBSHUFF (SINGLETON et al., 2001) após o alinhamento das sequências e o cálculo das matrizes de distâncias evolutivas conforme descrito acima.

2.2 Resultados e discussão

2.2.1 Caracterização química do solo

As propriedades químicas dos perfis de Espodossolos de Bertiooga (BT) e Ilha Comprida (IC1 e IC2) estão apresentadas na Tabela 1. Os solos estudados são ácidos e de baixa fertilidade. No solo do perfil BT, o pH variou entre 3,5 no horizonte A e 4,2 no horizonte E. Este mesmo perfil de solo foi descrito por Martins (2009) como sendo de textura arenosa, variando nos horizontes entre 84 e 98% de areia fina. A SB variou entre 2,6 no horizonte A e 8,0 mmolc dm^{-3} no horizonte E. Esse atributo variou em função do teor de Na no solo, pois as outras bases (K^+ , Ca^{++} , Mg^{++}) apresentaram teores semelhantes entre os horizontes de todos os perfis avaliados. Os teores de Fe_t variaram entre 0,09 no horizonte E e 0,85 g dm^{-3} no horizonte Bh. Nas manchas brancas o Fe_t foi de 0,85 enquanto que no solo adjacente foi de 0,19 g dm^{-3} . Os teores de Al_t variaram entre 0,13 no horizonte E e 0,88 g dm^{-3} no horizonte Bhs. Nas manchas brancas o Al_t foi de 0,36 enquanto que no solo adjacente foi de 0,68 g dm^{-3} . O valor de “m” corresponde à saturação da CTC (capacidade de troca de cátions) efetiva ($\text{SB} + \text{Al}^{+++}$) por alumínio trocável (Al^{+++}). O valor de m variou entre 10,0 no horizonte E e 65,9% no horizonte Bhs. Nas manchas brancas o valor de m foi de 45,0 enquanto que no solo adjacente foi de 58,8%. Os teores totais de C variaram entre 0,1 no horizonte E e 0,5% no horizonte A, já os teores totais de N foram menores do que 0,1% em todos os horizontes, e os teores de S variaram entre <0,1% nos horizontes A e E e 0,4% no horizonte Bh.

Em Ilha Comprida a classificação textural do solo também é arenosa, com concentrações de areia semelhantes às observadas no perfil de Bertiooga, segundo Coelho (2008). No perfil IC1, o pH variou entre 3,3 no horizonte A e 4,4 no horizonte E. A SB variou entre 2,4 no horizonte EB e 3,9 mmolc dm^{-3} no horizonte A. Os teores de Fe_t variaram entre 0,03 nos horizontes EB, BE e 0,16 g dm^{-3} no horizonte A. Nas manchas brancas o Fe_t foi de 0,03 enquanto que no solo adjacente foi de 0,04 g dm^{-3} . Os teores de Al_t variaram entre 0,05 no horizonte E e 0,65 g dm^{-3} no horizonte Bh2. Nas manchas brancas o Al_t foi de 0,18 enquanto que no solo adjacente foi de 0,28 g dm^{-3} . O valor de m variou entre 24,8 no horizonte E e 82,4% no horizonte Bh2. Nas manchas brancas o valor de m foi de 43,0 enquanto que no solo adjacente foi de 72,7%. Os teores

totais de C variaram entre menores do que 0,1 nos horizontes E e EB e 0,5% no horizonte Bh2. Já os teores totais de N e S totais foram menores do que 0,1% em todos os horizontes.

No perfil IC2, o pH variou entre 3,3 no horizonte A e 4,2 no horizonte E. Nas manchas brancas o pH foi de 3,6 e no solo adjacente de 3,3. A SB variou entre 2,2 nos horizontes E e EB e 3,9 mmolc dm⁻³ no horizonte Bh. Nas manchas brancas a SB foi de 2,3, e no solo adjacente de 3,9 mmolc dm⁻³. Os teores de Fe_t variaram entre 0,05 no horizonte EB e 0,05 g dm⁻³ no horizontes A. Nas manchas brancas e no solo adjacente os teores de Fe_t foram de 0,05 g dm⁻³. Os teores de Al_t variaram entre 0,02 no horizonte E e 0,26 g dm⁻³ no horizonte Bh. Nas manchas brancas o Al_t foi de 0,26 e no solo adjacente foi de 0,12 g dm⁻³. O valor de m variou entre 34,4 no horizonte E e 68,8% no horizonte Bh. Nas manchas brancas o valor de m foi de 46,2 enquanto que no solo adjacente foi de 68,8%. Os teores totais de C variaram entre <0,1 no horizonte E e 0,3% no horizonte A. Nas manchas brancas e no solo adjacente o teor de C foi de 0,2%. Já os teores totais de N e S totais foram menores do que 0,1% em todos os horizontes.

Os maiores valores de CE foram observados nos horizontes A e os menores nos horizontes E, de cada perfil. A saturação por Na foi diferente entre os perfis estudados, o perfil BT apresentou teores mais altos de Na em todos os horizontes, variando entre 3,5 no horizonte A e 35% no horizonte E, já em IC1 variou entre 0,8 nos horizontes E e EB e 2,1% no horizonte A, e em IC2 variou entre 0,5 no horizonte Bh e 2,3% no horizonte A. Assim, no perfil de Bertioga, o solo pode ser classificado como salino. Já em Ilha Comprida as concentrações de Na foram menores, não caracterizando o solo como salino. Essa condição de salinidade pode selecionar micro-organismos distintos nos perfis de Bertioga e de Ilha Comprida e alterar os níveis de diversidade microbiana. Comparando-se três diferentes condições de salinidade em um solo da Espanha (22, 32 e 37% de saturação por Na), através de PCR-DGGE, T-RFLP e hibridização DNA-DNA, observou-se que a diversidade bacteriana diminuiu com o aumento da salinidade (ØVREÅS et al., 2003).

O carbono total apresentou teores mais altos nos horizontes superficiais, em todos os perfis estudados, devido ao acúmulo e decomposição de material vegetal, e também nos horizontes mais profundos, evidenciando o processo de podzolização, o qual também pode ser observado pelos maiores teores Al_t em profundidade. Os teores totais de N e S foram menores do que 0,1% para a maioria das amostras. Concentrações similares de C e N foram observadas em podzóis da Holanda, os quais são considerados de baixa fertilidade (BUURMAN et al., 2007).

De forma geral, nos três perfis avaliados, os maiores teores de Fe_t e Al_t foram encontrados no horizonte A ou nos horizontes mais profundos. Apenas em Bertioga os teores de Fe_t e Al_t aumentaram em profundidade no perfil, provavelmente devido ao processo de podzolização. Em Ilha Comprida não se observou o mesmo comportamento, porém os perfis IC1 e IC2 são inundados pelas marés durante um período do dia e em seguida ocorre a drenagem, assim esse movimento da água no perfil pode afetar os teores de nutrientes nesses solos.

De acordo com EMBRAPA (2006) teores de Fe_t abaixo de 80 g kg^{-1} são considerados baixos, e acima de 360 g kg^{-1} são considerados muito altos. Os teores totais de Fe_t nos solos estudados não ultrapassaram 1 g kg^{-1} , assim são considerados como baixos. Outros Espodossolos brasileiros apresentam valores semelhantes (GOMES et al., 2007; DIAS et al., 2003).

Já os teores de Al_t e m podem ser considerados altos, nos três perfis avaliados. Dados semelhantes foram observados por Oliveira (2007) em Espodossolos do Sul da Bahia. Teores de saturação por alumínio (m%) maiores do que 40% são considerados altos e tóxicos às plantas (RAIJ et al., 1996). O teor de m representa a porção da CTC que está adsorvida com Al e portanto em equilíbrio com o Al disponível na solução do solo, bem como com a porção de cargas negativas que poderiam estar adsorvidas com outras bases, como Ca e K (BISSANI et al., 2008). Nas manchas brancas dos três perfis estudados, os teores de m foram menores do que no solo adjacente, e as diferenças foram estatisticamente significativas. Tem sido observado que o Al pode interferir em vários processos metabólicos no solo. Um estudo com solos de floresta no Japão mostrou que o Al disponível no solo, mesmo em concentrações muito baixas, como $0,5 \mu\text{g}$ de Al em solução por grama de solo seco ($0,0005 \text{ g kg}^{-1}$), inibe a oxidação de metano (CH_4) por micro-organismos (TAMAIA; TAKENAKA; ISHIZUKA, 2007). O Al pode também diminuir a motilidade das bactérias devido à formação de compostos estáveis deste elemento com ATP, inibindo o fluxo de energia nas células em geral, principalmente a translocação de prótons nas membranas (CORAIN et al., 1992; KASAI et al., 1992; MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002). Assim, o Al pode agir como fator seletivo e favorecer grupos específicos de micro-organismos, alterando a estrutura das comunidades microbianas e suas funções no solo.

Tabela 1 – Atributos químicos dos Espodossolos estudados

Horizonte	Prof. (cm)	pH	SB ² (mmolc dm ⁻³)	Fe _t ----- (g dm ⁻³) -----	Al _t -----	m -----	C -----	N -----	S -----	CE (dS m ⁻¹)	Sat. Na (%)	
Perfil BT – Bertioaga												
A	0-20	3,5±0,12 b*	2,6±0 b	0,38±0,09 b	0,32±0,09 c	55,7±5,2 b	0,5±0,1 a	<0,1±0 a	<0,1±0 a	0,04±0 a	3,5±0,4 a	
E	20-98	4,2±0,1 a	8,0±2,4 a	0,09±0,03 c	0,13±0,03 c	10,0± 2,3 d	<0,1±0 c	<0,1±0 a	<0,1±0 a	0,01±0 d	35±3,0 c	
Bh	S ¹	98-157	3,7±0,2 b	7,2±0,8 a	0,19±0,07 bc	0,68±0,23 ab	58,8±3,3 ab	0,3±0 b	<0,1±0 a	0,2±0,2 a	0,02±0 c	8,0±1,7 b
	M		3,8±0,1 b	6,4±0,3 a	0,85±0,12 a	0,36±0,02 bc	45,0±1,7 c	0,2±0 bc	<0,1±0 a	0,4±0,4 a	0,02±0 c	10,1±4,3 b
Bhs	157-240	3,7±0,2 b	4,9±1,1 ab	0,31±0,06 b	0,88±0,10 a	65,9±3,9 a	0,3±0,1 b	<0,1±0 a	0,3±0,3 a	0,03±0 b	11±2,7 b	
Perfil IC1 – Ilha Comprida												
A	0-30	3,3±0 f	3,9±1,5 a	0,16±0 a	0,06±0,01 ef	41,7±9,5 b	0,3±0,1 b	<0,1±0 a	<0,1±0 a	0,04±0 a	2,1±0,7 ab	
E	30-150	4,4±0,1 a	3,2±1,0 a	0,08±0,01 b	0,05±0,01 f	24,8±6,1c	<0,1±0 d	<0,1±0 a	<0,1±0 a	0,01±0 d	0,8±0 c	
EB	150-182	3,8±0 b	2,2±0 a	0,03±0 c	0,08±0,01 e	51,0±5,8 b	<0,1±0 cd	<0,1±0 a	<0,1±0 a	0,01±0 d	0,8±0 c	
BE	182-202	3,6±0,1 cd	2,3±0 a	0,03±0 c	0,16±0,01 d	55,5±8,5 b	0,1±0 cd	<0,1±0 a	<0,1±0 a	0,01±0 d	1,2±0 bc	
Bh1	S	202-260	3,5±0,1 e	2,5±0 a	0,04±0,01 c	0,28±0,01 b	72,7±1,8 a	0,2±0 b	<0,1±0 a	<0,1±0 a	0,02±0 c	1,4±0,1 bc
	M		3,7±0,1 bc	2,5±0 a	0,03±0,01 c	0,18±0,01 c	43,0±2,5 b	0,1±0 c	<0,1±0 a	<0,1±0 a	0,02±0 c	2,4±0,2 a
Bh2	260-300	3,6±0,1de	2,7±0,4 a	0,04±0,01 c	0,65±0,01 a	82,4±2,2 a	0,5±0 a	<0,1±0 a	<0,1±0 a	0,03±0 b	0,9±0,6 c	
Perfil IC2 – Ilha comprida												
A	0-30	3,3±0 c	2,8±0,7 ab	0,14±0 a	0,08±0,01 c	54,2±8,1 b	0,3±0,1 a	<0,1±0 a	<0,1±0 a	0,03±0 a	2,3±0,4,a	
E	30-140	4,2±0,1 a	2,2±0 b	0,11±0,01 b	0,02±0 d	34,4±3,4 c	<0,1±0 b	<0,1±0 a	<0,1±0 a	0,01±0 c	1,4±0 abc	
EB	140-200	3,6±0,1 b	2,2±0,1 b	0,05±0 c	0,08±0 c	50,6±6,2 b	0,1±0 b	<0,1±0 a	<0,1±0 a	0,01±0 c	1,3±0,6 bc	
Bh	S	200-300	3,3±0,1 c	3,9±0,6 a	0,05±0 c	0,12±0,01 b	68,8±4,5 a	0,2±0,1 ab	<0,1±0 a	<0,1±0 a	0,02±0 b	0,5±0,2 c
	M		3,6±0,1 b	2,3±0,1 b	0,05±0 c	0,26±0,01 a	46,2±1,6 bc	0,2±0,1 ab	<0,1±0 a	<0,1±0 a	0,02±0 b	1,7±0,4 ab

*Valores são médias ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

¹ S e M = se referem às amostras do solo adjacente e das manchas brancas, respectivamente.

² SB = soma de bases (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, K⁺ e Na⁺); Fe_t = ferro total; Al_t = alumínio total; m = saturação da CTC efetiva por Al⁺⁺⁺; C = carbono total; N = nitrogênio total; S = enxofre total; CE = condutividade elétrica; Sat. Na = saturação da CTC por sódio.

2.2.2 Estrutura de comunidades e diversidade de *Bacteria* em Espodossolos

2.2.2.1 Análises de PCR-DGGE

A análise de agrupamento hierárquico, baseada no perfil de amplicons do gene rRNA 16S após DGGE do solo de Bertioga está apresentada na Figura 5. As comunidades de bactéria, dos horizontes A, E, Bh-S e Bhs, com base na análise por PCR-DGGE, mostraram altos níveis de similaridade entre si (Figura 5b). Como quantidades iguais de DNA foram usadas para a DGGE, diferenças na intensidade das bandas podem indicar maior abundância de bactérias. Maior intensidade das bandas no horizonte A sugere uma maior abundância de bactérias nesse horizonte, possivelmente devido à maior disponibilidade de nutrientes nos horizontes superficiais. De forma similar, um estudo com nove Espodossolos sob floresta de coníferas, através da análise do perfil de ácidos graxos de fosfolipídeos (PFLA) mostrou que a biomassa microbiana diminui com a profundidade do solo. No entanto, ao contrário do que foi observado no perfil de Bertioga, a estrutura da comunidade microbiana é alterada com a profundidade (FRITZE; PIETIKÄINEN; PENNANEN, 2000). Como a análise por PFLA acessa a comunidade microbiana como um todo, e em nosso experimento a análise por PCR-DGGE foi específica para bactérias, é provável que o efeito da profundidade sobre as bactérias dos Espodossolos seja menos acentuado do que sobre outros grupos de micro-organismos.

Nas amostras das manchas brancas (Bh-M) do Espodossolo de Bertioga, as estruturas das comunidades bacterianas diferiram das demais amostras, inclusive do solo adjacente às mesmas (Bh-S). Pela análise de ANOSIM (Tabela 2) foi observada diferença significativa entre os valores médios de similaridade entre as estruturas das comunidades bacteriana dos horizontes A, E, Bh-S e Bhs, quando comparados à amostra da mancha branca no horizonte Bh (Bh-M). Somente as amostras das manchas brancas diferiram estatisticamente das demais ($R_{\text{global}} = 0,520$; $P < 0,003$), sugerindo a presença de grupos bacterianos distintos nas manchas, em relação ao solo adjacente. Através da análise do perfil de ácidos graxos em Espodossolos da Holanda, Buurman et al. (2007) também sugerem que o desenvolvimento das manchas brancas pode estar associado a grupos específicos de micro-organismos, como actinomicetos.

Figura 5 - Estrutura das comunidades bacterianas ao longo do perfil de um Espodossolo de Bertioga. Letras referem-se aos horizontes amostrados e números são as repetições dentro de cada horizonte. a) Perfil de amplicons do gene rRNA 16S; b) Agrupamento hierárquico com base no perfil de amplicons do gene rRNA 16S

Tabela 2 - Resultado do teste de similaridade por *Pairwise* (pareamento), baseado nos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de *Bacteria*, dos horizontes do perfil de um Espodossolo de Bertioga

Comparações entre horizontes	Teste de similaridade por <i>Pairwise</i>
A, E	0,333
A, Bh-S	0,000
A, Bh-M	1,000
A, Bhs	0,000
E, Bh-S	0,333
E, Bh-M	1,000
E, Bhs	0,333
Bh-S, Bh-M	1,000
Bh-S, Bhs	0,000
Bh-M, Bhs	1,000

Nível de significância para R global = 0,520; $P < 0,003$.

Em Ilha Comprida foram avaliados dois perfis, IC1 (Figura 6) e IC2 (Figura 7), cujas análises de agrupamento hierárquico, baseadas no perfil de amplicons do gene rRNA 16S após DGGE, mostraram estruturas de comunidade bacterianas distintas ao longo dos perfis do solo.

Em IC1, as estruturas das comunidades bacterianas nos diferentes horizontes são menos similares entre si, se comparado ao solo de Bertioga. Nas amostras do horizonte A predominam bactérias que apresentam maior conteúdo G+C. Dentre as bactérias ricas em G+C estão: *Bacillus* e *Actinobacteria* (HAICHAR et al., 2007; GAO; GUPTA, 2005). Essas bactérias estão normalmente envolvidas na degradação de matéria orgânica complexa (WEN et al., 2010; JACQUES et al., 2008), e na decomposição de lignina (HUANG et al., 2010), respectivamente.

Pela análise de ANOSIM (Tabela 3), as comunidades bacterianas dos horizontes E, EB e BE, do perfil IC1, não diferiram estatisticamente entre si ($R_{\text{global}} = 0,959$; $P < 0,001$). Esses horizontes apresentam grande variação no perfil de bandas entre as repetições do mesmo tratamento, observada na análise de agrupamento hierárquico (Figura 6b). Segundo Peter Buurman (2009), estes horizontes apresentam a maior variação de características físico-químicas, as quais poderiam se refletir nas estruturas das comunidades microbianas em Espodossolos (comunicação pessoal, 16 de Julho de 2009). As comunidades bacterianas das manchas (Bh1-M) diferiram daquelas do solo adjacente (Bh1-S), com base na análise por PCR-DGGE, sugerindo a ocorrência de grupos bacterianos distintos nos dois ambientes.

Figura 6 - Estrutura das comunidades bacterianas ao longo do perfil de um Espodossolo em Ilha Comprida, perfil 1 (IC1). Letras referem-se aos horizontes amostrados e números são as repetições dentro de cada horizonte.
a) Perfil de amplicons do gene rRNA 16S; b) Agrupamento hierárquico com base no perfil de amplicons do gene rRNA 16S

Tabela 3 - Resultado do teste de similaridade por *Pairwise* (pareamento), baseado nos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de *Bacteria*, dos horizontes do perfil de um Espodossolo de Ilha Comprida (IC1)

Comparações entre horizontes	Teste de similaridade por <i>Pairwise</i>
A, E	1,000
A, EB	1,000
A, BE	1,000
A, Bh1-S	1,000
A, Bh1-M	1,000
A, Bh2	1,000
E, EB	0,593
E, BE	0,889
E, Bh1-S	1,000
E, Bh1-M	1,000
E, Bh2	1,000
EB, BE	0,296
EB, Bh1-S	1,000
EB, Bh2	1,000
BE, Bh1-S	1,000
BE, Bh1-M	1,000
BE, Bh2	1,000
Bh1-S, Bh1-M	1,000
Bh1-S, Bh2	1,000
Bh1-M, Bh2	1,000

Nível de significância para R global = 0,959; $P < 0,001$.

A análise de agrupamento hierárquico, baseado no perfil de amplicons do gene rRNA 16S após DGGE de amostras de IC2 está apresentada na Figura 7. Nesse caso, houve um agrupamento das amostras em função do horizonte, sugerindo que cada horizonte possui uma comunidade bacteriana distinta, e que as comunidades bacterianas na mancha branca e no solo adjacente são similares (Figura 7b). Essas observações foram confirmadas pela análise de ANOSIM (Tabela 4), a qual mostrou que as amostras da mancha branca (Bh-M) e do solo adjacente (Bh-S) não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si. Amostras do solo adjacente às manchas (Bh-S) também não diferiram de amostras dos horizontes E e EB, (R global = 0,853; $P < 0,001$). Esses dados sugerem que os grupos bacterianos mais abundantes nas manchas e no solo adjacente podem ser os mesmos. No entanto é sabido que uma mesma banda na DGGE pode conter amplicons de diferentes bactérias. Assim, perfis similares não representam necessariamente comunidades bacterianas similares (GELSOMINO et al., 1999).

Figura 7 - Estruturas das comunidades bacterianas ao longo do perfil de um Espodossolo em Ilha Comprida, perfil 2 (IC2). Letras referem-se aos horizontes amostrados e números são as repetições dentro de cada horizonte. a) Perfil de amplicons do gene rRNA 16S; b) Agrupamento hierárquico com base no perfil de amplicons do gene rRNA 16S

Tabela 4 – Resultado do teste de similaridade por *Pairwise* (pareamento), baseado nos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de *Bacteria*, dos horizontes do perfil de um Espodossolo de Ilha Comprida IC2

Comparações entre horizontes	Teste de similaridade por <i>Pairwise</i>
A, E	1,000
A, EB	1,000
A, Bh-S	1,000
A, Bh-M	1,000
E, EB	0,963
E, Bh-S	0,815
E, Bh-M	1,000
EB, Bh-S	0,370
EB, Bh-M	1,000
Bh1-S, Bh1-M	0,259

Nível de significância para R global = 0,853; $P < 0,001$.

Com base na análise do perfil de bandas da DGGE, as comunidades bacterianas nas manchas brancas dos perfis de Bertioiga e IC1 apresentaram diferenças significativas, em relação ao solo adjacente. Já no perfil IC2, essas diferenças não foram significativas. As diferenças entre os dois locais podem ser explicadas pela influência da maré sobre os solos de Ilha Comprida, os quais durante um determinado período no dia encontram-se inundados com a água do mar, e com a drenagem dessa água pode haver um efeito diferencial em cada horizonte. Alguns autores mostraram que pode ocorrer transporte seletivo de micro-organismos pelo movimento da água no perfil do solo, através de inoculação de grupos específicos na superfície do solo e posterior análises de PFLA, em diferentes profundidades do solo (BALKWILL et al., 1998; KIEFT et al., 1998). Além disso, a água aumenta a conectividade entre os diferentes nichos no solo, favorecendo o estabelecimento de comunidades microbianas mais homogêneas (OR et al., 2007).

2.2.2.2 Análises das comunidades bacterianas nas manchas brancas através do sequenciamento de clones do gene rRNA 16S

As comunidades bacterianas nas manchas brancas foram analisadas também através do sequenciamento de clones do gene rRNA 16S, amplificados a partir do DNA metagenômico de amostras de solo dos perfis estudados em Bertioiga (BT) e Ilha Comprida (IC1 e IC2). Foram selecionadas amostras das manchas brancas (BT-M; IC1-M; IC2-M) e do solo adjacente (BT-S; IC1-S; IC2-S) de cada um dos perfis, a fim de comparar as comunidades bacterianas entre os dois microambientes, no mesmo local e entre locais diferentes. Do total de 96 clones, de cada uma das

seis bibliotecas, foram considerados válidos 80 de BT-S, 91 de BT-M, 80 de IC1-S, 84 de IC1-M, 84 de IC2-S e 87 de IC2-M (Tabela 5).

A frequência dos grupos filogenéticos de *Bacteria* presentes nos Espodossolos estudados está apresentada na Tabela 5. Os dados obtidos indicam a presença de bactérias de oito filos distintos distribuídos entre os três perfis avaliados, dos 53 filos bacterianos descritos (RAPPE; GIOVANNONI, 2003).

No Espodossolo de Bertioiga, o filo predominante foi *Proteobacteria*, considerado metabolicamente muito diverso (MARGULUIS; SCHWARTZ, 1998). O filo *Proteobacteria* é subdividido em seis classes: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria* e *Zetaproteobacteria* (JANSSEN, 2006; EMERSON et al., 2007).

Nas amostras das manchas brancas (BT-M) do Espodossolo de Bertioiga predominaram bactérias da classe *Gammaproteobacteria*, com 74% do total das sequências de clones obtidos, enquanto que no solo adjacente (BT-S) esse grupo representou 39% das sequências analisadas. Somente *Pseudomonadales* foi detectada nas amostras de BT-M e BT-S. Sendo *Pseudomonas* o gênero mais frequente, representando 72% e 38% dos clones de BT-M e BT-S, respectivamente. Esses dados sugerem a ocorrência de seleção de *Pseudomonas* no interior das manchas brancas no Espodossolo de Bertioiga. No entanto, se essas bactérias são as responsáveis pelo desenvolvimento das manchas, ou se colonizaram o ambiente após sua formação não é sabido.

Em menores proporções, foram detectados clones filogeneticamente relacionados ao filo *Bacteroidetes*, da classe *Flavobacteria*, com 18% em BT-M e 8% em BT-S. As bactérias pertencentes ao filo *Bacteroidetes* podem representar aproximadamente 5% das comunidades bacterianas nos solos. Esse filo é formado por três classes, *Bacteroidetes*, *Flavobacteria* e *Sphingobacteria* (JANSSEN, 2006). Nesse Espodossolo predominaram organismos da classe *Flavobacteria*, comuns em ambientes marinhos e costeiros (KIRCHMAN, 2002). Devido à sua capacidade em sintetizar várias enzimas hidrolíticas, os organismos do filo *Bacteroidetes* podem ser importantes como degradadores iniciais de matéria orgânica, particularmente a fração de alto peso molecular, como proteínas e polissacarídeos (COTTRELL; KIRCHMAN, 2000, ABELL; BOWMAN, 2005, COVERT; MORAN, 2001). Dessa forma, esses organismos também podem estar envolvidos na degradação seletiva de matéria orgânica e consequente formação das manchas brancas em Espodossolos.

No Espodossolo de Bertiooga, a dominância de *Pseudomonas* nas amostras das manchas (BT-M) pode ser consequência de uma pressão seletiva exercida pelo ambiente. Dentre os fatores que podem afetar o desenvolvimento de comunidades microbianas estão os atributos químicos do solo, principalmente a matéria orgânica. Assim, a matéria orgânica complexa observada nas manchas brancas em relação ao solo adjacente (BUURMAN et al., 2007), poderia selecionar micro-organismos com capacidade metabólica mais complexa, como *Pseudomonas*. Alternativamente, *Pseudomonas* poderiam ter colonizado esse microambiente após a degradação dessa matéria orgânica mais complexa. Bactérias do gênero *Pseudomonas* ocorrem naturalmente nos solos, mas são pouco relatadas em estudos com Espodossolos. Esse gênero bacteriano é conhecido como um eficiente degradador de substâncias orgânicas complexas. *P. stutzeri* foi descrita como eficiente degradadora de fenantreno (ZHAO et al., 2009) e naftaleno (ROSSELLO et al., 1994). *P. aeruginosa* está frequentemente associada com a degradação de óleo cru (EKPO; UDOLFIA, 2008). Assim as bactérias do gênero *Pseudomonas* podem estar diretamente relacionadas com a degradação seletiva da matéria orgânica no Espodossolo de Bertiooga. Porém estudos adicionais são necessários para associar essa espécie de bactéria ao processo de formação das manchas brancas.

As sequências de Bertiooga consideradas válidas foram também agrupadas em UTOs, considerando-se similaridade maior que 97%. Foram obtidas 40 UTOs para BT-S e 18 UTOs para BT-M, sendo apenas 7 UTOs comuns entre as duas amostras, sugerindo a ocorrência de seleção de bactérias específicas nas manchas brancas em relação ao solo adjacente. No entanto, as 11 UTOs exclusivas das manchas brancas (BT-M) continham apenas uma sequência. Essas UTOs estão filogeneticamente relacionadas à *Pseudomonas* (5 UTOs) e *Flavobacterium* (6 UTOs). Os dados mostram que a seleção de bactérias que ocorreu nas manchas não foi exclusiva, e sim favoreceu a maior abundância de UTOs específicas nas manchas brancas, as quais estão também presentes no solo adjacente (Figura 8). As UTOs que apresentaram maior número de clones nas manchas brancas estão filogeneticamente relacionadas à *Pseudomonas* (61 clones) e *Flavobacterium* (14 clones). A estimativa de riqueza de UTOs nas manchas brancas não foi significativamente diferente da estimativa de riqueza de UTOs no solo adjacente. Com base no índice de Shannon, as amostras das manchas apresentaram menor diversidade do que amostras do solo adjacente, porém a recíproca do índice de Simpson não apresentou diferença significativa

entre essas amostras (Tabela 6). A menor diversidade de UTOs em BT-M pode ser observada também através das curvas de rarefação (Figura 9).

Figura 8 - Diagrama de Venn com a distribuição de UTOs de *Bacteria* em BT-S e BT-M

Figura 9 - Curva de rarefação indicando o número estimado de UTOs em bibliotecas de clones do gene rRNA 16S de *Bacteria* no Espodossolo de Bertioga (BT) e de Ilha Comprida (IC1 e IC2), nas manchas brancas (M) e no solo adjacente (S)

Em Ilha Comprida, os dois perfis avaliados apresentaram maior abundância de UTOs associadas ao filo *Acidobacteria*, grupo amplamente distribuído e abundante no solo. Bactérias desse filo possuem extensa capacidade metabólica, porém seu papel ecológico é pouco entendido, principalmente devido à ocorrência de poucos representantes cultiváveis (EICHROST; BREZNAK; SCHMIDT, 2007).

No perfil de IC1 a classe *Acidobacteria* predominou dentro das manchas brancas (IC1-M), com 49% do total de clones válidos, enquanto que no solo adjacente (IC1-S) esse grupo representou 32,4% das sequências válidas. Em IC2 também predominou *Acidobacteria*, com 63,2% do total de clones válidos nas manchas brancas (IC2-M) e 19% no solo adjacente (IC2-S) (Tabela 5). Esses dados sugerem que ocorreu seleção de organismos associados à classe *Acidobacteria* nos dois perfis estudados em Ilha Comprida.

O grupo *Acidobacteria* possui apenas quatro espécies cultivadas conhecidas: *Acidobacterium capsulatum*, *Holophaga foetida*, *Geothrix fermentans* e *Terriglobus roseus* (HUGENHOLTZ, 1998; KOCH et al., 2008). Esse grupo de micro-organismos tem sido encontrado em ambientes como solos (com diferentes propriedades físico-químicas), drenagem ácida de minas, aquíferos, fontes termais, lagos e em amostras de sedimento do oceano Atlântico, a mais de 1000 m de profundidade (KIELAK et al., 2009). A ubiquidade e a abundância de acidobactérias nos solos e a sua capacidade de resistência à poluição e a ambientes extremos, sugerem que essas apresentam funções que são importantes no ambiente e que são potencialmente variadas (WARD et al. 2009). Através do sequenciamento do genoma completo de três espécies de *Acidobacteria*, Ward et al. (2009) encontraram genes que codificam enzimas envolvidas na degradação de uma variedade de açúcares, aminoácidos, alcoóis, e metabólitos intermediários, além de substratos complexos como hemicelulose.

Em menores proporções o filo *Proteobacteria* também foi detectado nos perfis de Ilha Comprida. No perfil IC1 a classe *Alphaproteobacteria* representou 26% do total de clones válidos nas manchas brancas (IC1-M) e 28,8% no solo adjacente (IC1-S), já em IC2 esse grupo representou 14,9% do total de clones válidos nas manchas brancas (IC2-M) e 12% no solo adjacente (IC2-S). A classe *Betaproteobacteria* foi detectada apenas em IC2-S.

Espécies das classes *Alphaproteobacteria* e *Betaproteobacteria* são bastante diversas em suas características fisiológicas (receptor elétrons/fonte energia) e são distribuídos nos ambientes

terrestres e aquáticos (LEE et al., 2005), tendo potencial metabólico para participarem da degradação de matéria orgânica e possível formação das manchas brancas.

As sequências de IC1 foram agrupadas em UTOs, considerando-se similaridade maior que 97%. Foram obtidas 60 UTOs em IC1-S e 42 UTOs em IC1-M, sendo apenas 10 UTOs comuns entre as duas amostras, e 32 UTOs exclusivas da amostra da mancha branca (Figura 10). Dentre as UTOs exclusivas das manchas, 10 pertencem ao grupo *Acidobacteria* e compreendem 39 clones, as outras 22 UTOs estão relacionadas à *Proteobacteria*, porém são representadas por apenas um clone.

Em IC2 foram obtidas 58 UTOs em IC2-S e 42 UTOs em IC2-M, sendo apenas 5 UTOs comuns entre as duas amostras, e 37 UTOs exclusivas da amostra da mancha branca (Figura 10). Dentre as UTOs exclusivas, 19 pertencem ao grupo *Acidobacteria* e compreendem 38 clones, as outras 18 UTOs estão relacionadas à *Proteobacteria*, e compreendem 30 clones.

Em Ilha Comprida, pelo índice de Chao1, somente em IC2 a estimativa de riqueza de UTOs nas manchas brancas (IC2-M) foi significativamente menor do que a riqueza de UTOs no solo adjacente (IC2-S). Os índices de Shannon e a recíproca do índice de Simpson mostraram uma menor diversidade de bactérias nas amostras das manchas quando comparadas com as amostras do solo adjacente, nos dois perfis avaliados (Tabela 6). A menor diversidade nas manchas brancas dos dois perfis pode ser observada também na curva de rarefação (Figura 9).

Figura 10 - Diagramas de Venn com a distribuição de UTOs de *Bacteria* em Ilha Comprida; a) IC1-S e IC1-M; b) IC2-S e IC2-M

Tabela 5 - Abundância de grupos filogenéticos em Espodossolos de Bertiooga (BT) e de Ilha Comprida (IC1 e IC2), na mancha branca (M) e no solo adjacente (S)

Grupo filogenético	BT-S		BT-M		IC1-S		IC1-M		IC2-S		IC2-M	
	%	Nº de	%	Nº de	%	Nº de	%	Nº de	%	Nº de	%	Nº de
	Total	clones	Total	clones	Total	clones	Total	clones	Total	clones	Total	clones
<i>Acidobacteria</i>	30,0	24	2,0	2	32,4	26	49,0	41	19,0	16	63,2	55
<i>Actinobacteria</i>	4,0	3	ND	ND	4,9	4	1,0	1	9,0	8	ND	ND
<i>Alphaproteobacteria</i>	11,0	9	1,0	1	28,8	23	26,0	22	12,0	10	14,9	13
<i>Betaproteobacteria</i>	5,0	4	1,0	1	8,7	7	12,0	10	18,0	15	4,6	4
<i>Clostridia</i>	ND	ND	ND	ND	1,3	1	ND	ND	8,0	7	ND	ND
<i>Cyanobacteria</i>	1,0	1	ND	ND	3,7	3	ND	ND	1,0	1	2,4	2
<i>Deltaproteobacteria</i>	1,0	1	1,0	1	1,3	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Firmicutes</i>	ND	ND	ND	ND	1,3	1	ND	ND	2,0	2	ND	ND
<i>Flavobacteria</i>	8,0	6	18,0	16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Gammaproteobacteria</i>	39,0	31	74,0	67	3,7	3	11,0	9	5,0	4	ND	ND
<i>Nitrospira</i>	ND	ND	ND	ND	1,3	1	1,0	1	ND	ND	3,4	3
<i>Proteobacteria</i>	1,0	1	ND	ND	1,3	1	ND	ND	5,0	4	ND	ND
<i>Sphingobacteria</i>	ND	ND	3,0	3	1,3	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Verrucomicrobia</i>	ND	ND	ND	ND	1,3	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Não-classificada	ND	ND	ND	ND	8,7	7	ND	ND	21,0	18	11,5	10
Total	100	80	100	91	100	80	100	84	100	85	100	87

ND = não determinado.

Tabela 6 - Estimativa de riqueza de UTOs, índice de diversidade e cobertura de amostragem calculados a partir da análise de sequências de clones do gene rRNA 16S de *Bacteria* de amostras de Espodossolos de Bertioga (BT) e de Ilha Comprida (IC1 e IC2), na mancha branca (M) e no solo adjacente (S)

Comunidade	NS ^a	NU ^b	Estimativa de riqueza de UTOs		Índice de Diversidade		ECA ^c
			ACE	Chao1	Shannon ^c	1/D ^d	
D = 0,03							
BT-S	80	40	120,9 (72,9; 238,7)	124,1 (68,7; 286,0)	3,16 (2,90; 3,41)	11,76 (7,31; 30,16)	0,637
BT-M	91	18	123,0 (36,9; 600,6)	116,0 (34,4; 603,1)	1,75 (1,48; 2,01)	3,52 (2,00; 14,37)	0,846
IC1-S	80	60	263,0 (151,3; 511,4)	372,5 (169,2; 954,0)	3,95 (3,82; 4,08)	42,66 (33,84; 57,70)	0.375
IC1-M	84	42	99,6 (65,9; 181,0)	94,1 (60,8; 186,2)	3,40 (3,22; 3,59)	20,88 (15,39; 32,45)	0.679
IC2-S	84	58	224,7 (134,7; 420,7)	269,6 (136,5; 628,4)	3,87 (3,72; 4,02)	37,13 (28,82; 52,19)	0.452
IC2-M	87	42	91,1 (62,2; 161,6)	92,1 (73,2; 122,6)	3,50 (3,30; 3,62)	23,88 (17,88; 35,95)	0.701

Para a definição de UTOs utilizou-se D = 0,03.

^aNúmero de sequências.

^bNúmero de UTOs determinado pelo DOTUR.

^cEstimador de máxima semelhança.

^dRecíproco do índice de Simpson (estimador de máxima semelhança).

^eEstimativa de cobertura de amostragem. Valores entre parênteses representam o intervalo com 95% de confiança.

Nos dois ambientes avaliados, Bertiooga e Ilha Comprida, ocorreram seleções de micro-organismos específicos nas manchas brancas em relação ao solo adjacente. Porém as UTOs dos organismos das manchas brancas e do solo adjacente, respectivamente, são pouco comuns entre as amostras dos três perfis avaliados (Figura 11). Os dados mostraram que na comparação múltipla entre as bibliotecas de clones, as comunidades bacterianas da mancha branca e do solo adjacente, dos três perfis analisados, foram significativamente diferentes, utilizando S-LIBSHUFF (LIBSHUFF $P = 0,001$; Bonferroni corrigido P para comparação de duas bibliotecas é $0,005$, utilizando “*experimentwise*” $P = 0,01$) (Tabela7).

Assim, os dados mostraram que houve seleção de grupos distintos de bactérias nas manchas brancas dos Espodossolos estudados. Nas manchas brancas de Bertiooga e de Ilha Comprida, predominaram bactérias dos filos *Proteobacteria* e *Acidobacteria*, respectivamente. Quando comparadas as comunidades bacterianas das manchas brancas de IC1 e IC2, as diferenças observadas foram em nível de UTO. Porém a maioria das UTOs está associada à família *Acidobacteriaceae*. Estes resultados mostram que a comunidade bacteriana nas manchas brancas é diferente entre locais distintos (BT e IC) e entre perfis próximos, com características físico-químicas semelhantes. As diferenças observadas podem estar associadas às diferenças nas condições químicas de cada perfil, e ao regime hídrico do solo. Em estudo realizado com Espodossolos da Holanda foi sugerido, com base na análise de PFLA, que predominam actinomicetos nas manchas brancas (BUURMAN et al., 2007). Um estudo com setenta e uma amostras de solo na América do Norte, relacionando propriedades dos solos com abundância relativa de seis filos bacterianos distintos, mostrou que em ambientes com predomínio de carbono pouco lábil, havia maior abundância de *Acidobacteria*, enquanto que em condições com predomínio de carbono lábil havia maior abundância de *Proteobacteria* (FIERER; BRADFORD; JACKSON, 2007). Assim, é possível que as diferenças nas estruturas das comunidades bacterianas nas manchas brancas entre os perfis de solo estudados estejam associadas com as características da matéria orgânica do solo, muito embora em nosso estudo, análises moleculares da matéria orgânica não tenham sido realizadas.

Tabela 7 - Valores de *p* calculado nas comparações múltiplas entre as bibliotecas de clones do gene rRNA 16S das comunidades de *Bacteria* de amostras de Espodossolos de Bertioga (BT) e de Ilha Comprida (IC1 e IC2), na mancha branca (M) e no solo solo adjacente (S)

Homólogo	Heterólogo					
	BT-S	BT-M	IC1-S	IC1-M	IC2-S	IC2-M
BT-S	-	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
BT-M	0,9647	-	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
IC1-S	0,0000	0,0000	-	0,3042	0,0000	0,0000
IC1-M	0,0000	0,0000	0,0000	-	0,0000	0,0000
IC2-S	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	-	0,0000
IC2-M	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	-

Valores mínimos para diferença significativa: 0,0003 e 0,0017 para 1% e 5% de probabilidade, respectivamente.

Figura 11 - Diagramas de Venn com a distribuição de UTOs de *Bacteria* nos perfis de Espodossolos de Bertioga (BT) e Ilha Comprida (IC1 e IC2), a) nas manchas brancas (M); e b) no solo adjacente (S)

2.2.3 Estrutura de comunidades e diversidade de *Archaea* em Espodossolos

2.2.3.1 Análises de PCR-DGGE

A análise de agrupamento hierárquico, baseada no perfil de amplicons do gene rRNA 16S após DGGE do solo de Bertioxa está apresentada na Figura 12. As comunidades de arqueas, dos horizontes A, E, Bh-S, Bh-M e Bhs, com base na análise por PCR-DGGE, mostraram estruturas diferentes entre si (Figura 12). Através da análise de ANOSIM (Tabela 8) foi observada diferença significativa entre os valores médios de similaridade dos perfis de bandas das DGGes entre todos os horizontes. No entanto, diferença significativa não foi observada entre as amostras da mancha (Bh-M) e do solo adjacente (Bh-S) ($R_{\text{global}} = 0,991$; $P < 0,001$). Esses dados sugerem que não ocorre seleção de arqueas nas manchas brancas de BT em relação ao solo adjacente.

Em Ilha Comprida as análises de agrupamentos hierárquicos, baseadas no perfil de amplicons do gene rRNA 16S após DGGE do solo de IC1 e IC2 estão apresentadas nas Figuras 13 e 14, respectivamente. Em IC1, através da análise de ANOSIM (Tabela 9), não foi observada diferença significativa entre os valores médios de similaridade entre as amostras dos horizontes A e EB, E e BE, EB e BE, e também entre as amostras das manchas (Bh1-M) e as do solo adjacente (Bh1-S) ($R_{\text{global}} = 0,904$; $P < 0,001$). Em IC2, através da análise de ANOSIM (Tabela 10) todas as amostras apresentaram estruturas de comunidades de arqueas estatisticamente diferentes entre si, exceto entre as amostras da mancha (Bh-M) e do solo adjacente (Bh-S) ($R_{\text{global}}: 0,853$; $P < 0,001$). Esses dados sugerem que não ocorre seleção de arqueas nas manchas brancas de IC1 e IC2 em relação ao solo adjacente.

Pela análise de agrupamento hierárquico, as amostras dos três perfis foram distribuídas em dois grupos, um composto pelos horizontes superficiais e outro pelos horizontes mais profundos (Figuras 12b, 13b e 14b). Essa distribuição ocorreu possivelmente pela formação de microambientes nesses solos. Os horizontes superficiais (A, E, EB, BE), de uma forma geral, apresentaram maiores teores de nutrientes, provavelmente advindos da decomposição de resíduos vegetais, o que pode ter formado uma condição diferente daquela observada nos horizontes mais profundos (Bh, Bhs, Bh1, Bh2), selecionando comunidades de arqueas.

Nos três Espodossolos avaliados, os perfis de amplicons do gene rRNA 16S de *Archaea*, após DGGE das manchas brancas, não diferiram significativamente das amostras do solo adjacente. Porém, entre a maioria dos horizontes de cada perfil houve diferenças significativas entre as estruturas de comunidades. Tem sido observado que a diversidade e abundância dos organismos do domínio *Archaea* variam de acordo com a profundidade do solo (BUNDT et al., 2001). Em solos de floresta de clima temperado, observou-se que a abundância de arqueas diminui com a profundidade do solo (KEMNITZ; KOLB; CONRAD, 2007; PESARO; WIDMER, 2002).

Figura 12 - Estrutura das comunidades de *Archaea* ao longo do perfil de um Espodossolo de Bertioiga. Letras referem-se aos horizontes, e números são as repetições dentro de cada horizonte. a) Perfil de amplicons do gene rRNA 16S; b) Agrupamento hierárquico com base no perfil de amplicons do gene rRNA 16S

Tabela 8 – Resultado do teste de similaridade por *Pairwise* (pareamento), baseado nos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de *Archaea*, dos horizontes do perfil de um Espodossolo de Bertioga

Comparações entre horizontes	Teste de similaridade por <i>Pairwise</i>
A, E	1,000
A, Bh-S	1,000
A, Bh-M	1,000
A, Bhs	1,000
E, Bh-S	1,000
E, Bh-M	1,000
E, Bhs	1,000
Bh-S, Bh-M	0,778
Bh-S, Bhs	1,000
Bh-M, Bhs	1,000

Nível de significância para R global = 0,991; $P < 0,001$.

Figura 13 - Estrutura das comunidades de *Archaea* ao longo do perfil de um Espodossolo em Ilha Comprida, perfil 1 (IC1). Letras referem-se aos horizontes e números são as repetições dentro de cada horizonte. a) Perfil de amplicons do gene rRNA 16S; b) Agrupamento hierárquico com base no perfil de amplicons do gene rRNA 16S

Tabela 9 – Resultado do teste de similaridade por *Pairwise* (pareamento), baseado nos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de *Archaea*, dos horizontes do perfil de um Espodossolo de Ilha Comprida (IC1)

Comparações entre horizontes	Teste de similaridade por <i>Pairwise</i>
A, E	1,000
A, EB	0,611
A, BE	1,000
A, Bh1-S	1,000
A, Bh1-M	1,000
A, Bh2	1,000
E, EB	1,000
E, BE	0,519
E, Bh1-S	1,000
E, Bh1-M	1,000
E, Bh2	1,000
EB, BE	0,352
EB, Bh1-S	1,000
EB, Bh2	1,000
BE, Bh1-S	1,000
BE, Bh1-M	1,000
BE, Bh2	1,000
Bh1-S, Bh1-M	0,333
Bh1-S, Bh2	1,000
Bh1-M, Bh2	1,000

Nível de significância para R global = 0,904; $P < 0,001$.

Figura 14 - Estrutura das comunidades de *Archaea* ao longo do perfil de um Espodossolo em Ilha Comprida, perfil 2 (IC2). Letras referem-se aos horizontes e números são as repetições dentro de cada horizonte. a) Perfil de amplicons do gene rRNA 16S; b) Agrupamento hierárquico com base no perfil de amplicons do gene rRNA 16S

Tabela 10 – Resultado do teste de similaridade por *Pairwise* (pareamento), baseado nos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de *Archaea*, dos horizontes do perfil de um Espodossolo de Ilha Comprida IC2

Comparações entre horizontes	Teste de similaridade por <i>Pairwise</i>
A, E	1,000
A, EB	1,000
A, Bh-S	1,000
A, Bh-M	1,000
E, EB	1,000
E, Bh-S	1,000
E, Bh-M	1,000
EB, Bh-S	1,000
EB, Bh-M	1,000
Bh1-S, Bh1-M	0,333

Nível de significância para R global = 0,853; $P < 0,001$.

2.2.3.2 Análises das comunidades de arqueas nas manchas brancas através do sequenciamento de clones do gene rRNA 16S

As comunidades de arqueas nas manchas brancas foram analisadas também através do sequenciamento de clones do gene rRNA 16S amplificados a partir do DNA metagenômico. Foram selecionadas amostras das manchas brancas (BT-M; IC1-M; IC2-M) e do solo adjacente (BT-S; IC1-S; IC2-S), em cada um dos perfis estudados, a fim de comparar as comunidades entre os dois microambientes no mesmo local e entre locais diferentes. Do total de 96 clones, de cada uma das seis bibliotecas, foram considerados válidos 81 de BT-S, 82 de BT-M, 91 de IC1-S, 78 de IC1-M, 82 de IC2-S e 80 de IC2-M (Tabela 11).

Nos Espodossolos estudados foram detectados dois grupos de arqueas: *Crenarchaeota* e *Euryarchaeota*, os quais representam a maior parte das arqueas estudadas (ROBERTSON et al., 2005). O domínio *Archaea* foi dividido inicialmente em dois filos, *Crenarchaeota* e *Euryarchaeota* (WOESE; FOX, 1977). Mais recentemente foram propostos mais dois filos para classificação das arqueas, *Korarchaeota* (HUBER et al., 2002) e *Nanoarchaeota* (WATERS et al., 2003).

O filo *Crenarchaeota* é encontrado em ambientes de temperaturas extremas (BUCKLEY; GRABER; SCHMIDT, 1998), ambientes marinhos (DeLONG et al., 1992), e solos (UEDA; SUGA; MATSUGUCHI, 1995). O filo *Euryarchaeota* é também bastante diverso filogeneticamente e inclui micro-organismos halofílicos, termofílicos e metanogênicos (PESADRO; WIDMER, 2002).

O filo *Euryarchaeota* foi pouco representativo nos três perfis de Espodossolos estudados, variando de 2,4 a 6,2% dos clones válidos, *Halobacteria* foi a única classe identificada nesse grupo, 1,1% em IC1-S, e 1,3% em IC2-S. O filo predominante nos Espodossolos foi *Crenarchaeota*, representado principalmente pela classe *Thermoprotei*. Nenhum clone pode ser afiliado ao nível de gênero. *Thermoprotei* representou aproximadamente 63% dos clones em BT-S, 77% em BT-M, 81% em IC1-S, 82% em IC1-M, 83% em IC2-S e 87% em IC2-M (Tabela 11).

A classe *Thermoprotei* compreende organismos acidofílicos e termofílicos heterotróficos (REYSENBACH, 2001), e está dividida em quatro ordens: *Thermoproteales* (ZILLIG; TU; HOLZ, 1981), *Caldisphaerales* (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004), *Desulfurococcales* (HUBER; STETTER, 2001) e *Sulfolobales* (STETTER, 1989). Porém, os clones obtidos em sua maioria não mostraram relação filogenética com arqueas conhecidas, e provavelmente representam novas espécies.

As sequências foram agrupadas em UTOs, considerando-se similaridade maior que 97%, e suas distribuições podem ser vistas na Figura 15. O número observado de UTOs foi semelhante entre as amostras das manchas brancas e as amostras do solo adjacente, conforme observado nas curvas de rarefação (Figura 16). Em BT foram obtidas 25 UTOs nas manchas brancas (BT-M) e 26 UTOs no solo adjacente (BT-S), sendo que 12 UTOs foram exclusivas das manchas, das quais 10 pertencem a *Thermoprotei*. Em IC1 foram obtidas 24 UTOs nas manchas brancas (IC1-M) e 23 UTOs no solo adjacente (IC1-S), sendo que 13 UTOs foram exclusivas das manchas brancas, das quais 8 pertencem a *Thermoprotei*. Em IC2 foram obtidas 27 UTOs nas manchas brancas (IC2-M) e 24 UTOs no solo adjacente (IC2-S), sendo que 14 UTOs foram exclusivas das manchas, das quais 10 UTOs pertencem a *Thermoprotei*.

A estimativa de riqueza de UTOs nas manchas brancas não foi significativamente diferente da riqueza de UTOs no solo adjacente. Da mesma forma, os índices de diversidade de Shannon e a recíproca do índice de Simpson não diferiram estatisticamente (Tabela 12).

Figura 15- Diagramas de Venn com a distribuição do número de UTOs de *Archaea* em Bertioiga, a) BT-S e BT-M; e em Ilha Comprida, b) IC1-S e IC1-M; c) IC2-S e IC2-M

Figura 16 - Curva de rarefação indicando o número estimado de UTOs em bibliotecas de clones do gene rRNA 16S de *Archaea* nos Espodossolos de Bertioiga (BT) e de Ilha Comprida (IC1 e IC2), nas manchas brancas (M) e no solo adjacente (S)

Tabela 11 - Abundância de grupos filogenéticos de *Archaea* em Espodossolos de Bertioiga (BT) e de Ilha Comprida (IC1 e IC2), na mancha branca (M) e no solo adjacente (S)

Grupo filogenético	BT-S		BT-M		IC1-S		IC1-M		IC2-S		IC2-M	
	%	Nº de	%	Nº de	%	Nº de	%	Nº de	%	Nº de	%	Nº de
	Total	clones	Total	clones	Total	clones	Total	clones	Total	clones	Total	clones
<i>Euryarchaeota</i>	3,7	3	3,7	3	4,4	4	5,1	4	2,4	2	6,3	5
<i>Halobacteria</i>	ND	ND	ND	ND	1,1	1	ND	ND	1,3	1	ND	ND
<i>Thermoprotei</i>	63,0	51	76,8	63	81,3	74	82,1	64	82,9	68	87,4	70
Não-classificada	33,3	27	19,5	16	13,2	12	12,8	10	13,4	11	6,3	5
Total	100	81	100	82	100	91	100	78	100	82	100	80

ND, não detectado.

Tabela 12 - Estimativa de riqueza de UTOs, índice de diversidade e cobertura de amostragem calculados a partir da análise de sequências de clones do gene rRNA 16S de *Archaea* de amostras de Espodossolos de Bertioiga (BT), e de Ilha Comprida (IC1 e IC2), na mancha branca (M) e no solo adjacente (S)

Comunidade	NS ^a	NU ^b	Estimativa de riqueza de UTOs		Índice de Diversidade		ECA ^e
			ACE	Chao1	Shannon ^c	1/D ^d	
D = 0,03							
BT-S	81	26	39,5 (30,0; 68,3)	62,0 (33,7; 194,7)	2,91 (2,73; 3,08)	13,93 (10,46; 20,85)	0,852
BT-M	82	25	70,0 (40,1; 159,5)	67,7 (36,1; 189,5)	2,49 (2,24; 2,75)	7,17 (4,95; 13,00)	0,805
IC1-S	91	23	29,1 (24,6; 46,1)	29,4 (24,4; 52,9)	2,55 (2,32; 2,78)	7,49 (5,21; 13,35)	0,912
IC1-M	78	24	31,2 (26,0; 49,7)	32,1 (25,8; 59,6)	2,73 (2,50; 2,95)	9,42 (6,35; 18,20)	0,885
IC2-S	82	24	34,6 (27,2; 59,3)	34,0 (26,4; 65,7)	2,55 (2,29; 2,81)	6,83 (4,64; 12,98)	0,878
IC2-M	80	27	35,5 (29,6; 55,0)	31,5 (28,0; 46,9)	2,97 (2,79; 3,15)	14,35 (11,02; 20,57)	0,887

Para a definição de UTOs utilizou-se D = 0,03.

^aNúmero de sequências.

^bNúmero de UTOs determinado pelo DOTUR.

^cEstimador de máxima semelhança.

^dRecíproco do índice de Simpson (estimador de máxima semelhança).

^eEstimativa de cobertura de amostragem. Valores entre parênteses representam o intervalo com 95% de confiança.

Na comparação múltipla entre as bibliotecas de clones, as comunidades de *Archaea* nas manchas brancas e no solo adjacente, não foram significativamente diferentes nos três perfis de Espodossolos analisados. Diferenças significativas foram observadas quando comparados o perfil de Bertioiga com os perfis de Ilha Comprida, utilizando S-LIBSHUFF (LIBSHUFF $P = 0,001$; Bonferroni corrigido P para comparação de duas bibliotecas é $0,005$, utilizando “*experimentwise*” $P = 0,01$) (Tabela 13).

Tabela 13 - Valores de p calculado nas comparações múltiplas entre as bibliotecas de clones do gene rRNA 16S das comunidades de *Archaea* de amostras de Espodossolos de Bertioiga (BT) e de Ilha Comprida (IC1 e IC2), na mancha branca (M) e no solo solo adjacente (S)

Homólogo	Heterólogo					
	BT-S	BT-M	IC1-S	IC1-M	IC2-S	IC2-M
BT-S	-	0,0232	0,0002	0,0001	0,0004	0,0002
BT-M	0,0345	-	0,0001	0,0002	0,0004	0,0003
IC1-S	0,0001	0,0002	-	0,0226	0,0301	0,0500
IC1-M	0,0004	0,0001	0,6281	-	0,8277	0,0082
IC2-S	0,0001	0,0002	0,0128	0,0078	-	0,0321
IC2-M	0,0004	0,0001	0,9725	0,0284	0,9221	-

Valores mínimos para diferença significativa: 0,0003 e 0,0017 para 1% e 5% de probabilidade, respectivamente.

As arqueas têm sido relatadas nos mais diversos ambientes, incluindo solos sob agricultura (GATTINGER et al., 2006), floresta (PESARO; WIDMER, 2002), pastagem (NICOL; GLOVER; PROSSER et al., 2003), solos de mangue e marisma (CURY, 2006). No solo estão envolvidas principalmente nas transformações de carbono e nitrogênio (GATTINGER et al., 2006). Recentemente Dekas; Poretsky e Orphan (2009) mostraram que arqueas em consórcio com bactérias são capazes de fixar N_2 no fundo do mar. Assim, as atividades metabólicas de arqueas são diversas e ainda pouco estudadas. Dessa forma, muitos dos clones não classificados, obtidos dos Espodossolos estudados, podem representar espécies de arqueas ainda não descritas.

Na literatura não há relatos da ocorrência de arqueas em Espodossolos, possivelmente pelo fato da ecologia microbiana desse ambiente ainda ser pouco estudada. Contudo esses micro-organismos podem desenvolver importantes papéis na formação de Espodossolos, pois são micro-organismos que têm uma alta capacidade de se desenvolver em ambientes com baixo pH e alta salinidade (BUCLEY; GRABER; SCHIMIDT, 1998), condições comuns dessa classe de solo.

3 CONCLUSÕES

Os Espodossolos estudados são ácidos e pobres em nutrientes.

A estrutura das comunidades bacterianas apresentou variações ao longo do perfil dos Espodossolos, sendo diferentes nas manchas brancas em relação ao solo adjacente, nos três perfis estudados.

Pseudomonas e *Acidobacteria* são predominantes nas manchas brancas dos Espodossolos de Bertioxa e Ilha Comprida, respectivamente, e podem estar envolvidas na formação das mesmas.

As comunidades bacterianas nas manchas brancas dos diferentes Espodossolos avaliados são diferentes, sugerindo que a seleção de grupos bacterianos específicos nas manchas pode depender de condições ambientais específicas.

A estrutura das comunidades de *Archaea* variou ao longo do perfil dos Espodossolos estudados.

As comunidades de *Archaea* não mostraram variação entre as amostras das manchas brancas e do solo adjacente nos Espodossolos estudados.

REFERÊNCIAS

- ABELL, G.C.J.; BOWMAN, J.P. Colonization and community dynamics of class Flavobacteria on diatom detritus in experimental mesocosms based on Southern Ocean seawater. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 53, p. 379–391, 2005.
- AGNELLI, A.; ASCHER, J.; CORTI, G.; CECCHERINI, M.T.; NANNIPIERI, P.; PIETRAMELLARA, G. Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 859–868, 2004.
- ASSIS, F. **ASSISTAT 7.5** (2009). Disponível em: <<http://www.assistat.com/indexp.html#down>>. Acesso em: 7 dez. 2009.
- BALKWILL, D.L.; MURPHY, E.M.; FAIR, D.M.; RINGELBERG, D.B.; WHITE, D.C. Microbial communities in high and low recharge environments: implications for microbial transport in the vadose zone. **Microbial Ecology**, New York, v. 35, p. 156–171, 1998.
- BENEDETTI, M.M.; SPAROVEK, G.; COOPER, M.; CURI, N.; CARVALHO FILHO, A. Representatividade e potencial de utilização de um banco de dados de solos do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 2591-2600, 2008.
- BISSANI, C.A.; GIANELLO, C.; CAMARGO, F.A.O.; TEDESCO, M.J. **Fertilidade dos solos e manejo da adubação de culturas**. 2 ed. Porto Alegre: Metrópole, 2008. 344p.
- BOTTON, M.; HICKEL, E.; PEREIRA, A.R.; ANGELOCCI, L.R.; SENTELHAS, P.C. **Agrometeorologia: fundamentos e aplicações práticas**. Guaíba: Agropecuária, 2002. 478p.
- BREEMEN, N.V.; BUURMAN, P. **Soil formation**. 2nd ed. Wageningen: Wageningen University, 2002. 404 p.
- BUCKLEY, D.H.; GRABER, J.R.; SCHMIDT, T.M. Phylogenetic analysis of nonthermophilic members of the kingdom *Crenarchaeota* and their diversity and abundance in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 4333-4339, 1998.
- BUNDT, M.; WIDMER, F.; PESARO, M.; ZEYER, J.; BLASER, P. Preferential flow paths: biological ‘hot spots’ in soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 33, p.729–738, 2001.
- BUURMAN, P.; SCHELLEKENS, J.; FRITZE, H.; NIEROP, K.G.J. Selective depletion of organic matter in mottled podzol horizons. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 607-621, 2007.
- BUURMAN, P.; JONGMANS, A.G. Podzolisation and soil organic matter dynamics. **Geoderma**, Amsterdam, v. 125, p. 71-85, 2005.

CHAO, A.; CHEN, T.C. SPADE 3.1 (2006). Disponível em: <<http://chao.stat.nthu.edu.tw>>. Acesso em: 20 maio 2009.

COELHO, M.R. **Caracterização e gênese de Espodossolos da planície costeira do Estado de São Paulo**. 2008. 270p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

COLE, J.R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; McGARREL, D.M.; MARSH, T.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 37, p. 141-145, 2009.

CORAIN, B.; NICOLINI, M.; ZATTA, P. Aspects of the bioinorganic chemistry of aluminium (III) relevant to the metal toxicity. **Coordination Chemistry Reviews**, Lausanne, v. 112, p. 33-45, 1992.

COTTRELL, M.T.; KIRCHMAN, D.L. Natural assemblages of marine Proteobacteria and members of the Cytophaga- Flavobacter cluster consuming low- and high-molecularweight dissolved organic matter. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 1692-1697, 2000.

COVERT, J.S.; MORAN, M.A. Molecular characterization of estuarine bacterial communities that use high- and low molecular weight fractions of dissolved organic carbon. **Aquatic Microbiology Ecology**, Hamburg, v. 25, p. 127-139, 2001.

CURY, C.J. **Diversidade de Bacteria e Archaea em solos de mangue e marisma**. 2006. 151 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

DIAS, H.C.T.; SCHAEFER, C.E.G.R.; FERNANDES FILHO, E.I.; OLIVEIRA, A. P.; MICHEL, R.F.M.; LEMOS JR, J.B. Caracterização de solos altimontanos em dois transectos no Parque Estadual do Ibitipoca (MG). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, p. 469-481, 2003.

DEKAS, A.E.; PORETSKY, R.S.; ORPHAN, V.J. Deep-Sea Archaea fix and share nitrogen in methane-consuming microbial consortia. **Science**, Washington, v. 326, p. 422-426, 2009.

DeLONG, E.F. Archaea in coastal marine environments. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, v. 89, p. 5685-5689, 1992.

DRIESSEN, P.M.; DUDAL, R. **Lecture notes on the geography, formation, properties and use of the major soils of the world**. Wageningen, Agricultural University /Katholieke, Universiteit Leuven, 1989. 296p.

DRIESSEN, P.; DECKERS, J.; NACHTERGAELE, F. **Lecture notes on the major soils of the world**. Rome: FAO, 2001. (World Soil Resources Reports, 94).

EICHORST, S.A.; BREZNAK, J.A.; SCHMIDT, T.M. Isolation and characterization of soil bacteria that define terriglobus gen. nov., in the Phylum Acidobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 8, p. 2708–2717, 2007.

EKPO, M.A.; UDOFIA, U.S. Rate of biodegradation of crude oil by microorganisms isolated from oil sludge environment. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 7, p. 4495-4499, 2008.

EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa de Solos – EMBRAPA/CNPS. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro, 2006. 306p.

EMERSON, D.; RENTZ, J.A.; LILBURN, T.G.; DAVIS, R.E.; ALDRICH, H.; CHAN, C.; MOYER, C.L. A novel lineage of proteobacteria involved in formation of marine Fe-oxidizing microbial mat communities. **PLoS ONE**, Cambridge, v. 2, p. e667, 2007.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II error probabilities. **Genome Research**, New York, v. 8, p. 186-194, 1998.

FELSENSTEIN, J. **PHYLIP 3.66**. (2006) Disponível em: <<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>> Acesso em: 8 dez. 2009.

FIERER, N.; BRADFORD, M.A.; JACKSON, R.B. Towards an ecological classification of soil bacteria. **Ecology**, Washington, v. 88, p. 1354-1364, 2007.

FRITZE, H.; PIETIKÄINEN, J.; PENNANEN, T. Distribution of microbial biomass and phospholipid fatty acids in Podzol profiles under coniferous Forest. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 51, p. 565-573, 2000.

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

GAO, B.; GUPTA, R.S. Conserved indels in protein sequences that are characteristic of the phylum Actinobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v.55, p. 2401-2412, 2005

GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T.G. Taxonomic Outline of the Prokaryotes. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer. 2004. 721 p.

GATTINGER, A.; ELHOTTOVA, D.; LABRENZ, M.; WAGNER, D.; MUNCH, J.C.; SCHOLTER, M. Structure and function of archaeal communities in natural and agriculturally used soil ecosystems. **Geophysical Research Abstracts**, Kaltenburg-Lindau, v.80, p.6426, 2006.

GELSOMINO, A.; KEIJZER-WOLTERS, A.C.; CACCO, G.; Van ELSAS, J.D. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 38, p. 1-15, 1999.

GOMES, F. H.; VIDAL-TORRADO, P.; MACÍAS, F.; GHERARDI, B.; PEREZ, X.L.O. Solos sob vegetação de restinga na Ilha do Cardoso (SP). I - Caracterização e classificação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 31, p. 1563-1580, 2007.

HAICHAR, F.Z.; ACHOUAK, W.; CHRISTEN, R.; HEULIN, T.; MAROL, C.; MARAIS, M.F.; MOUGEL, C.; RANJARD, L.; BALESDENT, J.; BERGE, O. Identification of cellulolytic bacteria in soil by stable isotope probing. **Environmental Microbiology**, Oxon, v. 9, p. 625–634, 2007.

HUANG, D.L.; ZENG, G.M.; FENG, C.L.; HUA, S.; LAI, C.; ZHAO, M.H.; SU, F.F.; TANG, L.; LIU, H.L. Changes of microbial population structure related to lignin degradation during lignocellulosic waste composting. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 101, p. 4062–4067, 2010.

HUBER, H.; STETTER, K.O. Order II. *Desulfurococcales* ord. nov. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, G.M. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer. 2001. 169 p.

HUBER, H.; HOHN, M.J.; RACHEL, R.; FUCHS, T.; WIMMER, V.C.; STETTER, K.O. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. **Nature**, London, v. 417, p. 63-67, 2002.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, n. 18, p. 4765–4774, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE 2005. **Mapa de solos**. Disponível em: <<http://mapas.ibge.gov.br/solos/viewer.htm>>. Acesso em: 25 maio. 2009.

JACQUES, R.J.S.; OKEKE, B.C.; BENTO, F.M.; TEIXEIRA, A.S.; PERALBA, M.C.R.; CAMARGO, F.A.O. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 99, p. 2637-2643, 2008.

JANSSEN, P.H. Identifying the dominant soil bacterial tax aim Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 1719-1728, 2006.

KASAI, M.; SASAKI, M.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H. Aluminium stress increases K⁺ efflux and activities of ATP- and PPi-dependent H⁺ pumps of tonoplast-enriched membrane vesicles from barley roots. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 33, p. 1035–1039, 1992.

KEMNITZ, D.; KOLB, S.; CONRAD, R. High abundance of Crenarchaeota in a temperate acidic forest soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 60, p.442–448, 2007.

KIEFT, T.L.; MURPHY, E.M.; HALDEMAN, D.L.; AMY, P.S.; BJORNSTAD, B.N.; McDONALD, E.V.; RINGELBERG, D.B.; WHITE, D.C.; STAIR, J.; GSELL, R.P.G.T.C.;

HOLBEN, W.E.; BOONE, D.R. Microbial transport, survival, and succession in a sequence of buried sediments. **Microbial Ecology**, New York, v. 36, p. 336–348, 1998.

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

KIRCHMAN, D.L. The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 30, p. 91-100, 2002.

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**, Berks, v. 58, p. 1114–1122, 2008.

LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETA, C.; BULL, R.C. Diversidade microbiana nos solos: Definindo novos paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M.; SILVA, A.P.; CARDOSO, E.J. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira do Ciência do Solo, 2005. v. 4, p. 43- 84.

LAMBAIS, M.R., CROWLEY, D.E., CURY, J.C., BÜLL, R.C., RODRIGUES, R.R. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic Forest. **Science**, Washington, v. 312, p. 1917-1917, 2006.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R., McGETTIGAN, P.A., McWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I.M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., HIGGINS, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LEE, K.; LIU, C.; ANZAI, Y.; KIM, H.; AONO, T.; OYAIZU, H. The hierarchical system of the ‘Alphaproteobacteria’: description of Hyphomonadaceae fam. Nov., Xanthobacteraceae fam. Nov. and Erythrobacteraceae fam, nov. **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbioly**, Berks, v. 55, p. 1907-1919, 2005.

MALIK, S.; BEER, M.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. **Environment International**, Amsterdam, v. 34, p. 265-276, 2008.

MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K.V. **Five kingdoms**: an illustrate guide to the phyla of life on earth. 3nd. ed. New York: WH Freeman, 1998. 520p.

MARTINS, V.M. **Relação solo-relevo-substrato geológico na planície costeira de Bertioga (SP)**. 2009. 273p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - USP, São Paulo. 2009.

McKEAGUE, J.A.; DeCONINCK, F.; FRANZMEIER, D.P. Spodosols. In: WILDING, L.P.; SMECK, N.E.; HALL, G.F. **Pedogenesis and soil taxonomy**: II the soil orders. Amsterdam Elsevier, 1983. 410p.

MOAT, A.G.; FOSTER, J.W.; SPECTOR, M.P.. **Microbial physiology**. 4nd ed. London: Blackwell Scientific, 2002. 675p.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2 ed. Lavras: UFLA, 2006. 729p.

MOYER, C.L.; TIEDJE, J.M.; DOBBS, F.C.; KARL, D.M. Diversity of deep-sea hydrothermal vent Archaea from Loihi Seamount, Hawaii. **Deep-sea Research**, Oxford, v.45, p. 303-317, 1998.

NICOL, G.W.; GLOVER, L.A.; PROSSER, J.I. Spatial analysis of archaeal community structure in grassland soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 7420-7429, 2003.

OLIVEIRA, A.P. **Pedogênese de Espodossolos em ambientes da formação Barreiras e de Restinga do sul da Bahia**. Dissertação (Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

OR, D.; SMETS, B.F.; WRAITH, J.M.; DECHESNE, A.; FRIEDMAN, S.P. Physical constraints affecting bacterial habitats and activity in unsaturated porous media – a review. **Advances in Water Resources**, Oxon, v. 30, p. 1505–1527, 2007.

ØVREÅS, L., FORNEY, L., DAAE, F.L., TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3367-3373, 1997.

ØVREÅS, L.; DAAE, F.L.; TORSVIK, V.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. Characterization of Microbial Diversity in Hypersaline Environments by Melting Profiles and Reassociation Kinetics in Combination with Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP). **Microbial Ecology**, New York, v. 46, p. 291–301, 2003.

PESARO, M.; WIDMER, F. Identification of novel Crenarchaeota and Euryarchaeota clusters associated with different depth layers of a forest soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v.42, p.89–98, 2002.

PRIMER 5 FOR WINDOWS. Versão 5.2.6, Primer-E. 2001.

RAIJ, B. van; QUAGGIO, A.J.; CANTARELLA, H.; ABREU, C.A. . Interpretação de análise de solo. In RAIJ, B.van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, A.J.; FURLANI, A.M.C. **Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo**. 2ed. Campinas: Instituto Agrônomo, 1996. (Boletim Técnico, 100).

RAIJ, B. van, ANDRADE, J.C., CANTARELLA, H., QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2001. 285p.

RAPPE, M.S.; GIOVANNONI, S.J. The uncultured microbial majority. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 57, p. 369-394, 2003.

- REYSENBACH, A.L. Class I. Thermoprotei class. nov. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W.; GARRITY, G.M. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York: Springer. 2001. p. 169–210.
- ROBERTSON, C.E.; HARRIS, J.K.; SPEAR, J.R.; PACE, N.R. Phylogenetic diversity and ecology of environmental *Archaea*. **Current Opinion in Microbiology**, London. v. 8, p. 638–642, 2005.
- ROESCH, L.F.W.; FULTHORPE, R.R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A.K.M.; KENT, A.D.; DAROUB, H.S.; CAMARGO, F.A.O.; FARMERIE, W.G.; TRIPLET, E.W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **ISME Journal**, New York, v. 1, p. 283–290, 2007.
- RONAGHI, M.; UHLÉN, M.; NYRÉN, P. DNA sequencing: a sequencing method based on real-time pyrophosphate. **Science**, Washington, v. 281. n. 5375. p. 363 – 365. 1998.
- ROSSELLO-MORA, R.A.; LALUCAT, J.; GARCIA-VALDES, E. Comparative biochemical and genetic analysis of naphthalene degradation among *Pseudomonas stutzeri* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 966–972, 1994.
- SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing to DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1501–1506, 2005.
- 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.
- SINGLETON, D.R.; FURLONG, M.A.; RATHBUN, S.L.; WHITMAN, W.B. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4374–4376, 2001.
- STETTER, K.O. Order III. *Sulfolobales* ord. nov. Family *Sulfolobaceae* fam. nov. In: STALEY, J.T.; BRYANT, M.P.; PFENNIG, N.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Springer. 1989. 169 p.
- TAMAIA, N.; TAKENAKA, C.; ISHIZUKA, S. Water-soluble Al inhibits methane oxidation at atmospheric concentration levels in Japanese forest soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 1730–1736, 2007.
- TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 782–787, 1990.
- TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 5, p. 240–245, 2002.

UEDA, T.; SUGA, Y.; MATSUGUCHI, T. Molecular phylogenetic analysis of a soil microbial community in a soybean field. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 46, p. 415-421, 1995.

WARD, N.L.; CHALLACOMBE, J.F.; JANSSEN, P.H.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P.M.; WU, M.; XIE, G.; HAFT, D.H.; SAIT, M.; BADGER, J.; BARABOTE, R.D.; BRADLEY, B.; BRETTIN, T.S.; BRINKAC, L.M.; BRUCE, D.; CREASY, T.; DAUGHERTY, S.C.; DAVIDSEN, T.M.; DEBOY, R.T.; DETTER, J.C.; DODSON, R.J.; DURKIN, A.S.; GANAPATHY, A.; GWINN-GIGLIO, M.; HAN, C.S.; KHOURI, H.; KISS, H.; KOTHARI, S.P.; MADUPU, R.; NELSON, K.E.; NELSON, W.C.; PAULSEN, I.; PENN, K.; REN, Q.; ROSOVITZ, M.J.; SELENGUT, J.D.; SHRIVASTAVA, S.; SULLIVAN, S.A.; TAPIA, R.; THOMPSON, L.S.; WATKINS, K.L.; YANG, Q.; YU, C.; ZAFAR, N.; ZHOU, L.; KUSKE, C.R. Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 7, p. 2046-2056, 2009.

WATERS, E.; HOHN, M.J.; AHEL, I.; GRAHAM, D.E.; ADAMS, M.D.; BARNSTEAD, M.; BEESON, K.Y.; BIBBS, L.; BOLANOS R; KELLER, M.; KRETZ, K.; LIN, X.; MATHUR, E.; NI, J.; PODAR, M.; RICHARDSON, T.; SUTTON, G.G.; SIMON, M.; SOLL, D.; STETTER, K.O.; SHORT, J.M.; NOORDEWIER, M. The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism. **Proceedings of the National Acadademy Sciences**, Washington, v. 100, p. 12984-12988, 2003.

WEN, Q.; CHEN, Z.; ZHAO, Y.; ZHANG, H.; FENG, Y.. Biodegradation of polyacrylamide by bacteria isolated from activated sludge. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 175, p. 955-959, 2010.

WOESE, C.R.; FOX, G.E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Acadademy Sciences**, Washington, v. 74, p. 5088-5090, 1977.

ZHAO H.P.; WU, Q.S.; WANG, L.; ZHAO, X.T.; GAO, H.W. Degradation of phenanthrene by bacterial strain isolated from soil in oil refinery fields in Shanghai China. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 164, p. 863-869, 2009.

ZILLIG, W.; TU, J.; HOLZ, I. *Thermoproteales* - a 3rd order of thermoacidophilic archaeobacteria. **Nature**, London, v. 293, p. 85-86, 1981.