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

**Efeito da seca e chuva sobre a comunidade microbiana da rizosfera
de leguminosas da Caatinga**

Milena Duarte Lançoni

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de Concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2014**

Milena Duarte Lançoni
Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas

**Efeito da seca e chuva sobre a comunidade microbiana da rizosfera de
leguminosas da Caatinga**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ITAMAR SOARES DE MELO**

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

**Piracicaba
2014**

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

Lançoni, Milena Duarte

Efeito da seca e chuva sobre a comunidade microbiana da rizosfera de leguminosas da
Caatinga / Milena Duarte Lançoni. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr
6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.
130 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.
Bibliografia.

1. Caatinga 2. Semiárido 3. Bactérias 4. Biodiversidade 5. Leguminosas 6. Seca
Título

CDD 631.46
L251e

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

Dedico

Aos meus pais, Jair e Alaide
minhas irmãs, Bruna e Natália,
meu amado Michel.
Pelo seu amor e compreensão.

Ofereço

Aos meus sobrinhos,
Ian, Henrique e Isadora.
Pra que seu mundo seja melhor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem devemos todos os momentos de nossa vida, e à São Jorge, santo protetor, sempre a frente de minhas batalhas.

À Universidade de São Paulo e à Capes, pela oportunidade de curso e concessão de bolsa de estudos.

À Embrapa, por oferecimento de espaço e materiais para a pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Itamar Soares de Melo, por atender meu pedido, me permitindo permanecer em seu laboratório e auxílio.

Ao Dr. Rodrigo Gouvêa Taketani, pela ajuda, dedicação e extrema paciência nessa passagem, obrigadinha!

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Ambiental, pela companhia, alegria, aulas grátis (em especial à Suiki e Vanessa) e comidinhas do fim de tarde.

Aos funcionários da Embrapa, em particular ao Alexandre (Parmera), Márcia e Rosely, por me ajudarem na caça aos materiais, pelas risadas e pela ajuda como um todo desde o meu treinamento.

À minha família: ao Willian, por me apresentar ao Itamar, à Diani por suas aulas de microbiologia pra pseudo-informata aqui, à Érica, pelas minhas correções e traduções do inglês que não entrava na minha cabeça por nada; e a todos que fazem parte dela, por terem lido ao menos uma vez esse trabalho e dado sua opinião, entenderem meus momentos de estudo, meu jeito autista e mesmo assim gostarem de mim. Obrigada!

Aos meus amigos mais que especiais: Ciça, Igor, Eizo, Volpe e Eduardo, por sempre acreditarem na minha capacidade e por sua companhia nos bons momentos. À Gabriela Tuono e toda sua família, pelos momentos de lazer, por me adotar e me aguentar sem obrigação nenhuma! Vocês são muito importantes na minha vida, e espero tê-los sempre por perto!

Aos bobões Kito, Wagnão, Bola, Caquinha, Guzz, Cássia, Dorfo e Nicholas, pelo truco, pela companhia aos fins de semana e pela música incessante, fungô!

À Carol Kmit, por me dar casa, comida e roupa lavada (haha)! E especialmente pela agradabilíssima companhia nesses anos! Valeu fiota!

Agradeço a todos que de forma direta ou indireta fizeram parte da minha formação, de funcionários a professores! Sem vocês, de maneira alguma teria chegado onde cheguei!

Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 OBJETIVOS E HIPÓTESES.....	23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
3.1 O semiárido brasileiro: Caatinga.....	25
3.1.1 Semiárido.....	25
3.1.2 Vegetação da Caatinga.....	27
3.2 Ecologia Microbiana.....	28
3.2.1 Rizosfera e Micro-organismos.....	29
3.2.2 Micro-organismos de ambientes extremos.....	30
3.3 Ferramentas Moleculares de Pesquisa.....	31
4 METODOLOGIA.....	35
4.1 Coleta.....	35
4.2 Extração de DNA.....	35
4.3 Amplificação dos genes marcadores e análise de fragmentos.....	36
4.3.1 Amplificação do gene <i>rrs</i> da comunidade bacteriana.....	36
4.3.2 Amplificação do gene <i>rrs</i> da comunidade de arqueias.....	37
4.3.3 Amplificação do genes <i>amoA</i> da comunidade de arqueias oxidadoras de amônio (AOA).....	37
4.3.4 Restrição e Precipitação.....	38
4.3.5 Processamento e análise de T-RFLP.....	39
4.4 Sequenciamento em larga escala por Ion Torrent.....	39
4.5 Análises estatísticas e índices ecológicos.....	45
4.5.1 Teste de Mantel.....	45
4.5.2 ANOSIM.....	45
4.5.3 PCA.....	45
4.5.4 CCA.....	46
4.5.5 NMDS.....	46
4.5.6 Correlação de Spearman e network.....	47
5 RESULTADOS.....	49

6 DISCUSSÃO.....	81
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	95
REFERÊNCIAS.....	97
ANEXOS.....	117

RESUMO

Efeitos da seca e chuva sobre a comunidade microbiana da rizosfera de leguminosas da Caatinga

Propriedades que constituem um clima árido são encontradas distribuídas por todo o globo terrestre. A Caatinga, bioma semi-árido brasileiro, se estende por 11% do território nacional e tem particularidades tanto em relação ao clima, volume de chuvas e temperatura, quanto à sua composição flora e faunística. Micro-organismos associados a plantas provêm defesas e resistência a diferentes estresses abióticos ou bióticos. Este trabalho teve por objetivo avaliar a comunidade rizosférica microbiana de duas leguminosas, *Mimosa tenuiflora* e *Piptadenia stipulacea*, a fim de caracterizar seus componentes e sua interação com as plantas e o ambiente, por meio de abordagem molecular, com T-RFLP, através do gene 16S rRNA de arqueias e bactérias e sequenciamento em larga escala por Ion Torrent dos genes 16SrRNA de bactérias, além de métodos estatísticos como ferramenta de avaliação dessa interação. Os resultados mostram que: ambas as comunidades são diversas quando comparados os dois períodos de coleta, chuvoso e seco; as espécies de leguminosas não influem na composição da população e que zinco, ferro, fósforo e boro são os componentes do solo mais ativos sobre as comunidades de bactérias e arqueias. Dentre os onze gêneros de bactérias mais abundantes no período seco (<1%): *Mycobacterium*, *Bacillus*, MC18, *Rhodoplanes*, *Pseudonocardia*, *Streptomyces*, *Candidatus Solibacter*, *Saccharopolyspora*, *Rubrobacter*, *Bradyrhizobium* e *Solitubrobacter* – seis apresentam atributos capazes de trazer benefícios para as plantas às quais estão associadas e seis têm características consideradas extremófilas.

Palavras-chave: Caatinga; Semiárido; Bactérias; Biodiversidade; Leguminosas; seca

ABSTRACT

Drought and rainy effects on the rizospheric microbial community of leguminous plants of Caatinga

Arid climate properties are found distributed throughout the globe. Caatinga is the Brazilian semiarid biome with 11% of the national territory and has peculiar climate, rainfall and temperature, and the flora and faunal composition. Plant associated micro-organisms promote defenses and resistance to various biotic and abiotic stresses. This study aims characterized the rhizospheric microbiome of two leguminous trees from Caatinga, *Mimosa tenuiflora* and *Piptadenia stipulacea*, their interaction with plant and environment through molecular approaches, T-RFLP of archaeal and bacterial 16S rRNA and high-throughput sequencing by Ion Torrent of the bacterial 16S rRNA addition to statistics methods as assessment tool for evaluation of the interaction. The results show that both archaeal and bacterial communities are different when comparing dry and rainy seasons, plant species do not exercises influences in the population composition, zinc, iron and boron are the most active soil components on the communities. Six of the eleven bacteria genera more abundant in the dry season (<1%) are related to benefits to the plant associated while six have extremophiles characteristics, all of them are: *Mycobacterium*, *Bacillus*, MC18, *Rhodoplanes*, *Pseudonocardia*, *Streptomyces*, *Candidatus Solibacter*, *Saccharopolyspora*, *Rubrobacter*, *Bradyrhizobium* e *Solitubrobacter*.

Keywords: Caatinga; Semi-arid; Bacteria; Biodiversity; Leguminous plants; Drought

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mapa do Bioma Caatinga representando seis das oito ecorregiões consideradas de Extrema importância Biológica. Fonte: PPBio, 2011.....26
- Figura 2 - a. *Mimosa tenuiflora*; b. Inflorescência de *M. tenuiflora*.....28.
- Figura 3 - a. Ramo de *Piptadenia stipulacea*; b. Inflorescência de *P. stipulacea*.....28
- Figura 4 - Esquema de análises e ferramentas moleculares utilizadas na pesquisa de comunidade microbiana ambiental (retirada e adaptada de ELSAS & BOERSMA (2011)).....32
- Figura 5a - Médias da fluorescência medida para 16S bactéria para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 1 (1) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M1bacch: *M. tenuiflora*, ponto 1, bactéria, período chuvoso; S1bacsc: *P. stipulacea*, ponto 1, bactéria, período seco.....51
- Figura 5b - Médias da fluorescência medida para 16S bactéria para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 2 (2) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M2bacch: *M. tenuiflora*, ponto 2, bactéria, período chuvoso; S2bacsc: *P. stipulacea*, ponto 2, bactéria, período seco.....52
- Figura 5c - Médias da fluorescência medida para 16S bactéria para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 3 (3) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M3bacch: *M. tenuiflora*, ponto 3, bactéria, período chuvoso; S3bacsc: *P. stipulacea*, ponto 3, bactéria, período seco.....53
- Figura 5d - Médias da fluorescência medida para 16S bactéria para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 4 (4) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.:

M4bacch: *M. tenuiflora*, ponto 4, bactéria, período chuvoso;
 S4bacsc: *P. stipulacea*, ponto 4, bactéria, período seco.....54

Figura 5e - Médias da fluorescência medida para 16S bactéria para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 5 (5) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M5bacch: *M. tenuiflora*, ponto 5, bactéria, período chuvoso; S5bacsc: *P. stipulacea*, ponto 5, bactéria, período seco.....55

Figura 6 - Gráfico CCA do perfil T-RFLP de 16S de bactéria para os dois períodos de coleta.....59

Figura 7a - Médias da fluorescência medida para 16S de arqueia para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 1 (1) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M5archch: *M. tenuiflora*, ponto 1, arqueia, período chuvoso; S5archsc: *P. stipulacea*, ponto 1, arqueia, período seco.....58

Figura 7b - Médias da fluorescência medida para 16S de arqueia para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 2 (2) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M5archch: *M. tenuiflora*, ponto 2, arqueia, período chuvoso; S5archsc: *P. stipulacea*, ponto 2, arqueia, período seco.....59

Figura 7c - Médias da fluorescência medida para 16S de arqueia para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 3 (3) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M5archch: *M. tenuiflora*, ponto 3, arqueia, período chuvoso; S5archsc: *P. stipulacea*, ponto 3, arqueia, período seco.....60

Figura 7d - Médias da fluorescência medida para 16S de arqueia para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 4 (4) para os períodos de chuva e

- seca (ch e sc). P. ex.: M5archch: *M. tenuiflora*, ponto 4, arquêia, período chuvoso; S5archsc: *P. stipulacea*, ponto 4, arquêia, período seco.....61
- Figura 7e - Médias da fluorescência medida para 16S de arquêia para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 5 (5) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M5archch: *M. tenuiflora*, ponto 5, arquêia, período chuvoso; S5archsc: *P. stipulacea*, ponto 5, arquêia, período seco.....62
- Figura 8 - Gráfico CCA do perfil T-RFLP de arquêias para os dois períodos de coleta.....63
- Figura 9a - Médias da fluorescência medida para *amoA* AOA para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 1 (1) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M1AOAch: *M. tenuiflora*, ponto 1, AOA, período chuvoso; S2AOAsc: *P. stipulacea*, ponto 1, AOA, período seco.....65
- Figura 9b - Médias da fluorescência medida para *amoA* AOA para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 2 (2) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M2AOAch: *M. tenuiflora*, ponto 2, AOA, período chuvoso; S2AOAsc: *P. stipulacea*, ponto 2, AOA, período seco.....66
- Figura 9c - Médias da fluorescência medida para *amoA* AOA para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 3 (3) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M3AOAch: *M. tenuiflora*, ponto 3, AOA, período chuvoso; S3AOAsc: *P. stipulacea*, ponto 3, AOA, período seco.....67
- Figura 9d - Médias da fluorescência medida para *amoA* AOA para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 4 (4) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M4AOAch: *M. tenuiflora*, ponto 4, AOA, período chuvoso;

- S4AOAsc: *P. stipulacea*, ponto 4, AOA, período seco.....68
- Figura 9e - Médias da fluorescência medida para *amoA* AOA para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 5 (5) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M5AOAch: *M. tenuiflora*, ponto 5, AOA, período chuvoso; S5AOAsc: *P. stipulacea*, ponto 5, AOA, período seco.....69
- Figura 10 - Gráfico CCA do perfil T-RFLP de *amoA* AOA (arqueias oxidadores de amônia).....70
- Figura 11 - Heatmaps comparando os índices de dissimilaridade A – Jaccard e B – thetaYC. Cada quadrado dentro do heatmap representa uma única comparação par-a-par entre a amostra correspondente. Como indicado na legenda, comunidades mais dissimilares são mais vermelhas e comunidades mais similares são menos vermelhas.....72
- Figura 12 - NMDS das comunidades de *Bacteria* baseado nas OTUs determinadas por sequenciamento da região V6 do 16S rRNA. A – Comparação entre as amostras por Jaccard. B – Comparação entre as amostras por thetaYC.....73
- Figura 13 - PCA das amostras separadas por local de coleta: Bahia (azul escuro), Piauí (laranja), Ceará (Azul claro), Paraíba (Roxo) e Rio Grande do Norte (Verde).....74
- Figura 14 - Gráfico em barras das Classes mais representativas (frequência < 1%), destacando (*) as significativamente diferentes ($p < 0,05$) nos dois períodos de coleta para os diferentes pontos amostrados: *M. tenuiflora*, período chuvoso (Mch), *M. tenuiflora*, período seco (Msc), *P. stipulacea*, período chuvoso (Sch) e *P. stipulacea*, período seco (Ssc).....75
- Figura 15 - Gráfico em barras das Classes menos representativas (0,01% < frequência < 1%), destacando (*) as significativamente diferentes

($p < 0,05$) nos dois períodos de coleta para os diferentes pontos amostrados: M. tenuiflora, período chuvoso (Mch), M. tenuiflora, período seco (Msc), P. stipulacea, período chuvoso (Sch) e P. stipulacea, período seco (Ssc).....75

Figura 16 - Gráfico em barras das Classes mais representativas (frequência $< 1\%$), destacando (*) as significativamente diferentes ($p < 0,05$) nos dois períodos de coleta para os diferentes pontos amostrados: M. tenuiflora, período chuvoso (Mch), M. tenuiflora, período seco (Msc), P. stipulacea, período chuvoso (Sch) e P. stipulacea, período seco (Ssc).....77

Figura 17 - Gráfico em barras das Classes menos representativas ($0,01\% < \text{frequência} < 1\%$), destacando (*) as significativamente diferentes ($p < 0,05$) nos dois períodos de coleta para os diferentes pontos amostrados: M. tenuiflora, período chuvoso (Mch), M. tenuiflora, período seco (Msc), P. stipulacea, período chuvoso (Sch) e P. stipulacea, período seco (Ssc).....76

Figura 18 - Gráfico RDA com *forward selection* das Classes para os dois períodos de coleta.....78

Figura 19 - Gráfico RDA com *forward selection* dos gêneros bacterianos mais abundantes para os dois períodos de coleta.....80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Coordenadas geográficas das coletas realizadas na Bahia (BA – ponto 1), Piauí (PI – ponto 2), Ceará (CE – ponto 3), Paraíba (PB – ponto 4) e Rio Grande do Norte (RN – ponto5).....	35
Tabela 2 -	Amostras selecionadas correspondentes às estações de seca (sc) e chuva (ch) das diferentes plantas <i>M. tenuiflora</i> (M) e <i>P. stipulacea</i> (S) e suas tags (barcode) respectivas.....	40
Tabela 3 -	Amostras classificadas segundo local de coleta, período (ch=chuva, sc=seca) e espécie da planta da qual foi coletada.....	44
Tabela 4 -	Características físicas e químicas de cada ponto.....	49
Tabela 5 -	Tabela com as classes que tiveram alteração significativa em sua população ($p < 0,05$), seguidas de seus respectivos valores para p	76

1 INTRODUÇÃO

Características encontradas em todos os continentes terrestres, a baixa pluviosidade e alta temperatura são molduras para o clima árido. A partir de diferentes modulações, os ambientes podem ter padrões de seca separados em tempo integral (árido) ou sazonal (semi-árido) (QUEIROZ, 2006; POINTING E BELNAP, 2012). A Caatinga, bioma semi-árido brasileiro, que recebe este nome por sua peculiaridade em apresentar vegetação esbranquiçada no período seco do ano, consiste em cerca de 850.000km² de terreno (AB'SÁBER, 2003), e abrange grande diversidade de plantas, répteis e anfíbios, muitos deles endêmicos e com atributos bastante particulares (GIULIETTI et al., 2004; FERNANDES E MEDEIROS, 2009). O endemismo sugere adaptações específicas que provém resistência às características predominantes do ambiente. Sabe-se que muitas plantas se consorciavam aos micro-organismos, a fim de adquirir uma maior defesa a diferentes tipos de pressões: predação, doenças, estresse hídrico, nutrição (MENDES et al., 2011; BERENDSEN et al., 2012). Tais interações costumam ser simbióticas, ou seja, através de seus exsudatos a planta atrai pra perto de suas raízes organismos que utilizam-se deles pra seu metabolismo, e como produto de metabolismo primário ou secundário, devolve substâncias capazes de conceder essas barreiras aos vegetais (CARDOSO E FREITAS, 1992; STEVENSON E COLEN, 1999). Vários métodos são utilizados para se conhecer a microbiota de diferentes ambientes. Inoportunamente, muitos deles detectam apenas parte desses organismos, devido à dificuldade em se estabelecer *in vitro* características semelhantes às encontradas no seu habitat natural, impossibilitando sua reprodução (ANDREOTE, 2007). Dessa forma, técnicas moleculares vêm sendo amplamente utilizadas para se conhecer melhor as comunidades formadas por diferentes micro-organismos. Por meio de marcadores genéticos e sequenciamento de DNA (ELSAS E BOERSMA, 2011), e posterior emprego estatístico, é possível inferir vários fatores que influenciam na modulação da comunidade microbiana de determinado ambiente, bem como suas possíveis interações (PEARSON, 1901; SPEARMAN, 1904; HOTTELLING, 1933; SHEPPAR, 1966; URBAN, 2003; SOGIN et al., 2006; MELLO E HEPP, 2008; ANDREOTE et al., 2009). Este trabalho visa, por meio dessas técnicas, caracterizar a população de bactérias e arqueias presentes na rizosfera de duas leguminosas da Caatinga, a fim de responder a essas perguntas.

2 OBJETIVOS E HIPÓTESES

O trabalho objetiva caracterizar as comunidades rizosféricas de bactérias e arqueias de duas leguminosas da Caatinga e suas interações com o meio abiótico. Para tanto, intenta:

- Avaliar o perfil microbiano, através da presença do gene ribossômico 16S de bactérias no solo rizosférico das leguminosas, por T-RFLP;
- Avaliar o perfil microbiano, através da presença do gene ribossômico 16S de arqueias no solo rizosférico das leguminosas, por T-RFLP;
- Avaliar o perfil microbiano, através da presença do gene *amoA* de arqueias no solo rizosférico das leguminosas, por T-RFLP;
- Sequenciar a fração V6 do gene ribossomal 16S de bactérias, presente no solo rizosférico das leguminosas;
- Caracterizar as qualidades físicas e químicas do solo rizosférico das leguminosas.

Tais levantamentos visam responder as seguintes questões:

1. Existe, na formação da comunidade, influência gerada pelas estações seca e chuvosa?
2. Existe, na formação da comunidade, influência gerada pelas espécies de planta?
3. A comunidade microbiana responde às mudanças das qualidades físicas e químicas do solo?
4. Existe padrão biogeográfico? Ou seja, a distância geográfica dos pontos e a característica de cada um influem na modulação da comunidade?
5. Quais as principais mudanças ocorridas na comunidade bacteriana, em relação aos períodos de chuva e estresse hídrico?

6. Como se correlacionam, dentro dessa comunidade, as diferentes classes bacterianas?
7. É possível traçar uma característica dominante, baseada na bibliografia existente, sobre as bactérias mais abundantes no período seco?

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O semiárido brasileiro: Caatinga

3.1.1 Semiárido

Ambientes secos são bem distribuídos: ocupam cerca de 40% de todo o globo e são encontrados em todos os continentes. Nesses locais, a aridez pode ser por período integral ou sazonal (árido/semiárido). Ademais, mesmo em lugares onde o clima não é considerado seco, micro-nichos podem apresentar tais características, como superfícies de rochas onde o sol incide por boa parte do dia (POINTING E BELNAP, 2012).

Dentro deste perfil, o clima semiárido tem por característica baixa pluviosidade e umidade, além de temperatura relativamente elevada. O continente sul-americano é constituído em sua maior parte por áreas de climas mais amenos e úmidos, no entanto, nele também são encontrados territórios extensos que comportam este clima mais seco como a área *guajira* (Venezuela e Colômbia), um prolongamento desde a Patagônia até o piemonte dos Andes, chegando ao norte do Chile e se estendendo pela costa continental passando por Equador e Peru (QUEIROZ, 2006). No Brasil, o representante deste tipo de clima é o bioma Caatinga e ele ocupa por volta de 850.000km² do país (AB'SÁBER, 2003).

A Caatinga localiza-se numa região do globo terrestre que é bastante influenciada pelos ventos e pela incidência de Sol. O território que abrange esse bioma encontra-se em latitude baixa, próximo à linha do Equador. As regiões desérticas mais comuns encontram-se nessa região, 30° acima (latitude norte) e abaixo (latitude sul) da linha do Equador. Nesses ambientes, os ventos são a principal causa de erosão, transporte e deposição de sedimento. No Brasil, os ventos alísios são os principais responsáveis pela característica semiárida, por empurrar massas de ar estáveis para sudeste (TEIXEIRA *et al.*, 2000; PRESS *et al.*, 2006; FERNANDES E DANTAS, 2010). No entanto eventos como El Niño-Oscilação Sul (ENOS), temperatura da superfície do mar (TSM) na bacia do Atlântico, ventos alísios, pressão ao nível do mar (PNM), zona de convergência tropical (ZCIT) sobre o Atlântico, frentes frias e vórtices ciclônicos de altos níveis (VCAN) também exercem influência sobre a precipitação dessa região (FERREIRA E MELLO, 2005).

Além disso, essa é uma região que é extremamente alterada pela exploração inadequada de seus recursos e utilizada em larga escala para pastoreio e tem um solo com características bastante diversificadas. A essa localidade dá-se o nome de “Polígono das Secas”, que, pelos motivos supracitados, tem frágeis ecossistemas e grande chance de desertificação (ARAÚJO & SOUZA, 2011). Cerca de 11% do território nacional (Figura 1) é ocupado por esse bioma (AB’SÁBER, 2003), e apesar de sua grande extensão, este é um sistema pouco estudado, devido à falsa ideia de que sua biodiversidade é baixa, limitando as pesquisas às principais cidades da região. Além disso, com apenas 2% de todo o seu território circundado por unidades de conservação, este é o bioma menos preservado do país (LEAL *et al.*, 2005).

Figura 1 - Mapa do Bioma Caatinga representando seis das oito ecorregiões consideradas de Extrema importância Biológica. Fonte: PPBio, 2011.

Por um lado, a caatinga está realmente bastante alterada devido à atuação antrópica, por outro, é bastante rica e variada, com ocorrência de endemismo em relação a algumas espécies de sua vegetação. Apesar de pouco preservado, as áreas de reserva concentram quantidades expressivas de táxons raros (GIULIETTI *et al.*, 2004).

3.1.2 Vegetação da caatinga

A Caatinga recebe este nome pela característica de sua vegetação, que em parte do ano, devido à estiagem, tem coloração branca (do tupi, caa = mata e tinga = branca – “mata branca”). Dado que o bioma citado alcança desde o interior do país até a região costeira (NOZELA, 2006), a umidade relativa do ar difere, sendo mais úmida perto do mar. Assim, a caatinga pode ser dividida fitogeograficamente em dois tipos: agreste e sertão (VEBLEN, YOUNG, ORME, 2007).

O primeiro tipo é a região mais próxima ao mar, comportando árvores de 10m ou mais de altura. Esses vegetais são favorecidos pela umidade proveniente do oceano. O segundo, é constituído predominantemente de plantas menores como cactos e bromélias, atingindo alturas entre 2 e 3 metros, além de espécies arbóreo-arbustivas (VEBLEN, YOUNG, ORME, 2007), xerófilas, cauducifólias e em maior número, leguminosas (NOZELA, 2006).

Por causa de suas características bastante seletivas, o clima semi-árido fez com que a Caatinga brasileira se compusesse de vida (flora e fauna) adaptada a tais condições. Dessa forma, as principais adaptações sofridas pela flora regional são: folhas transformadas, cobertura de cera, raízes axiais com capacidade de perfuração do solo com areia, cascalho e lama, raízes tuberculadas (como batatas e xilopódios) para armazenamento de energia (FERNANDES & MEDEIROS, 2009).

De toda a vegetação encontrada na Caatinga – ao menos 932 espécies que envolvem 18 gêneros contendo 312 espécies endêmicas, sendo pertencentes a 42 famílias – a família mais numerosa em relação ao endemismo é a da Leguminosae, composta por 80 espécies deste tipo. Esta família mais representativa no bioma consiste em três subfamílias: Faboideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae (QUEIROZ, 2006). Estudos demonstram que a maior diversidade de espécies vegetais é encontrada em regiões de grande altitude e em solo rochoso (GIULIETTI *et al.*, 2011). As Figuras 2a, 2b e 3ª e 3b exemplificam duas Leguminosas bastante abundantes nesse ambiente: *Mimosa tenuiflora* e *Piptadenia stipulacea*.

A

B

A

B

Figura 2: a. *Mimosa tenuiflora*; b. Inflorescência de *M. tenuiflora*.

Figura 3: a. Ramo de *Piptadenia stipulacea*; b. Inflorescência de *P. stipulacea*.

O crescimento e desenvolvimento vegetal dependem dos nutrientes presentes no solo e, devido à ação de micro-organismos ctônicos, estes se apresentam em forma inorgânica para a utilização das plantas. A atividade microbiana promove o que chamamos de ciclos biogeoquímicos e é de grande interesse quando estes ciclos acontecem próximos ao vegetal, próximo às suas raízes. O ambiente composto pela interação solo-raiz é conhecido por rizosfera.

3.2 Ecologia microbiana

A ecologia microbiana abrange todas as interações biológicas dos micro-organismos: com o meio em que vivem e com os outros micro-organismos, destacando sua biodiversidade e sua atividade, ou seja, o papel desempenhado por esses seres. (MADINGAN *et al.*, 2010). Nesse trabalho, deu-se enfoque à área que trata sobre as interações da microbiota do solo com as plantas.

3.2.1 Micro-organismos e Rizosfera

Os micro-organismos são os seres que primeiro colonizaram a Terra (QAZI, 2013). Devido ao grande “tempo de vida”, adquiriram inúmeras adaptações e, portanto, são capazes de serem encontrados nos mais variados ambientes: ar, solo, água, rochas, trato intestinal, plantas, entre outros.

Rizosfera é o nome dado ao micro-ambiente que compreende a faixa de solo que sofre influência das raízes das plantas presentes no local (HILTNER, 1904 ; PEREIRA, 2000). Essas modificações se dão por meio da liberação de compostos (açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, isoflavonóides, hormônios e enzimas de plantas) através das raízes durante o crescimento vegetal, ou seja, sua composição e estruturas são mutáveis a partir da interação com o ciclo vegetativo. A concentração desses compostos no solo fornece um ótimo hábitat para o desenvolvimento de micro-organismos (BAIS *et al.*, 2006; ANDREOTE, 2007).

A degradação de material biológico feita pelos micro-organismos é o que equilibra o ecossistema, fazendo com que seja liberado carbono na forma de CO₂, nitrogênio como amônia e nitrato, além de fósforo, enxofre e outros micronutrientes, que, em sua forma inorgânica, podem ser assimilados pelas plantas (STEVENSON e COLEN, 1999). Neste ínterim, a rizosfera é constituída de micro-organismos que interagem tanto com a planta quanto outros membros da microbiota, e são atuantes da ciclagem de nutrientes e produção de metabólitos secundários que podem auxiliar o crescimento vegetal (CARDOSO e FREITAS, 1992; SANTOS, 2010).

As interações desses organismos com as plantas são bastante estudadas. Chega-se a tratá-los como organismos únicos, ou “super-organismos”, onde a microbiota associada ao vegetal é responsável por funções específicas. Como método de comparação, é possível estabelecer uma conexão com uma interação bastante conhecida: a que envolve a microbiota intestinal de humanos. Pode-se somar à conta de interações atividades como: promoção de crescimento, defesa contra patógenos, absorção de nutrientes e resistência a fatores abióticos (MENDES *et al.*, 2011; BERENDSEN *et al.*, 2012).

3.2.2 Micro-organismos de ambientes extremos

Denominam-se “ambientes extremos” aqueles nos quais os fatores abióticos estão além do que é considerado limitante pelo ser humano. No entanto, tendo em vista os mais diversos ambientes existentes e os organismos que os habitam, tais “limitações” são normais e bem suportadas pelos organismos (MacELROY, 1974). Os micro-organismos são maioria nesse grupo que consegue (*radical* + tolerantes) ou necessita (*radical* + fílicos e/ou -ófilos) de condições geoquímicas extremas para sobreviver, que são prejudiciais às outras formas de vida: os extremófilos. São variados os tipos de pressões que classificam os organismos como extremófilos: pH (alcalifílicos e acidófilos), sal (halofílicos), temperatura (psicrófilos, termófilos e hipertermófilos), pressão (barófilos), rochas (endolíticos), ausência de oxigênio, baixa concentração de nutrientes (oligotróficos), baixa atividade de água (xerófilos), presença de metais pesados (metalotolerantes), radiação. Uma das primeiras constatações desse grupo de organismos se deu há mais de 100 anos, quando descobriu-se o crescimento microbiano em bacalhau conservado com sal (AMILS, 2012).

Uma característica interessante desses organismos é que, quanto mais especializados em viver em ambientes que sejam constantes, mais tendem a diminuir significativamente seu material genético, mantendo apenas os necessários pra sobreviver nesse ambiente (p ex.: *Methanococcus jannaschii* 1.66Mb – primeiro extremófilo sequenciado – , *Pseudomonas aeruginosa* 6.50Mb – encontrada em vários ambientes) (BULT *et al.*, 1996, WIEHLMANN *et al.*, 2007).

Mesmo sendo uma crescente a busca por micro-organismos extremófilos por sua utilização na indústria biotecnológica, poucos são os estudos para o ambiente semi-árido da Caatinga, ambiente propício para organismos termotolerantes, termófilos, xerotolerantes e xerófilos. Como visto, fatores como temperatura e atividade de água são bastante limitantes no crescimento microbiano e podem influenciar na atividade metabólica e na seleção de micro-organismos interessantes do ponto de vista biotecnológico. Como necessidade para o crescimento microbiano nesse ambiente, a funcionalidade das suas enzimas em altas temperaturas é um pré-requisito, além de sua sobrevivência, ou seja, resistência, à baixa quantidade de água.

Dois bons exemplos de bioprodutos já utilizados que foram conseguidos a partir de micro-organismos extremófilos são a *Taq* polimerase, usada atualmente para a PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) e derivada do *Thermus aquaticus* e o exopolissacarídeo (EPS), que é um polissacarídeo extracelular, que, encontrado no ambiente natural, pode estar associado à virulência, à interação planta-micro-organismos, à proteção celular contra a perda de água ou ao ataque por bacteriófagos e protozoários, e que pode ser utilizado como substrato para novos produtos numa derivatização química (KANG e COTTREL, 1979; SUTHERLAND, 1998).

3.2.3 Ferramentas moleculares

Boa parte do conhecimento acerca da participação dos micro-organismos no ambiente é oriundo de pesquisas destes em culturas axênicas. No entanto, nem sempre é possível cultivar os micro-organismos através de inoculação em placas de Petri. A dificuldade em cultivar micro-organismos em laboratório em alguns momentos é devida à necessidade de alguns desses micro-organismos estarem associados a outros – dependendo deles ou de seus produtos –, ou até mesmo ao fato de precisarem de algum composto específico, tornando inviável estabelecer as condições favoráveis *in vitro* (ANDREOTE, 2007).

Por outro lado, as técnicas moleculares vieram para superar essa dificuldade, pois são independentes de cultivo, sendo possível extrair DNA diretamente de uma amostra de solo, obtendo-se assim amostras que contêm DNA destes micro-organismos não cultiváveis, já que, segundo GELSOMINO *et al.* (1999) apenas 1% deles é cultivável.

Vários podem ser os métodos utilizados para avaliar a comunidade microbiana de forma independente de cultivo: utilizando-se DNA e RNA, além de proteínas e ácidos graxos. Muitas dessas técnicas são utilizadas de forma complementar a outras. Na Figura 2, é possível observar como esses métodos se complementam e como foram evoluindo para os novos métodos (ELSAS e BOERSMA, 2011).

Figura 4 - Esquema de análises e ferramentas moleculares utilizadas na pesquisa de comunidade microbiana ambiental (retirada e adaptada de ELSAS & BOERSMA (2011))

Por seu leque de possíveis posteriores aplicações, a Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*, PCR), é comumente usada no início dos estudos, logo após a extração do DNA, sendo seguido por outra técnica.

O método baseado no polimorfismo do comprimento dos fragmentos terminais de restrição (T-RFLP, do inglês *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) vem sendo largamente utilizado na avaliação da comunidade microbiana (ANDREOTE, 2007). Esse vem sendo muitas vezes preferido frente ao DGGE (do inglês, *Denature Gradient Gel Eletrophoresis* – Eletroforese em gel com gradiente desnaturante) por sua praticidade e dinamismo. O T-RFLP é um método molecular qualitativo para análise de comunidades microbianas (LIU *et al.*, 1997). Os fragmentos são medidos com base no marcador selecionado e utilizado no momento da amplificação por PCR. A leitura, feita em um sequenciador, devolve um padrão, o comprimento dos fragmentos, tido como um tipo de impressão digital das comunidades. Este número de fragmentos com certo tamanho e a abundância

relativa da comunidade é medida pelo tamanho dos picos obtidos no eletroferograma (REIS JUNIOR *et al.*, 2002).

Os dois métodos, DGGE e T-RFLP, mostram perfis de comunidade; ou seja, com os resultados tanto do gel quanto do eletroferograma, é possível observar se as comunidades microbianas de duas (ou mais) amostras são similares ou não. No entanto, não é possível aferir quais os membros da comunidade avaliada. Para que se saibam quais são os componentes de determinada comunidade, é necessário sequenciar material genético de uma amostra.

A metagenômica e a metatranscriptômica são as mais recentes ferramentas de pesquisa. A primeira trabalha com a análise funcional baseada na sequência do genoma de determinada amostra a partir do acesso direto ao DNA ali presente; a segunda trabalha com o acesso ao mRNA (RNA mensageiro) (RIESELFELD *et al.*, 2004; MORAN, 2009). Muitos são os métodos de sequenciamento, e diversos são os sequenciadores, cada qual especializado em diferentes métodos. Pode-se trabalhar tanto com o sequenciamento do material genético total de determinada amostra, quanto com a seleção de determinado fragmento, a partir, também, de iniciadores específicos.

O método inicial sugerido por Frederick Sanger (1977) é o mais tradicional e bastante utilizado, principalmente até o final da década de 1990 (FORDE & O'TOOLE, 2013), no entanto, é custoso e trabalhoso. O pirosequenciamento é uma técnica desenvolvida na década de 2000, que permite sequenciar genomas de forma mais rápida e barata que o Sanger, baseado na geração de pirofosfato inorgânico. Uma limitação dessa técnica é a impossibilidade de se conseguir sequências maiores que 100-200 pares de base (RONAGHI, 2001; PETROSINO *et al.*, 2009). Sendo assim, novas ferramentas foram sendo desenvolvidas a fim de facilitar, baratear e agilizar a pesquisa: os chamados sequenciamentos de nova geração (NGS, do inglês *Next-Generation Sequencing*) (METZKER, 2010).

Apenas pequenas regiões do 16S rRNA, que variam de 50-200 bases, são necessárias para se identificar um micro-organismo. O sequenciamento em larga escala dessas porções, chamadas “regiões hipervariáveis” (V1-V9), é rápido e menos trabalhoso, além de fornecer o acesso à detecção de micro-organismos

raros, que eram perdidos com o método Sanger (FORDE & O'TOOLE, 2013). Esse método pode prover riqueza e abundância da comunidade microbiana, baseado nas unidades taxonômicas operacionais (UTO's ou OTU's, do inglês *operational taxonomic units*). Como um “código de barras”, cada região, ou *tag* diferente, corresponde a uma OTU, proporcionando avaliar a ocorrência relativa de um micro-organismo em uma amostra (SOGIN *et al.*, 2006).

O sequenciador da Ion Torrent (Life Technologies) (<http://www.iontorrent.com>) utiliza uma estratégia de sequenciamento semelhante ao 454 (Roche) (primeira plataforma de NGS), exceto que:

1. São detectados íons de hidrogênio (H⁺), em vez de uma cascata de pirofosfatase;
2. Os chips de sequenciamento são similares a chips padrões usados comercialmente.

Ou seja, ler os íons H⁺ significa não precisar de nenhum laser, câmeras ou corantes fluorescentes; e, padrões comuns de microchips significam baixo custo de produção. Os primeiros instrumentos de acesso foram implantados no final de 2010 (GLENN, 2011).

Tendo em mente o seu importante papel dentro de um ecossistema, o conhecimento da diversidade dos micro-organismos de determinado ambiente permite o acesso às funções microbianas e os benefícios conseguidos a partir delas. Tanto na área agrícola quanto na laboratorial, metabólitos e enzimas podem ser utilizados conforme nossa necessidade: na primeira, conhecer a microbiota local sugere um melhor manejo a fim de obter um melhor aproveitamento da produção aliado à sustentabilidade; na segunda, indústrias de pesquisa, alimentos, cosmética e farmacêutica podem se favorecer dos bioprodutos oriundos dos micro-organismos. Quanto mais rápido o conhecimento, maiores, melhores e mais velozes os avanços. Esses casos exemplificam a importância desse trabalho.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta

As amostras foram coletadas de cinco pontos diferentes distribuídos entre os estados da Bahia, Piauí, Ceará, Paraíba e Rio Grande do Norte nas duas estações: verão (outubro de 2010) e inverno (maio de 2011), que correspondem aos períodos de seca e chuva, respectivamente (Tabela 1). Em ambos os casos, o solo rizosférico foi raspado das raízes das leguminosas *Mimosa tenuiflora* e *Piptadenia stipulacea* e colocados em tubos tipo Falcon, etiquetados e estocados até análise. Todas as amostras foram coletadas em triplicatas, totalizando 60 amostras. Também foram amostrados e pesados 100g de solo de cada ponto, acomodados em sacos plásticos, estocados e, mais tarde, enviados para análise físicas e químicas.

Tabela 1 - Coordenadas geográficas das coletas realizadas na Bahia (BA – ponto 1), Piauí (PI – ponto 2), Ceará (CE – ponto 3), Paraíba (PB – ponto 4) e Rio Grande do Norte (RN – ponto5)

Pontos	Estado	Coordenadas		Altitude (m)
		S	W	
1	BA	09°13'24,8''	41°05'11,4''	475
2	PI	08°50'01,6''	42°33'13,3''	414
3	CE	06°27'37,1''	40°44'50,5''	450
4	PB	06°42'44,2''	38°15'08,2''	293
5	RN	06°39'15,6''	37°29'33,4''	259

4.2 Extração de DNA

Para a extração do DNA total das amostras, utilizou-se o PowerSoil®DNA Isolation Kit conforme especificações do fabricante. A confirmação do sucesso da extração se deu por eletroforese das amostras em gel de TBE-agarose 1% (p/v). Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídio em solução (1mg.mL^{-1}) e fotografado para visualização.

4.3 Amplificação dos genes marcadores e análise de fragmentos

4.3.1 Amplificação do genes *rrs* da comunidade bacteriana

Após a extração, as amostras foram aliquotadas e amplificadas através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) para obter-se a amplificação do gene que codifica o rRNA 16S (*rrs*). O DNA obtido das amostras de solo rizosférico foi amplificado com os oligonucleotídeo iniciadores para este gene 1492R (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT) e 27F (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) (Heuer, Krsek *et al.*, 1997). Visando o T-RFLP, a extremidade 5' do iniciador 27F foi marcada com 6-carboxifluoresceína (FAM).

A PCR feita para o gene 16S rRNA de bactéria compôs-se por 1.5µl do DNA ambiental, 0.4µM de cada um dos iniciadores, 1X PCR buffer, 5.0 mM de MgCl₂, 0.10mg/ml de BSA, 0.8 mM dos dNTPs e 0.05U/µl de Taq Polimerase (Fermentas, Life Sciences). As circunstâncias de amplificação foram: 4 minutos a 94⁰C, seguido de 35 ciclos iniciados por 30 segundos a 94⁰C, 1 minuto a 63⁰C e 72⁰C por mais um minuto, com uma extensão final de 10 minutos a 72⁰C. Os ciclos foram realizados em termociclador Veriti (Applied Biosystem). A confirmação da reação se deu por meio de corrida em gel de TBE-agarose (1%), corado com solução de brometo de etídio (1mg.mL⁻¹).

4.3.2 Amplificação do genes *rrs* da comunidade de arqueias

O DNA total obtido das amostras de solo foi amplificado com os oligonucleotídeo iniciadores para o gene 16S rRNA 915r (GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT) e 344F (ACG GGG YGC AGC AGG CGC GA) (Casamayor, Massana *et al.*, 2002) sendo o último marcado com 6-carboxifluoresceína (FAM).

A amplificação para o gene 16S rRNA de arqueia compôs-se por 1.5µl do DNA ambiental, 0.4µM de cada um dos iniciadores, 1X PCR buffer, 5.0 mM de MgCl₂, 0.10mg/ml de BSA, 0.8 mM dos dNTPs e 0.05U/µl de Taq Polimerase (Fermentas, Life Sciences). A amplificação se deu por temperaturas de 95⁰C por 5 minutos, com 35 ciclos encabeçados por 30 segundos a 95⁰C, anelamento a 53⁰C por 30

segundos seguido de 72°C por 1 minuto, com extensão de 10 minutos a 72°C. Os ciclos foram realizados em termociclador Veriti (Applied Biosystem). A confirmação da reação se deu por meio de corrida em gel de TBE-agarose (1%), corado com solução de brometo de etídio (1mg.mL⁻¹).

4.3.3 Amplificação do genes *amoA* da comunidade de arqueias oxidadores de amônio (AOA)

O DNA metagenômico obtido das amostras de solo foi amplificado com os oligonucleotídeo iniciadores para o gene *amoA* Arch *amoA*-2r (GCG GCC ATC CAT CTG TAT GT) e Arch *amoA*-1f (STA ATG GTC TGG CTT AGA CG) de arqueias oxidadores de amônia (da sigla em inglês, AOA) (FRANCIS E ROBERTS *et al.*, 2005).

Cada reação de PCR realizada para o gene *amoA* foi contida de 1.5µl do DNA ambiental, 0.3 µM de cada iniciador selecionado, 1X PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.10 mg/ml de BSA, 0.20mM de dNTPs, e 0.05 U/µl da Taq Polimerase (Fermentas, Life Sciences). As condições da PCR para AOA foram: 5 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, sendo sucedido por uma extensão de 10 minutos a 72°C. Os ciclos foram realizados em termociclador Veriti (Applied Biosystem). A confirmação da reação se deu por meio de corrida em gel de TBE-agarose (1%), corado com solução de brometo de etídio (1mg.mL⁻¹).

4.3.4 Restrição e Precipitação

Foi realizada digestão com a enzima *HhaI* (Fermentas, Life Sciences), segundo informações do fabricante: para cada reação foram utilizados 2 µL de tampão (Buffer Tango(10X)); 1 µL da endonuclease de restrição *HhaI* 10U (Fermentas); 10 µL do produto de PCR e água ultrapura (Milli-Q) autoclavada para o volume final de 21 µL. O ciclo de 1h30min, realizado em termociclador Veriti (Applied Biosystem) consistiu em 90 minutos a 37°C, seguido de 30 segundos a 60°C. As amostras foram precipitadas com Etanol/EDTA/Acetato de Sódio segundo método apresentado no

manual do *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*. O produto foi então ressuspensionado em 2µl de água ultrapura (MilliQ) autoclavada e estocadas a -20°C até seu uso.

4.3.5 Processamento e Análise de T-RFLP

As amostras foram preparadas para a leitura ainda sob instruções contidas no manual do kit *BigDye®*. 1µl do produto ressuspensionado foi adicionado à uma solução contendo 8,7µl de formamida HiDi e 0,3µl de padrão de comprimento GeneScan™ – 600LIZ™ Size Standard (Applied Biosystem) e, então, foram desnaturadas por 3min a 95°C e resfriadas por 3min a 0°C. O produto foi, então, analisado no *3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Life Technologies).

Os dados devolvidos pelo sequenciador foram avaliados no *GeneMapper® v4.1* (Applied Biosystem, Life Technologies) e verificou-se a qualidade da leitura. Os dados contendo os fragmentos lidos foram transformados em matriz no Excel (Microsoft). Foram incluídos na análise do perfil de bactéria fragmentos maiores que 50pb (pares de base) e menores que 800pb (Culman et. al, 2008). Para Arquéias, os valores foram entre 20pb e 800pb. Já para as AOA, as T-RFs (fragmentos de restrição) excluídas foram as menores de 50 unidades de fluorescência e menores que 2% do total da altura dos picos (Singh et. al, 2006; Yao et. al, 2011).

A altura dos picos (unidades de fluorescência) foi transformada em dados relativos, com os valores de intensidade dos picos sendo apresentados em forma percentual. O cálculo se deu pela razão da altura de cada pico pela soma de todos os picos de uma amostra (Culman et. al, 2008). O perfil T-RFLP foi comparado entre as amostras com base na abundância relativa das T-RFs, que foram consideradas, cada uma, uma Unidade Taxonômica Operacional (do inglês, OTU) diferente. Foram consideradas as T-RFs com fluorescência relativa maior que 1% (Lehours et al., 2005).

4.4 Sequenciamento em larga escala por Ion Torrent

Os sequenciamentos hoje deixaram de ser extremamente trabalhosos. Ainda que seja possível trabalhar com clonagem e que esta devolva resultados impossíveis de se conseguir apenas pelo conhecimento da sequência de DNA/RNA estudada, essa metodologia deixou de ser estritamente necessária. Muito utilizado, o sequenciamento em larga escala provê resultados mais rápidos e independentes do cultivo de clones. Com o preparo ideal, é possível aferir sobre riqueza e diversidade de comunidades microbianas.

Para a presente análise foi eliminada, aleatoriamente, uma repetição de amostra coletado. Deste modo, foram selecionadas 40 das 60 amostras utilizadas nas análises de TRFLP. As 40 amostras selecionadas correspondem aos cinco diferentes pontos das duas plantas escolhidas (*Mimosa tenuiflora* e *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke) em duplicatas e coletadas em dois períodos: seca e chuva.

O DNA metagenômico de cada amostra foi amplificado com os iniciadores 967F (CAA CGC GAA GAA CCT TAC C) e 1046R (CGA CAG CCA TGC ANC ACC T), que flanqueiam a região V6 do gene 16S rRNA (SOGIN *et al.*, 2006). Foi sintetizado um oligonucleotídeo 967F diferente para cada amostra, contendo diferentes *barcodes* acopladas a eles composta de 5 pares de base, afim de identificar a origem das diferentes sequências obtidas, ou seja, a qual dos pontos correspondem (Tabela 2). Além disso, também foi adicionado a esse iniciador o adaptador A (CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG ACT CAG) conforme descrição do manual do fabricante do sequenciador Ion Personal Genome Machine™ (PGM™) (Ion Torrent, Life Technologies). O oligonucleotídeo 1046R, por sua vez, recebeu o adaptador P1 (CCT CTC TAT GGG CAG TCG GTG AT).

Tabela 2 - Amostras selecionadas correspondentes às estações de seca (sc) e chuva (ch) das diferentes plantas *M. tenuiflora* (M) e *P. stipulacea* (S) e suas tags (barcode) respectivas

Tag	Barcode	Amostra	Tag	Barcode	Amostra
1	GATCT	M11ch	21	ACTGC	M11sc
2	ATCAG	M12ch	22	GTCAC	M12sc
3	ACACT	M21ch	23	CGTAC	M21sc
4	AGCTA	M22ch	24	TGCGT	M22sc
5	CACAC	M31ch	25	CGACG	M31sc
6	ACAGA	M32ch	26	CTACT	M32sc
7	AGATG	M41ch	27	TGACT	M41sc
8	CACTG	M42ch	28	GACAG	M42sc
9	CAGAG	M51ch	29	ATGCT	M51sc
10	CGCAG	M52ch	30	TCGTC	M52sc
11	CTGTG	S11ch	31	TATAC	S11sc
12	GTGAG	S12ch	32	ACGAC	S12sc
13	TCATG	S21ch	33	TGTAG	S21sc
14	AGCAT	S22ch	34	TCGAG	S22sc
15	CAGCT	S31ch	35	TAGTG	S31sc
16	CATGT	S32ch	36	CGAGT	S32sc
17	CTGAT	S41ch	37	ATACG	S41sc
18	CTGCA	S42ch	38	ACTCG	S42sc
19	GATGA	S51ch	39	TCTGT	S51sc
20	TACGC	S52ch	40	TCGCT	S52sc

Cada biblioteca foi gerada a partir de PCR composta de água ultrapura autoclavada (MilliQ), 1X PCR buffer, 5.0mM de $MgCl_2$, 0.2mM de dNTPs, 0.2 μ M de cada iniciador e 0.1U/ μ l da DreamTaq Polimerase (Fermentas, Life Sciences). O volume total (100 μ l) foi separado em 3 tubos onde em dois deles foi adicionado 1 μ l do DNA molde e o terceiro serviu como controle. As reações foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems) segundo as condições: desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, anelamento em 57°C por

45 segundos e 72⁰C por 1 minuto, com extensão final a 72⁰C por 10 minutos (SOGIN *et al.*, 2006). O sucesso da reação foi visualizado em gel de TAE em agarose 1,5% (p/v) corado com solução de brometo de etídio (1,0 mg.mL⁻¹) e fotografado. Os volumes dos dois tubos contendo DNA foram juntos e purificados para 50µl de cada biblioteca utilizando 90µl de Agencourt® AMPure® XP Reagent e estante magnética, de acordo com protocolo fornecido por *Life Technologies - Ion Amplicon Library Preparation (Purify the amplicon libraries)* (www.iontorrent.com). Quantificou-se, então, por meio do NanoDrop (Thermo Scientific) a partir da quantificação se misturou as amostras de modo a obter uma mistura equimolar (15 µM) de todas as bibliotecas, de onde 18 µL foram utilizados para a PCR de emulsão, onde os fragmentos nas bibliotecas de amplicons foram ligados a esferas, de acordo com protocolo do fabricante (*Life Technologies - Ion PGM™ Xpress™ Template Kit*) (www.iontorrent.com). Após recuperadas as esferas, fez-se enriquecimento e em seguida foi feito o preparo e carregamento das esferas no chip 316 e posterior sequenciamento (*Ion Sequencing Kit User Guide v2.0*) no sequenciador Ion Personal Genome Machine™ (PGM™) (Ion Torrent, Life Technologies).

Para analisar os dados obtidos como produtos do sequenciador, inicialmente fez-se upload do arquivo fastq para o site Galaxy (<http://wiki.g2.bx.psu.edu>) onde usou-se a ferramenta Groomer (BLANKENBERG *et al.*, 2010) para converter o arquivo obtido em Sanger fastq (.fastq) pelos programas do site. Em seguida, esse arquivo foi filtrado pela ferramenta *Filter by Quality* para selecionar sequencias contendo >95% das bases com >Q20. Novamente usou-se o conversor para transformar o arquivo em Fasta e fez-se o download do arquivo. Para análise das sequencias utilizou-se o software MOTHUR (SCHLOSS *et al.*, 2009) seguindo o procedimento operacional padrão (*standard operational procedure SOP* - http://www.mothur.org/wiki/454_SOP), com ajustes do tutorial do Sogin (http://www.mothur.org/wiki/Sogin_data_analysis) para que se enquadrasse à sequência curta da região V6. Sempre considerando a robustez da análise e a qualidade dos resultados, alguns comandos foram modificados para se ajustar ao tamanho do fragmento obtido ou a região do gene analisado. Os comandos executam funções específicas em acordo com os parâmetros estipulados pelo

usuário e tais parâmetros são alterados conforme as necessidades das análises. Os próximos passos foram os utilizados para o trabalho:

1. trim.seqs: este comando corta as sequencias que não correspondem aos parâmetros estabelecidos (maxambig=0, maxhomop=6, bdiffs=1, pdiffs=2, minlength=56, keepfirst=60), além de eliminar parte delas que correspondam a resquícios de primer ou barcodes.
2. unique.seqs: seleciona sequencias únicas e cria um arquivo com as sequencias eliminadas.
3. sub.sample: cria um arquivo menor com o número de sequencias estipulado pelo usuário. Esse comando foi utilizado no início, para se avaliar o alinhamento (passo seguinte) e então fazer escolhas de valores para os próximos parâmetros de forma adequada aos dados e aos próximos passos.
4. align.seqs: alinha as sequências baseado no banco de dados GreenGene (SOGIN, 2006), por “Needleman”.
5. screen.seqs: elimina as sequencias que não obedeceram aos critérios estabelecidos (settings, start=4655, optimize=end, criteria=95), tendo em mente que se busca a região V6.
6. filter.seqs: elimina as colunas do alinhamento. Foi definido que colunas sem informações, preenchidas com ‘.’ ou ‘-’ seriam eliminadas (considerando-se colunas inteiras, ou seja, que correspondiam a todas as sequencias). Além disso, determinou-se que colunas onde qualquer sequencia tivesse uma posição sem dados (com ‘.’) seria eliminada. Após isso, usou-se novamente o comando “unique.seqs”, já descrito.
7. pre.cluster: remove sequencias que são provavelmente erros de sequenciamento.
8. chimera.uchime: devolve sequencias potencialmente quiméricas.

9. `remove.seqs`: remove as sequencias de um arquivo baseado nas sequencias de um outro arquivo relacionado. Usado para eliminar as sequencias devolvidas pelo comando “`chimera.uchime`”.
10. `classify.seqs`: classifica as sequencias de acordo com o banco de dados fornecido. Usou-se o `cutoff=60`.
11. `dist.seqs`: constrói uma matriz de distância entre as sequências. Os parâmetros foram o padrão do Mothur.
12. `cluster`: uma vez com a matriz lida pelo programa, o comando `cluster` é usado para atribuir sequências a OTUs. Nesse caso o método `Fusthest Neighbor` é o padrão utilizado, onde todas as sequências de uma OTU são, no máximo, X% distante de todas as outras sequências dentro da OTU.
13. `make.shared`: esse comando lê uma lista ou um arquivo de grupos e devolve um outro arquivo representando o número de vezes que uma OTU é observada em várias amostras. É análogo à um arquivo `.rabund`, que é útil para se criar um gráfico de abundância.
14. `count.groups`: conta o número de indivíduos dentro de um grupo ou de um *set de grupos*.
15. `sub.sample`: comando já descrito, foi usado num segundo momento pra selecionar grupos que não tivessem o número mínimo de sequências requeridas.

As OTUs foram agrupadas com uma dissimilaridade <4%. Deste ponto em diante, os comandos utilizados foram os necessários para as análises estatísticas descritas mais à frente.

Após o trabalho no MOTHUR, os dados foram agrupados tendo como objetivo responder as perguntas propostas. Para tanto, classificou-se as amostras, a partir de seu rótulo (M11ch, S21sc, etc.) em uma única tabela), onde constava o local de coleta (Bahia, Piauí, Ceará, Paraíba, Rio Grande do Norte), a época (ch = Chuva; sc

= Seca) e a espécie de planta da qual ela foi coletada (M = *M. tenuiflora* ; S = *P. stipulacea*) (Tabela 3).

Tabela 3 - Amostras classificadas segundo local de coleta, período (ch=chuva, sc=seca) e espécie da planta da qual foi coletada

Amostra	Local	Período	Espécie Planta	Amostra	Local	Período	Espécie Planta
M11ch	Bahia	Chuva	<i>M. tenuiflora</i>	M11sc	Bahia	Seca	<i>M. tenuiflora</i>
M12ch	Bahia	Chuva	<i>M. tenuiflora</i>	M12sc	Bahia	Seca	<i>M. tenuiflora</i>
M21ch	Piauí	Chuva	<i>M. tenuiflora</i>	M21sc	Piauí	Seca	<i>M. tenuiflora</i>
M22ch	Piauí	Chuva	<i>M. tenuiflora</i>	M22sc	Piauí	Seca	<i>M. tenuiflora</i>
M31ch	Ceará	Chuva	<i>M. tenuiflora</i>	M31sc	Ceará	Seca	<i>M. tenuiflora</i>
M32ch	Ceará	Chuva	<i>M. tenuiflora</i>	M32sc	Ceará	Seca	<i>M. tenuiflora</i>
M41ch	Paraíba	Chuva	<i>M. tenuiflora</i>	M41sc	Paraíba	Seca	<i>M. tenuiflora</i>
M42ch	Paraíba	Chuva	<i>M. tenuiflora</i>	M42sc	Paraíba	Seca	<i>M. tenuiflora</i>
M51ch	Rio Grande do Norte	Chuva	<i>M. tenuiflora</i>	M51sc	Rio Grande do Norte	Seca	<i>M. tenuiflora</i>
M52ch	Rio Grande do Norte	Chuva	<i>M. tenuiflora</i>	M52sc	Rio Grande do Norte	Seca	<i>M. tenuiflora</i>
S11ch	Bahia	Chuva	<i>P. stipulacea</i>	S11sc	Bahia	Seca	<i>P. stipulacea</i>
S12ch	Bahia	Chuva	<i>P. stipulacea</i>	S12sc	Bahia	Seca	<i>P. stipulacea</i>
S21ch	Piauí	Chuva	<i>P. stipulacea</i>	S21sc	Piauí	Seca	<i>P. stipulacea</i>
S22ch	Piauí	Chuva	<i>P. stipulacea</i>	S22sc	Piauí	Seca	<i>P. stipulacea</i>
S31ch	Ceará	Chuva	<i>P. stipulacea</i>	S31sc	Ceará	Seca	<i>P. stipulacea</i>
S32ch	Ceará	Chuva	<i>P. stipulacea</i>	S32sc	Ceará	Seca	<i>P. stipulacea</i>
S41ch	Paraíba	Chuva	<i>P. stipulacea</i>	S41sc	Paraíba	Seca	<i>P. stipulacea</i>
S42ch	Paraíba	Chuva	<i>P. stipulacea</i>	S42sc	Paraíba	Seca	<i>P. stipulacea</i>
S51ch	Rio Grande do Norte	Chuva	<i>P. stipulacea</i>	S51sc	Rio Grande do Norte	Seca	<i>P. stipulacea</i>
S52ch	Rio Grande do Norte	Chuva	<i>P. stipulacea</i>	S52sc	Rio Grande do Norte	Seca	<i>P. stipulacea</i>

Essa tabela foi utilizada no programa STAMP, que realiza análises estatísticas.

4.5 Análise estatísticas e índices ecológicos

4.5.1 Teste de Mantel

O teste de Mantel tem por objetivo a comparação de duas matrizes em que possam constar dados como distancia genética e espacial de amostras diferentes. Assim é possível analisar os efeitos da distancia geográfica sobre a distância genética.

As perguntas a serem respondidas podem ser: “Amostras submetidas a um mesmo padrão ambiental, mas de localidades diferentes, têm também uma mesma variedade de comunidades?” ; ou: “Amostras próximas são similares?” ou, da mesma forma “Amostras distantes são necessariamente diferentes em composição?” (Urban, 2003).

4.5.2 ANOSIM

O teste ANOSIM (Análise de Similaridade) produz uma estatística R que varia em uma amplitude de -1 a +1. Valores R iguais a +1 são obtidos apenas quando todas as réplicas dentro dos grupos são mais similares entre si do que qualquer réplica de grupos diferentes. No caso das amostras de um grupo serem totalmente diferentes das amostras de outro grupo, o valor da distancia “entre grupos” será maior, portanto igual a 1. Caso não haja muita diferença entre os grupos, a distancia “entre grupos” e “dentro de grupos” será similar, portanto mais próximas a 0. Existem casos onde se obtém resultado pra R negativo (-1), mas esses casos são mais complexos (MELO e HEPP, 2008); os valores de p indicam a real importância do valor encontrado em R .

4.5.3 PCA (Análise de componentes principais)

A análise de componentes principais é apresentada por PEARSON (1901) e HOTELLING (1933) e tem por função a análise de dados visando sua sumarização e escolha da melhor forma representativa dos dados, a partir de combinações lineares das variáveis originais, num novo sistema de coordenadas (normalmente com dois

ou três eixos ou dimensões). O gráfico pode ser montado sobre uma matriz de covariância, onde os dados são apresentados baseados numa mesma medida (por exemplo, abundância de espécies diferentes), ou sobre uma matriz de correlação, onde os dados têm unidades diferentes ou escalas diferentes (por exemplo, parâmetros ambientais). No último caso, as variáveis são inicialmente padronizadas, para que as escalas não interfiram e assim, a ordenação seja influenciada na mesma medida pelos componentes, independentemente da variação de origem. A divisão horizontal mostra as principais diferenças entre as amostras (eixo x), fatores secundários são separados pelo eixo y.

4.5.4 CCA (Análise de correspondência canônica)

A análise CCA gera um gráfico onde as amostras são distribuídas sobre seus eixos onde a divisão horizontal (eixo x) demonstra as diferenças principais que separam as amostras, outros fatores são separados verticalmente (eixo y). Dessa forma, é possível observar que, quanto mais distantes do centro do gráfico estiverem posicionadas as amostras, mais fortes são os vetores e maiores são as diferenças entre as amostras dispostas ou maior é a influência desse fator sobre a comunidade microbiana. Vetores que seguem na mesma direção indicam amostras que sofrem variações semelhantes quando submetidas às mesmas variáveis ou fatores. Além disso, as amostras posicionadas onde os vetores apontam são as amostras mais influenciadas pelos fatores indicados (ANDREOTE *et. al*, 2009).

4.5.5 NMDS (*Non-metric Multidimensional Scaling*)

O algoritmo do escalonamento classifica a distância entre dois objetos, e usa essa classificação pra mapear os objetos num espaço de ordenação bidimensional não-linear, pra preservar as diferenças dos objetos mas não a distância original medida (SHEPPARD, 1966). Nesse teste, a proximidade dos objetos corresponde à sua similaridade, mas a distância na ordenação não reflete a distância original entre os objetos comparados.

4.5.6 Correlação de Spearman e network

Desenvolvida por Charles Spearman em 1904, é uma medida de correlação não-paramétrica, isto é, ele mede a intensidade da relação entre duas variáveis, sem fazer nenhuma suposição sobre a distribuição de frequências das variáveis. Ou seja, considera a ordem dos dados e não o seu valor intrínseco. Por não ser necessário pressupor uma relação linear, é preferido à correlação de Pearson. O ρ (rho) é medido e expresso em valores de -1 a 1, sendo -1 uma correlação negativa, ou inversa, onde o crescimento de uma variável indica o decréscimo de outra; e 1 uma correlação positiva, ou direta, onde as duas variáveis crescem e decrescem concomitantemente.

O programa Gephi, utiliza os valores ρ gerados (nesse caso, os dados foram analisados no software R) para desenhar um gráfico de redes ou *network*.

5 RESULTADOS

Todos os pontos amostrados eram cobertos pela Floresta Caatinga, que durante o período de seca é, em sua maioria, coberto por folhas caídas de plantas decíduas. Todas as amostras de solo foram consideradas ácidas, sendo que o ponto 2 apresentou o menor pH (Tabela 4).

Tabela 4 - Características físicas e químicas de cada ponto

Estação Seca						
Pontos	1	2	3	4	5	
M.O.	23.00 ± 0.00 ^{ef}	22.00 ± 0.00 ^f	20.50 ± 0.70 ^g	33.50 ± 0.70 ^b	25.50 ± 0.70 ^c	
pH	5.60 ± 0.00 ^c	4.20 ± 0.00 ^f	5.10 ± 0.14 ^e	5.30 ± 0.00 ^d	6.30 ± 0.00 ^a	
P	6.00 ± 0.00 ^c	9.00 ± 0.00 ^c	4.50 ± 0.70 ^c	6.50 ± 0.70 ^c	31.50 ± 2.12 ^b	
K	2.30 ± 0.14 ^b	1.50 ± 0.00 ^d	1.35 ± 0.07 ^f	8.25 ± 0.07 ^g	4.65 ± 0.07 ^e	
Ca	23.00 ± 1.41 ^d	8.50 ± 0.70 ^e	25.00 ± 0.00 ^d	23.50 ± 0.70 ^d	46.50 ± 0.70 ^a	
Mg	5.00 ± 0.00 ^e	1.50 ± 0.70 ^f	16.50 ± 0.70 ^b	8.00 ± 0.00 ^d	13.00 ± 0.00 ^c	
H+Al	19.00 ± 1.41 ^{de}	36.00 ± 2.82 ^a	28.00 ± 4.24 ^b	28.00 ± 0.00 ^b	15.0 ± 0.00 ^e	
S.B.	30.10 ± 0.84 ^c	11.45 ± 0.49 ^d	42.90 ± 0.56 ^b	39.65 ± 0.35 ^b	63.90 ± 0.56 ^a	
CTC	49.35 ± 2.33 ^d	47.65 ± 2.19 ^{de}	70.80 ± 4.66 ^{bc}	67.40 ± 0.42 ^c	78.65 ± 0.63 ^b	
V%	61.00 ± 1.41 ^d	24.50 ± 2.12 ^f	60.50 ± 3.53 ^d	59.00 ± 0.00 ^{de}	81.00 ± 0.00 ^a	
B	0.35 ± 0.01 ^a	0.34 ± 0.01 ^{ab}	0.13 ± 0.04 ^f	0.26 ± 0.00 ^c	0.21 ± 0.01 ^d	
Cu	0.50 ± 0.00 ^{cd}	0.30 ± 0.00 ^{ef}	1.15 ± 0.07 ^a	0.40 ± 0.00 ^{de}	0.40 ± 0.00 ^{de}	
Fe	16.50 ± 0.70 ^f	84.00 ± 14.14 ^b	24.50 ± 2.12 ^{ef}	44.00 ± 7.07 ^{de}	23.00 ± 0.00 ^f	
Mn	65.55 ± 3.04 ^a	12.40 ± 0.00 ^{fg}	24.20 ± 1.55 ^{de}	52.45 ± 0.49 ^b	32.40 ± 0.00 ^{cd}	
Zn	1.05 ± 0.07 ^{de}	0.75 ± 0.07 ^e	0.65 ± 0.63 ^e	1.20 ± 0.00 ^{de}	1.05 ± 0.07 ^{de}	

Estação Chuva						
Pontos	1	2	3	4	5	
M.O.	24.50 ± 0.70 ^{cd}	20.50 ± 0.70 ^g	24.00 ± 0.00 ^{de}	24.50 ± 0.70 ^{cd}	37.00 ± 0.00 ^a	
pH	5.80 ± 0.00 ^b	4.15 ± 0.07 ^f	6.25 ± 0.07 ^a	5.25 ± 0.07 ^d	5.65 ± 0.07 ^c	
P	5.00 ± 0.00 ^c	15.00 ± 1.41 ^c	3.00 ± 0.00 ^c	3.50 ± 0.70 ^c	49.50 ± 24.74 ^a	
K	2.55 ± 0.07 ^c	0.70 ± 0.00 ^a	1.35 ± 0.07 ^f	3.60 ± 0.28 ^f	6.40 ± 0.56 ^e	
Ca	31.50 ± 0.70 ^c	4.50 ± 0.70 ^e	39.50 ± 0.70 ^b	19.50 ± 3.53 ^d	50.50 ± 7.77 ^a	
Mg	6.00 ± 0.00 ^e	1.00 ± 0.00 ^f	24.00 ± 0.00 ^a	6.00 ± 1.41 ^e	12.00 ± 1.41 ^c	
H+Al	17.00 ± 1.41 ^e	32.5 ± 2.12 ^a	15.00 ± 0.00 ^e	22.00 ± 0.00 ^{cd}	23.50 ± 2.12 ^c	
S.B.	39.45 ± 0.49 ^b	6.50 ± 0.14 ^d	64.50 ± 0.84 ^a	29.30 ± 4.94 ^c	69.15 ± 10.25 ^a	
CTC	56.75 ± 0.77 ^d	39.05 ± 2.33 ^e	79.25 ± 0.77 ^b	51.80 ± 4.94 ^d	92.90 ± 12.02 ^a	
V%	69.50 ± 2.12 ^c	17.00 ± 1.41 ^g	81.50 ± 0.70 ^a	56.00 ± 4.24 ^e	74.00 ± 1.41 ^b	
B	0.31 ± 0.01 ^b	0.23 ± 0.00 ^{cd}	0.17 ± 0.01 ^e	0.16 ± 0.01 ^{ef}	0.23 ± 0.01 ^{cd}	
Cu	0.60 ± 0.00 ^c	0.25 ± 0.07 ^f	1.00 ± 0.00 ^b	0.20 ± 0.00 ^f	0.50 ± 0.14 ^{cd}	
Fe	12.00 ± 0.00 ^f	125.00 ± 26.87 ^a	77.00 ± 1.41 ^b	67.00 ± 1.41 ^{bc}	50.00 ± 5.65 ^{cd}	
Mn	21.00 ± 0.70 ^{ef}	3.20 ± 0.14 ^g	60.75 ± 13.78 ^{ab}	18.55 ± 1.62 ^{ef}	41.45 ± 8.41 ^c	
Zn	0.70 ± 0.00 ^e	4.85 ± 1.62 ^{bc}	9.45 ± 4.03 ^a	3.75 ± 0.21 ^{cd}	7.25 ± 1.20 ^{ab}	

As amostras apresentaram valores significativamente diferentes (segundo o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey) para a maioria dos parâmetros medidos. A principal exceção foi o fósforo (P), que apresentou valores similares para a maioria

dos sítios, excluindo-se o ponto 5, que apresentou um valor até cinco vezes maior que o restante dos pontos. Análise de agrupamento, usando Paired-group e distância Euclidiana (Anexo A), indicou que não há uma separação clara entre as amostras de seca e chuva, enquanto que as amostras dos dois períodos dos pontos 2 e 5 apresentaram alta similaridade dentro do mesmo ponto.

5.1 T-RFLP de 16S Bactéria

O perfil T-RFLP de bactéria foi usada para realizar testes estatísticos a fim de avaliar a tendência de dispersão dessa comunidade.

No período de seca foram encontradas 59 T-RFs, com uma variação de mais ou menos 9 T-RFs em cada um dos pontos. Já no período de chuvas, foram 58 T-RFs, variando em 11. Com base na média da fluorescência medida em cada ponto, construiu-se gráficos onde é possível observar a diferença entre os perfis de picos medidos (Figuras 5a – 5e).

Figura 5a - Médias da fluorescência medida para 16S bactéria para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 1 (1) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M1bacch: *M. tenuiflora*, ponto 1, bactéria, período chuvoso; S1bacsc: *P. stipulacea*, ponto 1, bactéria, período seco

Figura 5b - Médias da fluorescência medida para 16S bactéria para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 2 (2) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M2bacch: *M. tenuiflora*, ponto 2, bactéria, período chuvoso; S2bacsc: *P. stipulacea*, ponto 2, bactéria, período seco

Figura 5c - Médias da fluorescência medida para 16S bactéria para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 3 (3) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M3bacch: *M. tenuiflora*, ponto 3, bactéria, período chuvoso; S3bacsc: *P. stipulacea*, ponto 3, bactéria, período seco

Figura 5d - Médias da fluorescência medida para 16S bactéria para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 4 (4) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M4bacch: *M. tenuiflora*, ponto 4, bactéria, período chuvoso; S4bacsc: *P. stipulacea*, ponto 4, bactéria, período seco

Figura 5e - Médias da fluorescência medida para 16S bactéria para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 5 (5) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M5bacch: *M. tenuiflora*, ponto 5, bactéria, período chuvoso; S5bacsc: *P. stipulacea*, ponto 5, bactéria, período seco

A Análise de Correspondência Canônica (CCA) indicou que a comunidade bacteriana encontrada no período seco apresentou uma separação clara da encontrada no período chuvoso. Além disso, amostras do período seco apresentaram um agrupamento mais estreito quando comparados às da chuva, indicando que as amostras da seca são mais similares entre si. Ao visualizar o gráfico de CCA, não é possível observar nenhum padrão de separação entre pontos e espécies de plantas. Análise de *forward selection* com permutação de Monte Carlo mostra que o primeiro e todos os eixos são significantes ($p=0.002$). Também indica que Zinco (Zn), Fósforo (P), Cálcio (Ca) e manganês (Mn) foram as únicas condições com efeito significativo ($p<0.01$) na distribuição das comunidades bacterianas (Anexo B).

O ANOSIM (Anexo E) indicou que as estações do ano diferenciam significativamente as amostras. Além disso, diferença espacial foi significativa, mesmo com R baixo ($R=0.120$). Comparação par-a-par indicou que os pontos 1 (P1) e 2 (P2) são significativamente diferentes ($p<0.05$) das outras amostras, com exceção na comparação P1 e P3, onde $p=0.10$; enquanto que as amostras P3, P4 e P5 não apresentaram diferença significativa uma da outra. Não foi encontrada diferenciação entre as comunidades bacterianas das rizosferas das espécies de plantas.

A análise de correspondência canônica (CCA) mostra que o eixo 1 explica 49% da separação e o eixo 2, 19,1%. Uma separação entre as amostras de chuva e seca é observada, sendo que ferro (Fe) e zinco (Zn) são os fatores que mais influenciam nessa questão, mais ativos na estação chuvosa (Figura 6).

Figura 6 - Gráfico CCA do perfil T-RFLP de 16S de bactéria para os dois períodos de coleta

No Teste de Mantel, o valor de referência p , para 16S de Bactéria, é consideravelmente baixo, bem próximo a 0 ($p=0.0004$), o que indica alta significância do valor obtido pela análise dos dados das amostras ($R=0.325$), estreitando a relação entre as variáveis ambientais e a estrutura da comunidade microbiana.

5.2 T-RFLP de 16S Arquéia

Baseado na fluorescência média em cada ponto, construíram-se gráficos onde é possível observar as características dos perfis de picos medidos (Figuras 7a – 7e).

Figura 7a - Médias da fluorescência medida para 16S de arqueia para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 1 (1) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M5archch: *M. tenuiflora*, ponto 1, arqueia, período chuvoso; S5archsc: *P. stipulacea*, ponto 1, arqueia, período seco

Figura 7b - Médias da fluorescência medida para 16S de arqueia para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 2 (2) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M5archch: *M. tenuiflora*, ponto 2, arqueia, período chuvoso; S5archsc: *P. stipulacea*, ponto 2, arqueia, período seco

Figura 7c - Médias da fluorescência medida para 16S de arqueia para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 3 (3) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M5archch: *M. tenuiflora*, ponto 3, arqueia, período chuvoso; S5archsc: *P. stipulacea*, ponto 3, arqueia, período seco

Figura 7d - Médias da fluorescência medida para 16S de arqueia para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 4 (4) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M5archch: *M. tenuiflora*, ponto 4, arqueia, período chuvoso; S5archsc: *P. stipulacea*, ponto 4, arqueia, período seco

Figura 7e - Médias da fluorescência medida para 16S de arqueia para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 5 (5) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M5archch: *M. tenuiflora*, ponto 5, arqueia, período chuvoso; S5archsc: *P. stipulacea*, ponto 5, arqueia, período seco

Foram encontradas em média 33 e 89 T-RFs por amostra, sendo de 32 a 88 T-RFs na estação de chuva e de 35 a 90 na estação seca. O gráfico CCA indicou um padrão diferente do observado para bactérias. A separação por estações não é aparente, enquanto que P1 e P2 parecem separados de P4 e P5. Permutação de Monte Carlo mostrou o primeiro eixo não apresenta separação significativa ($p>0.05$), no entanto, considerados juntos, todos os eixos são significantes ($p=0.022$). A *forward selection* com permutação de Monte Carlo indicou que potássio (K) e boro (B) são os únicos fatores que tem efeito sobre a comunidade ($p<0.05$) (Anexo C). Para os testes ANOSIM (Anexo E), valores para a variação entre espécies ($R=0.028$, $p=0.093$), variação sazonal ($R=0.092$, $p=0.005$) e variação entre pontos ($R=0.031$, $p=0.119$).

Figura 8 - Gráfico CCA do perfil T-RFLP de arqueias para os dois períodos de coleta

A CCA (Figura 8), mostra que o eixo 1 explica 15% da separação, enquanto o eixo 2 explica 11,8%. É possível observar que não apresenta separação clara entre os períodos de seca e chuva, nem mesmo agrupamento significativo entre as amostras.

Os principais atributos que influenciam as amostras são boro (B), ferro (Fe), Zinco (Zn) e a acidez total (H+Al).

Já o teste de Mantel indicou que a composição da comunidade está correlacionada com os atributos do solo ($R=0.690$, $p<0.001$).

5.3 T-RFLP de *amoA* AOA

O perfil T-RFLP da comunidade de arqueias oxidadoras de amônia, mostrou em média de 17 a 34 T-RFs. Foram 27 T-RFs, variando até 6 T-RFs, para o período de chuva. Já na seca, observou-se até 42 T-RFs, variando até 22. Baseado na fluorescência média medida em cada ponto construiu-se gráficos onde é possível observar as características dos perfis de picos medidos (Figuras 9a-9e).

O perfil da comunidade de AOA observado pelo CCA apresenta certa separação por estação. Permutação de Monte Carlo mostrou que o primeiro e todos os eixos são significantes ($p<0.01$). Com *forward selection*, zinco (Zn), matéria orgânica (M.O.) e potássio (K) são as variáveis com efeito sobre a comunidade ($p<0.05$). Pelo gráfico (Figura 8), observa-se que zinco (Zn), ferro (Fe) e pH do solo foram os fatores que mais influenciaram na composição da comunidade de AOA (Anexo D).

No caso da análise de similaridade de *amoA* AOA, a variação sazonal ($R=0.272$ e $p=0.001$) foi a única correlação com significância, dado que para as outras comparações feitas – variação espacial ($R=0.14$, $p=0.273$), variação entre espécies de plantas ($R=0.004$, $p=0.34$) o $p>0.05$. O mesmo se aplica ao Teste de Mantel ($R=0.09$, $p=0.34$).

Figura 9a - Médias da fluorescência medida para *amoA* AOA para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 1 (1) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M1AOAch: *M. tenuiflora*, ponto 1, AOA, período chuvoso; S2AOAsc: *P. stipulacea*, ponto 1, AOA, período seco

T-RFs

Figura 9b - Médias da fluorescência medida para *amoA* AOA para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 2 (2) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M2AOAch: *M. tenuiflora*, ponto 2, AOA, período chuvoso; S2AOAsc: *P. stipulacea*, ponto 2, AOA, período seco

Figura 9c - Médias da fluorescência medida para *amoA* AOA para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 3 (3) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M3AOAch: *M. tenuiflora*, ponto 3, AOA, período chuvoso; S3AOAsc: *P. stipulacea*, ponto 3, AOA, período seco

Figura 9d - Médias da fluorescência medida para *amoA* AOA para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 4 (4) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M4AOAch: *M. tenuiflora*, ponto 4, AOA, período chuvoso; S4AOAsc: *P. stipulacea*, ponto 4, AOA, período seco

Figura 9e - Médias da fluorescência medida para *amoA* AOA para as duas plantas *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* (M e S, respectivamente) no ponto 5 (5) para os períodos de chuva e seca (ch e sc). P. ex.: M5AOAch: *M. tenuiflora*, ponto 5, AOA, período chuvoso; S5AOAsc: *P. stipulacea*, ponto 5, AOA, período seco

O gráfico (Figura 10) representa a CCA feita para o perfil T-RFLP das arqueias oxidadoras de amônio presentes nas amostras para os dois períodos de coleta.

Figura 10 - Gráfico CCA do perfil T-RFLP de *amoA* AOA (arqueias oxidadores de amônia)

5.4 Sequenciamento do gene *rrs* bacteriano por Ion Torrent

O sequenciamento do gene que codifica o rRNA 16S bacteriano por Ion Torrent, obteve um total de 1.420.394 sequências. Após o upload, conversão e avaliação da qualidade das sequências, recuperou-se 236.741 sequências que correspondiam ao valor do corte de qualidade (Q20) demonstrado pelo programa, com 95% de bases na sequência que tem uma qualidade igual ou maior do que a estipulada pelo valor de corte e tamanho 57 ± 3 pb. Esse valor foi escolhido devido às informações obtidas pelo gráfico produto da filtragem inicial (dado não apresentado). Após baixar o arquivo gerado pelo programa disponível no Galaxy posteriormente à sua conversão (.fastq para .fasta) iniciou-se as análises no software MOTHUR (SCHLOSS *et al.*, 2009).

Em seguida à limpeza das sequências e sua classificação, com base no GreenGenes (SOGIN, 2006), os dados de saída do Mothur foram trabalhados com diferentes métodos.

5.4.1 Abordagem baseada nas OTUs

Análises de alfa e beta diversidade são cabíveis quando se trabalha com OTUs. A primeira trabalha com a diversidade local (por amostra), e se aplica principalmente à riqueza. A segunda baseia-se na diversidade entre habitats (entre amostras) e tem por característica indicar similaridades ou dissimilaridades entre membros e estrutura das comunidades das amostras estudadas (WHITTAKER, 1972).

Uma ferramenta de análise de beta diversidade é o heatmap. Esse gráfico (ANEXO J) mostra a dissimilaridade entre as amostras segundo os índices de Jaccard (jclass) e Yue e Clayton (thetaYC). O índice de Jaccard compara a partir dos membros da comunidade, já o thetaYC compara com base na abundância relativa.

Outra abordagem para avaliação da comunidade bacteriana baseada nas OTUs foi o NMDS. Como descrito anteriormente, esse método permite observar a distância entre as amostras, sendo que quanto mais próximas, mais similares são. No entanto, a distância plotada não se refere à distância real das amostras. Nesse caso, foram montados dois gráficos, um a partir do número absoluto dos membros da comunidade (Jaccard), e o segundo a partir da abundância relativa (thetaYC)(Figura 11).

Figura 11 - NMDS das comunidades de *Bacteria* baseado nas OTUs determinadas por sequenciamento da região V6 do 16S rRNA. A – Comparação entre as amostras por Jaccard. B – Comparação entre as amostras por thetaYC

No geral, observa-se um leve agrupamento das amostras dos períodos de seca e chuva, sem separação entre as espécies de planta. As amostras do período chuvoso da *M. tenuiflora* se mostram mais dispersas em relação às outras e não agrupadas quanto à estação.

Para dar um valor numérico o que foi observado até agora, optou-se pelo teste AMOVA. Este indicou diferença significativa entre os pontos de coleta (P1 a P5) amostrados para ambos os índices, com $p=0,001$. Uma análise par-a-par indicou que todos, excluindo as comparações P3-P4, P3-P5 e P4-P5, foram significativamente diferentes ($p<0,05$).

Quando comparadas as amostras agrupadas, obteve-se $p=0,001$, indicando a diferença significativa. Numa análise par-a-par, o resultado $p=0,001$ foi apresentado para a maior parte das amostras confrontadas, com exceção de M1ch-S1ch, M1sc-S1ch, M2sc-M4sc, M2ch-S2ch, M3ch-M5ch, M3ch-S3ch, M3ch-S5sc, M3sc-S3sc, M4sc-S2ch, M4sc-S2sc, M4sc-S5ch, Msch-S3ch, M5ch-S5sc, M5sc-S3sc, S2ch-S1sc, S2sc-S3ch, S2sc-S3sc, S2sc-S5ch, S3sc-S3ch, S3ch-S5ch, S3sc-S5ch, S3sc-S5sc.

Entre as estações do ano, observou-se um $p=0,003$, para os dois índices. Já entre as espécies de plantas amostradas, não houve diferenciação significativa ($p>0,05$).

5.4.2 Abordagem taxonômica

A partir da classificação a nível taxonômico das sequencias encontradas em cada amostra, pode-se caracterizar a composição da comunidade. Inicialmente, com o auxílio do software STAMP, foi feita uma PCA, onde, com a Tabela 3, foi possível observar que: 1) As amostras não apresentaram separação biogeográfica significativa; apenas as amostras da Bahia se agruparam de forma mais estreita, sendo que as outras ficaram bem distribuídas (Figura 12); 2) As amostras não apresentam separação significativa quando à espécie de planta (Figura 13); 3) As amostras apresentam separação significativa em relação às estações do ano/período de coleta (Figura 14)

Figura 12 - PCA das amostras separadas por local de coleta: Bahia (azul escuro), Piauí (laranja), Ceará (Azul claro), Paraíba (Roxo) e Rio Grande do Norte (Verde)

Figura 13 - PCA das amostras separadas por espécie de planta de solo rizosférico coletado. *M. tenuiflora* (azul) e *P. stipulacea* (laranja)

Figura 14 - PCA das amostras separadas por estação do ano/período de coleta. Chuva (azul) e Seca (laranja)

Com isso em mente, testou-se quais dos táxons presentes nas amostras tinham uma alteração significativa em relação às estações do ano. Quinze foram as Classes com mudança significativas em sua população ($p < 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5: Tabela com as classes que tiveram alteração significativa em sua população ($p < 0,05$), seguidas de seus respectivos valores para p .

Classe	p
Actinobacteria	0,00000155
Deltaproteobacteria	0,000052
Gammaproteobacteria	0,000225
Betaproteobacteria	0,00032
Sphingobacteria	0,00139
Elusimicrobia	0,00201
Acidobacteria	0,00258
Opitutae	0,011
Gemmatimonadetes	0,022
Alphaproteobacteria	0,026
TM7-3	0,026
Sva0725	0,03
Clostridia	0,033
Flavobacteria	0,038
TM7-1	0,048

Destas, seis são do grupo das mais representativas, ou seja, com uma frequência maior de 1% (Figura 15) e oito são do grupo com menos representatividade ($0,01\% < \text{Classes} < 1\%$) (Figura 16). Outras 32 (trinta e duas) Classes identificadas a partir da classificação, não estão representadas graficamente por não apresentarem frequência $> 0,01\%$.

Em imagens não apresentadas aqui, também produzidas no STAMP, é possível notar qual é a mudança que ocorre em cada ponto, ou seja, além de ser significativa, consegue-se ver se a população aumentou ou diminuiu nos diferentes períodos. Sendo assim, observou-se aumento da comunidade bacteriana do período chuvoso para o período seco nas seguintes classes: Actinobacteria, Alphaproteobacteria e Sva0725; para as outras classes, houve diminuição dessa comunidade (em ordem alfabética): Acidobacteria, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Clostridia, Elusimicrobia, Flavobacteria, Gammaproteobacteria, Gemmatimonadetes, Opitutae, Sphingobacteria, TM7-1 e TM7-3.

Valores dos índices de diversidade de Shannon (H) e Simpson (1-D) (Anexo I), medidos para os dois períodos de coleta feitos com base na classificação taxonômica, mostram que, apesar da diminuição observada na comunidade geral, a

diversidade bacteriana não se alterou significativamente. Os índices indicam que não há dominância e que a diversidade avaliada é alta.

A partir da classificação realizada pelo Mothur, obteve-se inicialmente o número de sequências lidas em cada ponto. Com esses dados, é possível observar que as classes Actinobacteria, Betaproteobacteria, Alphaproteobacteria e Acidobacteria são as mais abundantes, no geral, chegando a representarem, sozinhas, cerca de metade da população aferida.

Figura 15: Gráfico em barras das Classes mais representativas (frequência < 1%), destacando (*) as significativamente diferentes ($p < 0,05$) nos dois períodos de coleta para os diferentes pontos amostrados: *M. tenuiflora*, período chuvoso (Mch), *M. tenuiflora*, período seco (Msc), *P. stipulacea*, período chuvoso (Sch) e *P. stipulacea*, período seco (Ssc).

Figura 16 - Gráfico em barras das Classes menos representativas ($0,01\% < \text{frequência} < 1\%$), destacando (*) as significativamente diferentes ($p < 0,05$) nos dois períodos de coleta para os diferentes pontos amostrados: M. tenuiflora, período chuvoso (Mch), M. tenuiflora, período seco (Msc), P. stipulacea, período chuvoso (Sch) e P. stipulacea, período seco (Ssc)

Uma maneira de se entender como a comunidade interage é utilizando índices de correlação. A correlação de Spearman permite ver como as diferentes classes bacterianas se relacionam: positiva ou negativamente. Foram analisadas as conexões existentes nos períodos seco e chuvoso. No primeiro caso (ANEXO F), observaram-se apenas correlações positivas entre todas as classes avaliadas com valor significativo ($p < 0,01$). Dois são os grupos dominantes: as Alpha e Deltaproteobacterias. No segundo, dois grupos se separam nitidamente e a relação negativa entre 4 classes (Solibacteres – Chloracidobacteria e Opitutae – Spartobacteria) determina a abundância das demais populações (ANEXO G).

Para elucidar a influência dos atributos do solo sobre a composição da comunidade, também trabalhou-se com Spearman. Selecionou-se as classes que tinham abundância relativa $> 1\%$. Apenas 5 das classes tiveram correlação significativa com os atributos do solo. Spartobacteria se relacionou positivamente apenas com o cobre (Cu). Acidobacteria se correlacionou negativamente com boro (B) e manganês (Mn). Deltaproteobacteria se ligou positivamente ao zinco (Zn) e negativamente ao B, o contrário aconteceu com Actinobacteria: positivo para B e negativo para Zn. As

Gammaproteobacterias se correlacionaram positivamente ao Zn, mas negativamente ao B e Mn (ANEXO H).

Uma RDA foi feita (Figura 17). As variáveis ambientais explicam 60% da variabilidade, sendo que 43,3% é explicado no eixo 1. Permutação de Monte Carlo mostrou que o primeiro e todos os eixos são significantes ($p < 0,01$). *Foward selection* mostrou que Fe, Zn, P e C.E.C. influenciam na modulação da comunidade ($p < 0,05$).

Figura 17 - Gráfico RDA com *foward selection* das Classes para os dois períodos de coleta

Quando observadas as sequências classificadas a nível de Gênero (CLAESSON, 2009), os mais abundantes ($>1\%$) foram: *Acidobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Candidatus Solibacter*, MC18, *Mycobacterium* sp., *Rhodoplanes* sp. e *Streptomyces* sp..

RDA feita com esses gêneros ($>1\%$) mostra que as variáveis ambientais explicam 49% da variabilidade, sendo que 63,2% é explicado no eixo 1. Permutação de Monte

Carlo mostrou que o primeiro e todos os eixos são significativos ($p < 0,05$). *Foward selection* indica que Fe, B, P, K e M.O. são os moduladores da comunidade (Figura 18).

Figura 18 - Gráfico de RDA com *foward selection* dos gêneros bacterianos mais abundantes para os dois períodos de coleta

Separando os dois períodos, pode-se observar mudanças nos gêneros mais abundantes ($>1\%$). Para a coleta na estação chuvosa, as maiores populações são dos gêneros: *Burkholderia* sp. (3,44%), *Mycobacterium* sp. (2,42%), *Acidobacterium* sp. (1,55%), MC18 (1,43%), *Streptomyces* sp. (1,27%), *Ralstonia* sp. (1,25%), *Candidatus Solibacter* (1,24%), *Bacillus* sp. (1,18%).

Já no período de seca, os gêneros mais representativos foram, em ordem de abundância: *Mycobacterium* sp. (7,08%), *Bacillus* sp. (3,59%), MC18 (2,81%),

Rhodoplanes sp. (2,50%), *Pseudonocardia* sp., (2,17%), *Streptomyces* sp. (1,89%), *Candidatus Solibacter* (1,71%), *Saccharopolyspora* sp. (1,51%), *Rubrobacter* sp. (1,13%), *Bradyrhizobium* sp. (1,08%), *Solitubrobacter* sp.(1,02%).

Não se vê separação clara dos gêneros encontrados em relação à estação do ano no RDA (Figura 18), mas observa-se agrupamento das amostras coletadas no P1 (Bahia) mostrando que essas amostras e que os gêneros *Mycobacterium* sp, *Streptomyces* sp. e *Saccharopolyspora* sp. são bastante influenciados pela presença de Boro. Já Ferro e Fósforo aparecem atuando principalmente nas amostras de chuva de P2 e P5, sobre os gêneros *Acidobacterium* sp., *Burkholderia* sp. e *Ralstonia* sp.

6 DISCUSSÃO

6.1 Ferramentas de acesso ao genoma

Muitas eram as dificuldades para se sequenciar o genoma alvo. De maneira geral, os sequenciadores eram caros, o que limitava seu acesso: o sequenciamento era custoso e trabalhoso, pois necessitava de produtos próprios, inclusive radioativos e a quantidade de sequencias acessadas era pequena, 500kb por dia (em comparação, desde 1995, a média de saída é de 2.88Mb por dia) (LIU *et al.*, 2012). Desde sua introdução, em 2005, as tecnologias NGS têm melhorado o sequenciamento tanto em quantidades de dados de saída quanto em acurácia, ou seja, as sequencias obtidas são maiores em número e melhores em qualidade (SHOKRALLA *et al.*, 2012), além de serem acessadas mais rapidamente.

Embora essa ferramenta tenha surgido como alternativa de baixo custo para as plataformas convencionais de sequenciamento, algumas adaptações foram feitas e essa tecnologia vem substituindo rapidamente os microarranjos, que têm sido o padrão para análise de genoma e transcriptoma, mas que apresentam limitações técnicas (FORDE e O'TOOLE, 2013). Com isso e as análises corretas, é possível ter resposta sobre a distribuição dos micro-organismos (biogeografia) contribuindo para o conhecimento de um ecossistema (VIEIRA *et al.*, 2007).

Esse trabalho baseou-se em duas maneiras de se obter dados sobre a comunidade estudada: o perfil T-RFLP (arquéias e bactérias) e o sequenciamento em larga escala (bactérias). Por não necessitar de nenhum tipo de fluorescência, a qualidade do sequenciamento do Ion Torrent é mais estável, quando comparada a uma plataforma similar, que perde sua qualidade devido ao enfraquecimento do sinal fluorescente a cada ciclo (LIU *et al.*, 2012). De modo geral, observou-se para a comunidade bacteriana corroboração dos dados entre si (T-RFLP vs. sequenciamento), demonstrando a qualidade da condição em se traçar perfis de comunidade baseado no polimorfismo terminal, e sugerindo que a abordagem para a comunidade de arqueias seja válida e robusta.

6.2 Clima e micro-organismos

Em ambientes onde o clima é classificado como árido ou semiárido, a atividade desse ecossistema é bastante sensível às mudanças de temperatura e precipitação (YAIR *et al.*, 2008). As características climáticas e a topologia do local, que abriga um bioma particular, exercem certa pressão nas espécies de planta ali situadas, facilmente observado pelos diferentes atributos, assim como também pode alterar os atributos físico e químicos desse solo.

A Caatinga, bioma estudado nesse trabalho, está inserida no ambiente semiárido e devido às suas características adversas, como: alta temperatura, alta incidência de radiação UV, baixa disponibilidade de água e longos períodos de estiagem – pode ser considerada um ambiente extremo (SANTOS *et al.*, 2011).

Com base na média da fluorescência do T-RFLP das amostras (Figuras 3a-3e, 5a-5e e 7a-7e), pode-se observar as diferenças entre as comunidades avaliadas nos diferentes pontos e períodos. Estes dados e os testes estatísticos realizados demonstram que há influência biogeográfica apenas para bactérias e que temperatura e estresse hídrico parecem ser os principais fatores na modulação dessas comunidades. Em ambientes extremos, como esse, a presença de micro-organismos sugere mecanismos de adaptação e resistência a esses fatores moduladores (MacELROY, 1974).

As previsões de mudança do clima sugerem que haverá um aumento na temperatura, assim como uma intensificação na força e no volume de chuvas em ambientes áridos (EASTERLING *et al.*, 2000; SAGER *et al.*, 2007). Isso poderá acelerar o processo de desertificação, levando ao aparecimento de novos ambientes com tais características. Tendo em mente que cerca de 40% de todo o território continental (LE HOUEROU, 1996) e que cerca de 11% do território brasileiro abrange esse clima (AB'SABER, 2003), avaliar a estrutura das comunidades microbianas desse ambiente pode contribuir com estudos sobre o impacto da mudança climática na estrutura dessa comunidade.

Nesse estudo, foi visto que a presença/ausência de chuvas, ou estresse hídrico, foi o principal agente modulador que agiu sobre a comunidade microbiana avaliada. A disponibilidade de água, a concentração de compostos no solo e a oxigenação do

mesmo, são as características alteradas pela precipitação. Micro-organismos oxidadores de amônia, por exemplo, são muito sensíveis à ausência de água, seja por desidratação ou pela disponibilidade de nutrientes (STARK & FIRESTONE, 1995). Isso explica a diferença significativa entre as comunidades de AOA do mesmo ponto para os períodos de seca e chuva encontrada nesse trabalho.

As classes bacterianas mais representativas encontradas nos dois períodos com diferença significativa, ou seja, que tiveram sua população alterada devido à variação da presença de água pertencem aos filos Proteobacteria, Actinobacteria e Acidobacteria. O primeiro é caracterizado por bactérias em cocos ou bastonetes, gram-negativas, com grande diversidade metabólica: nitrificantes, oxidadoras e redutoras de enxofre, redutoras de sulfato, dentre outras. As Actinobacterias são gram-positivas, muitas vezes filamentosas (o que as confundem com fungos), e tem um grande grupo produtor de antibióticos. Por último, as Acidobacterias que são detectadas por métodos moleculares. Acredita-se que sejam estrategistas *k* e apresentem vantagens adaptativas em ambientes oligotróficos. Entretanto, seu metabolismo é pouco compreendido, pois são de difícil cultivo (MADIGAN *et al.*, 2010; QUAISER *et al.*, 2003). Esses dados corroboram o encontrado por Chodak *et al.* (2013), que diz que as Proteobacterias e Acidobacterias têm essa característica principalmente em solos com pH baixo, como o encontrado neste trabalho, e que, em solos secos, como no Deserto do Atacama, o filo Actinobacteria é abundante em relação aos outros (LESTER *et al.*, 2007) e tende a ser menos abundante em solos mais úmidos (ALEKHINA *et al.*, 2001).

Dentre as Proteobacterias, há uma grande variação, quase que inversão da abundância das populações de Beta (β) e Alfaproteobacterias (α), sendo as primeiras mais abundantes na chuva. A classe Gammaproteobacteria (γ) acompanha a variação da β , sendo também mais abundante no período chuvoso. Para as Acidobacterias, a classe de mesmo nome é a mais variante, tendo sua população diminuída na seca, sendo esse percentual agregado pela classe Solibacteres na *M. tenuiflora* e pela classe Chloracidobacteria na *P. stipulacea*. Para as Actinobacterias nenhuma grande variação foi observada. Ainda nesse nível, é possível visualizar separação clara entre as amostras de chuva e seca.

Indo mais fundo, muitas são as características que podem explicar a presença de quaisquer gêneros abundantes em cada um dos períodos. Como nesse ambiente o estresse hídrico tem sido o principal modulador da população bacteriana, explicar como os gêneros encontrados no período seco tem sua população em grande número (>1%) parece ser interessante.

Inicialmente encontra-se o *Mycobacterium* spp., pertencente ao filo das Actinobacterias, com 7,04% da população total de bactérias, que tem por características a forma de bastonetes gram-positivos e apresenta parede celular com ácido micólico. São responsáveis pelo metabolismo de compostos aromáticos naturais ou industriais (FILHO, 1998), apresentam resistência à dissecação devido à sua parede celular. Como exemplo, a espécie *M. goodii*, que foi encontrada em raízes de uma gramínea endêmica do Thar Desert, na Índia (CHOWDHURY *et al.*, 2009). Resistente também a vários antibióticos, devido a sua alta taxa de mutação aos diversos tipos de remediação. Ademais, podem entrar em estado de latência em situações adversas, como observado para *M. tuberculosis* (ROSSETI *et al.*, 2002; GOMEZ & McKINNEY, 2004). Tem-se que espécies deste gênero têm atividade moduladora na produção de etileno nas plantas.

Outro gênero de Actinobacterias também abundante, *Pseudonocardia* spp. (2,17%), tem essa mesma característica: atua sobre a síntese do etileno [Japanese Patent Application No. 8-56684]. Sabe-se que o etileno é largamente encontrado nas plantas e sua produção pode ser induzida por fatores externos: ferimentos, agentes patógenos, calor, estresse hídrico, etc. Além disso, mesmo sem entender ainda corretamente o mecanismo, depara-se com este composto em altas concentrações em momentos diferentes do desenvolvimento vegetal, tais como: germinação, crescimento, amadurecimento de frutos e senescência. O ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (da sigla em inglês, ACC) é o precursor do etileno. Alguns estudos mostram que micro-organismos produtores de ACC-deaminase, impedem essa transformação hidrolisando o ACC, produzindo amônia e α -cetobutirato, fontes de nitrogênio e carbono para bactérias. Isso retardada o desenvolvimento vegetal e, em concomitância com outras bactérias que promovem o alongamento das raízes, permite a busca por água em solos mais profundos (SHAKIR *et al.*, 2012; ZOLLA *et al.*, 2013). Este gênero também pode ser

encontrado em sedimentos marinhos e em solos contaminados por tetraclobenzeno (CHOWDHURY *et al.*, 2009).

O segundo gênero mais abundante é o *Bacillus* (3,59%, Firmicutes). Bastante conhecido pela capacidade de formação de esporos robustos, o que lhe provê resistência aos momentos de estresse em ambientes áridos, semi-áridos e desérticos (BARÁK *et al.*, 2005). Têm também, segundo Marulanda *et al.* (2009) características de promoção de crescimento sob estresse hídrico, tanto da parte aérea como das raízes de plantas, atribuídas ao *B. megaterium*. Outra espécie, *B. subtilis*, aumenta a síntese de Colina e Glicina Betaína junto com a tolerância ao estresse osmótico em plantas. Afora isso, no mesmo trabalho, o tratamento com a cepa GB03 dessa bactéria provê tolerância à seca (ZHANG *et al.*, 2010).

Rhodoplanes spp., do filo das Proteobacterias, é um gênero que atua na denitrificação, inicialmente descrito por Hiraishi & Ueda (1994), e pode ser encontrado em água doce e salobra (LAKSHMI *et al.*, 2009). Como bactéria púrpura não sulfurosa, apresenta diversidade nutricional, podendo se utilizar de compostos aromáticos como o benzoato e tolueno como fonte de carbono (MADIGAN *et al.*, 2010).

Rubrobacter, é um gênero em que espécies com característica termofílica e ligeira halotolerância (*R. xylanophilus*) e ligeiramente termofílica (*R. radiotolerans*) foram recuperadas em Portugal e consideradas extremamente resistentes à radiação gama, pois foram isoladas após esse tratamento em água e biofilme (FERREIRA *et al.*, 1999). Segundo Terato *et al.* (2011), *R. radiotolerans* é considerada a eubactéria não esporulada mais resistente à radiação gama, e seu estudo sugere que a responsável por essa resistência é a enzima Mn-SODs (manganês superóxido dismutase). Mesmo sendo comumente encontradas em ambientes quentes extremos, algumas cepas desse gênero foram localizadas em monumentos biodeteriorados, e análise genômica mostrou migração diferenciada em DGGE dessas cepas, sugerindo novas espécies (LAIZ *et al.*, 2009).

A cepa MC18 foi encontrada em solo australiano por Liesack & Stackebrandt (1992) e está relacionada, ainda que de maneira distante, aos gêneros *Planctomyces* e *Clamydia*. O clone EA25 encontrado em Washington (LEE *et al.*, 1996), tem 93% de

similaridade com essa cepa, sugerindo distribuição de cepas similares em ambientes temperados. Nesse trabalho, a similaridade da sequência encontrada na rizosfera das leguminosas com a conhecida de MC18 é de 96%. Também é encontrada no período chuvoso, só que em menor abundância que no seco (1,43% e 2,81%, respectivamente).

O gênero *Streptomyces*, tem mais de 500 espécies conhecidas, são formadores de esporos, característica usada para diferenciação de espécies, e são conhecidos produtores de antibióticos. Facilmente encontrados em solos arenosos ou calcários, seus antibióticos tem ação sobre bactérias gram-negativas e gram-positivas, *M. tuberculosis* e fungos diversos (MADIGAN *et al.*, 2010). Uma nova espécie foi encontrada no deserto do Atacama, *S. deserti* sp. nov. (SANTHANAM *et al.*, 2012). Além disso, espécies rizosféricas de *Streptomyces* têm a capacidade de promover o crescimento de trigo (JOG *et al.*, 2012). Um estudo publicado por Köberl *et al.* (2013), mostra que os gêneros *Streptomyces* e *Bacillus*, isolados de plantações em ambientes áridos do Egito têm características antagônicas em relação a nematoides e à bactéria patogênica *Ralstonia solanacearum*, funcionando como agentes de controle biológico adaptados à esse ambiente extremo.

Qin *et al.* (2009) encontrou *Saccharopolyspora*, uma Actinobacteria, em plantas com superfície esterilizadas, indicando que o gênero tem características endofíticas. Esse gênero tem por propriedade a produção de metabólitos denominados espinosinas, que são interessantes do ponto de vista econômico, ecológico e agrônômico, dado que são pesticidas naturais contra fungos e insetos. Oligosporos de *Saccharopolyspora* foram encontrados em desertos e “desert-stepped” da Mongólia, no prado montanhoso do Cáucaso Central e em solos vulcânicos da Península “Khamchatka”. Esses ambientes têm temperaturas que variam de 40°C a 60°C (ZENOVA *et al.*, 2009).

O gênero *Bradyrhizobium*, com abundância relativa de 1,08% na seca, tem ação na proteção de plantas contra metais pesados como zinco e níquel, além de reduzir a concentração desses compostos nas plantas, induzindo seu crescimento e tornando possível usá-lo como biorremediador (WANI *et al.*, 2007). Sabe-se que esse gênero tem por característica a formação de nódulos, principalmente em leguminosas, onde, uma vez nodulado, a fixação biológica de nitrogênio é possível. A Caatinga tem por

característica a baixa disponibilidade de nitrogênio devido a vários fatores (HUNGRIA e VARGAS, 2000), então o aumento dessa população indica uma possível sinalização e interação planta-micro-organismo na obtenção do nitrogênio utilizável. Teixeira et al. (2010) evidenciou essa nodulação em leguminosas na Caatinga. Algo importante para se pensar é que, em culturas onde o *Bradyrhizobium* é utilizado como inoculante, existe a preocupação da sobrevivência dessa população frente à já presente e naturalizada ao solo de plantio, o que muda a visão sobre o potencial de nodulação e a nodulação efetiva (ROUGHLEY et al., 1993). Nesse caso, como o *Bradyrhizobium* é nativo, manejo e produção de inoculantes podem influenciar a nodulação e o crescimento vegetal minimizando o impacto da competição. Através da nodulação e da fixação de nitrogênio em ambiente estressante, algumas espécies de leguminosas fazem reserva de N em partes do vegetal, sendo essa uma alternativa de adubo verde preferível a adubos nitrogenados de fonte química não natural (DAKORA & KEYA, 1997; RODRIGUES et al., 2013).

Candidatus Solibacter, do filo das Acidobacterias, tem por característica um grande genoma (9,9Mb). Tem-se que espécies com genomas curtos costumam ser especializadas, por isso “perderam” genes ao longo de sua evolução, (WARD et al., 2009) promovendo economia de energia. O *Candidatus Solibacter* possui em seu genoma muitos transposons, o que provê plasticidade genética, ou seja, a capacidade de adaptação à diferentes características, extremas ou não. Por outro lado, as razões que determinam a quantidade de transposons em um organismo ainda não são muito claras. Por serem de difícil cultivo, a fisiologia e biologia de bactérias desse filo são pouco compreendidas, mas uma grande população destaca-se em vários ambientes e mais estudos são necessários (CHALLACOMBE & KUSKE, 2012).

A despeito das qualidades e capacidade de sobrevivência dos organismos na Caatinga, como ambiente extremo, espera-se que, num ambiente sem estresse hídrico, os fatores comuns na modulação de um ecossistema equilibrado, tais como: predação, competição nutricional e por habitat – sejam os elementos compositores de uma comunidade mais ativa, diversa e rica.. Macro ou micro-organismos que colonizam tal região e que, na ausência de água, estariam em estado de latência, voltariam a participar ativamente da comunidade do solo. Os índices de Shannon e

Simpson apresentados nesse trabalho mostram uma comunidade rica em ambos os períodos

Por outro lado, a alta temperatura encontrada na Caatinga, além da baixa capacidade do solo de absorver água, devido à sua composição, causa uma alta taxa de evaporação, contribuindo para o clima seco. A ausência de água expõe nichos anóxicos ao oxigênio (BALDWIN e MITCHELL, 2000), gerando uma forte pressão sobre a microbiota anaeróbica, levando-a à um estado de latência ou morte (LYNCH e HOBIE, 1988; LOCEY, 2010) e oferecendo aos dependentes de oxigênio a possibilidade de colonizar novas áreas.

Concluindo, ao se comparar com as pressões sofridas pelos vegetais deste bioma, é possível imaginar que características do solo exerçam algum tipo de modulação na comunidade microbiana deste, como o observado para precipitação (LINDBERG *et al.*, 2002) e temperatura (ZHANG *Et al.*, 2005; RINNAN *et al.*, 2007) neste trabalho.

6.3 Modulação físicas e químicas

Foi possível observar que algumas características físicas e químicas dos solos foram significativamente diferentes ($p < 0.05$) entre os sítios amostrados, sugerindo sua importância na modulação na composição da comunidade microbiana. Segundo Nielsen *et al.* (2010) e Bachar *et al.* (2010), espécies diferentes requerem diferentes recursos para um crescimento ótimo. A quantidade desses recursos pode, também, limitar o crescimento de toda a comunidade, alterando assim sua estrutura.

Para a comunidade bacteriana aferida por T-RFLP, Zinco, Fósforo, Cálcio e Manganês foram os compostos responsáveis por essa diferenciação encontrada. A alta presença de Zn e Mn não diminuiu o valor pH; em alguns casos, houve inclusive o aumento, alguns beirando a neutralidade. Por outro lado, H+Al e Fe também apareceram para a análise de Monte Carlo, com *forward selection*, como moduladores. Esse fato sugere que a acidez do solo age ativamente nessa comunidade. Para todos os pontos, o solo foi avaliado com características ácidas. Num estudo conduzido por Fierer e Jackson (2006), pH foi o atributo que mais atuou

na diversidade e riqueza bacteriana. Também, além do pH, Al^{3+} e o potencial ácido foram os maiores responsáveis pela diversidade microbiana (JESUS *et al.*, 2009).

Nas estatísticas com o sequenciamento, foi visto que tanto em nível de Classe quanto de Gênero, Fe e P são moduladores da comunidade. Contudo, existem diferenças entre os níveis, mostrando fatores que não apareciam do ponto de vista mais abrangente, indicando que uma avaliação mais profunda provê resultados mais concisos. Como exemplo, pode-se citar, baseado nos resultados obtidos nesse trabalho, que se se tivesse o intuito de aumentar, observando-se a Classe, a presença de *Bradyrhizobium* dever-se-ia trabalhar com a quantidade de Fe no solo. Ao se buscar mais afundo, vê-se que, na verdade, o B é mais ativo sobre essa comunidade. Da mesma forma, vê-se que as Actinobacterias não são influenciadas significativamente por nenhum atributo do solo, entretanto, têm correlação positiva com B e negativa com Zn, e que *Streptomyces* spp. tem correlação com B.

A relação de micro-organismos com o boro vem sendo evidenciada em alguns trabalhos. Pesquisas recentes mostram que a boromicina é um anti-HIV natural, produzido por espécies de *Streptomyces* e por *Sorangium cellulosum*. Além disso, um novo papel vem sendo atribuído ao boro: a sinalização nos mecanismos de comunicação na simbiose planta-micro-organismo na fixação de N_2 (DEMBITSKY *et al.*, 2011). No caso de *Mycobacterium* sp., observou-se que os tratamentos atuais têm dificuldade em curar a tuberculose dado a quantidade de mutantes resistentes dessa espécie (*M. tuberculosis*) e o tempo de aplicação dos mesmos tipos de antibióticos (desde 1960). No trabalho referência, nos teste *in vitro*, antibióticos contendo boro foram mais efetivos no tratamento da tuberculose do que outros sem esse composto (GOROVOY *et al.*, 2012.). Ainda para *Streptomyces* sp., encontrou-se que algumas cepas foram isoladas de solo argentino contendo altas concentrações de boro: 60-80mM; demonstrando a capacidade desses organismos de sobreviverem e crescerem ou, até mesmo, removerem esse contaminante no solo (MORAGA *et al.*, 2013), dado que alguns *Streptomyces* produzem metabólitos contendo boro, como visto anteriormente. A despeito dos aparentes efeitos positivos sobre a comunidade, Dembitsky *et al.*(2011) observa que o compostos naturais ou sintéticos contendo boro são auto-indutores e tem efeito sobre o *quorum sensing* de bactérias e fungos interferindo na adesão e formação de biofilmes, por exemplo.

Mesmo que esse componente seja mais ativo sobre determinados gêneros, Fe e P têm sua relação com bactérias evidenciadas, como visto a seguir.

Acidobacterium, gênero conhecido por ser acidófilo e largamente distribuído no ambiente, mas com sua capacidade metabólica pouco estabelecida, foi isolado de água contaminada em minas de ferro do Reino Unido e Estados Unidos e apresentou a capacidade de reduzir (COUPLAND, JOHNSON, 2009) e também de oxidar ferro (WEBER *et al.*, 2006).

O gênero *Burkholderia* que é bem distribuído, com espécies consideradas diazotróficas, é comumente encontrado na rizosfera de plantas e tem diversas características interessantes para a agricultura. Foi encontrado em nódulos nas raízes *Mimosa* do Panamá e América do Sul, e estudos recentes mostram que estirpes de uma coleção da Embrapa Agrobiologia anteriormente catalogadas como *Rhizobium* sp. foram analisadas geneticamente (16S rRNA), mostrando serem, na verdade, pertencentes ao gênero *Burkholderia* (REIS JUNIOR *et al.*, 2006). Fenóis clorados e fenoxiacetatos são conhecidos por sua utilização em pesticidas e inseticidas na lavoura. A espécie *B. cepacia* tem a capacidade de utilizar esses compostos como fonte de carbono, agindo como descontaminante e biorremediador (HÜBNER *et al.*, 1998), tem atividade antifúngica e contra *Rhizoctonia solani*, produz um antifúngico que se mantém estável em altas temperatura, na presença de enzimas proteolíticas e solventes orgânicos (QUAN *et al.*, 2006), além de também ter ação anti-nematóide (GAUTAM *et al.*, 2011). Estudos mostram sua capacidade de crescimento em ambientes com altas quantidades de ferro, formação de biofilme e produção de EPS com solubilização de fosfato (DELVASTO *et al.*, 2009) e promoção de crescimento (VANDAMME; DAWYNDT, 2011).

Ralstonia é um gênero conhecido por suas propriedades patógenas. Estudo conduzido por Muthamia e Ravichandra (2012), mostram que o seu complexo de murcha da espécie *R. solanacearum* torna o tomateiro susceptível ao nematoide testado e interfere na sua captação de NPK (nitrogênio, fósforo e potássio). No entanto, uma espécie anteriormente classificada como *R. taiwaniensis* (CHEN *et al.*, 2001), hoje como *Cupriavidus taiwaniensis* (VANDAMME, COENYE, 2004), foi isolada de nódulos de *Mimosa pudica* e *Mimosa diplotricha*. A referência mostra que essa espécie bacteriana não foi isolada dos exemplares das leguminosas da

América do Sul, sugerindo que ela seja endêmica da Ásia. Não obstante, mostrou-se capaz de infectar, nodular e fixar nitrogênio em *Mimosa* spp. (REIS JUNIOR *et al.*, 2006). Neste trabalho, sequencias classificadas como pertencentes a esse gênero foram encontradas na rizosfera das duas plantas avaliadas apenas no período de chuva.

No caso da comunidade de arqueias, Boro (B) foi o fator prevalente, além de Zn e P, na alteração da comunidade. Alguns elementos são chamados “indiferentes”, por que por existirem em níveis mais baixos nos sistemas biológicos, eles não são considerados necessários para sua sobrevivência (BEVERIDGE *et al.*, 1997). Esse é o caso do B, que é pobremente estudado na relação boro-arqueias, e encontrou-se apenas um trabalho citando sua possível participação no molde da comunidade, em um trabalho de mestrado desenvolvido por Mendes (2009). Apesar dessa “indiferença”, o boro já aparece na ecologia há tempos, pois sabia-se já, por exemplo, que o B era necessário para o desenvolvimento das plantas (TEATCHER, 1934), mesmo sem se conhecer a razão, que foi descoberta muito mais tarde (O’NEILL, 2001). Além disso, esse composto é requerido por cianobactérias para produzir heterocistos fixadores de nitrogênio que sejam ativos (MARSHALL *et al.*, 1987; BONILLA *et al.*, 1990) e que, como citado, algumas espécies de bactéria produzem antibióticos contendo Boro (DUNITZ *et al.*, 1971; IRSCHIK *et al.*, 1995). Dado isso, a relação boro-arquéia pode ser importante e deveria ser mais estudada.

Alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos, mas ainda pouco se sabe sobre este elemento e sua atividade frente a alguns micro-organismos. Ele vem sendo explorado pouco a pouco na medicina, e isso é devido principalmente ao leque de produtos naturais contendo boro (RAMACHANDRAN, 2013).

6.4 Efeito das plantas e biogeografia na comunidade microbiana

Neste trabalho não foi confirmado um efeito significativo das plantas sobre a comunidade microbiana rizosférica, nem em relação aos diferentes pontos amostrados nem em relação às diferentes espécies de planta.

O estágio de crescimento da planta deve ser o fator modulador da estrutura da comunidade rizosférica mais importante (BUÉE et al., 2009). Uma vez que nosso trabalho foi com apenas plantas adultas, esse pode ser o motivo da não diferenciação entre as comunidades rizosféricas encontradas, ainda que isso vá contra o que é comumente encontrado (ANDREOTE et al., 2009). No entanto, no bioma Caatinga, Kavamura *et al.* (2013), encontrou na comunidade rizosférica do cacto *Cereus jamacaru*, conhecido por mandacaru, sob o mesmo ponto de vista avaliativo (presença/ausência de água) uma abundância relativa (<1%) da microbiota rizosférica com diferenças do encontrado nesse estudo, principalmente em relação ao filo Bacteroidetes, os quais não foram evidenciados em grande número neste trabalho. Isso sugere que plantas similares, como as objeto de avaliação deste levantamento, atraem pra si por meio de seus exsudatos grupos microbianos similares.

Com relação aos diferentes pontos amostrados, padrões biogeográficos podem ser explicados tanto pela heterogeneidade do ambiente quanto pelo histórico dos eventos ocorridos num local específico que são capazes de alterar uma comunidade (AZOVSKY, 2002; MARTINY *et al.*, 2006; O'MALLEY, 2008; FOISSNER, 2008). Segundo a hipótese de BAAS BECKING (1934), os micro-organismos são distribuídos igualmente através dos ambientes e a característica de cada lugar é responsável pela sua seleção; apesar do grande tempo desde que essa afirmativa foi feita, esse aspecto continua em questão (QUISPEL, 1988).

Por meio dos testes estatísticos, foi possível observar uma diferenciação significativa entre as comunidades bacterianas dos diferentes pontos por T-RFLP. Estudos baseados no 16S rRNA têm possibilitado o questionamento da distribuição biogeográfica dos micro-organismos, fazendo com que a ideia de homogeneidade da população bacteriana seja desmistificada. Foi observada heterogeneidade em abundância (ANDRADE et al, 2003), diversidade (HEWSON, FUHRMAN, 2004) e atividade fisiológica (SERVAIS *et al.*, 2003). Contudo, análises multivariadas não são suficientes para determinar se a distribuição é homogênea ou heterogênea. Aliás, elas somente sugerem que as características de cada ponto (por exemplo, disponibilidade de água e de micronutrientes) tem uma influência sobre a modulação da comunidade.

As análises baseadas no sequenciamento da região V6 do gene 16S rRNA não apresentaram diferenciação significativa dos pontos amostrados, com exceção do agrupamento das amostras coletadas na Bahia, o que provavelmente resultou na diferenciação significativa encontrada pelo T-RFLP. Nesse ponto, a presença do filo Actinobacteria é até 4 vezes maior em relação aos outros pontos, e até 4 vezes menor em relação ao filo Proteobacteria (dados não apresentados) alterando assim mais de 50% a comunidade em comparação aos demais pontos amostrados.

Para as comunidades de Arquéia e AOA, não foram observadas nenhuma variação significativa na estrutura da comunidade entre os diferentes sites. Uma razão pode ser que a diversidade e abundância de arqueias aumentam quanto mais profundamente se siga no solo. Ademais, uma vez que a análise é de rizosfera, o material coletado pode não ter sido o suficiente para tal medição. Em seguida, segundo Ochseinreiter *et al.*(2003) e Kemnitz *et al.*(2007), arqueias constituem de 5% a 38% do total da diversidade de micro-organismos em solos arenosos e solos ácidos de florestas, respectivamente. Comparando o solo obtido da Caatinga com os solos apresentados pelos autores, a abundância deve margear os 5%, fazendo com que o acesso a esses organismos seja uma tarefa mais difícil, dado que a detecção limite para a técnica *fingerprinting* se restrinja a populações mais abundantes (PEDROS-ALIÓ, 2006). Dessa forma, se as amostras se diferenciam por táxons menos abundantes, sua diversidade irá se assemelhar (CURTIS *et al.*, 2006).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Análises conjugadas de T-RFLP e sequenciamento apresentam que o principal modulador da comunidade microbiana rizosférica das leguminosas avaliadas é a presença e a ausência de chuva.
- Contrariando a bibliografia e o comumente encontrado, as espécies de plantas não influenciaram na formatação da população de arqueias e bactérias.
- Três foram as características responsáveis pela resposta da comunidade em relação aos atributos físico e químicos: ferro, fósforo e boro.
- Não houve padrão biogeográfico observado para arqueias. Para bactérias, com exceção às amostras da Bahia, que se diferenciam nos filos Actino e Proteobacterias em mais de 50% em relação aos outros pontos, todos aparecem distribuídos aleatoriamente. Esse foi, provavelmente, o motivo da diferenciação significativa observada no T-RFLP.
- Os filos Actino, Acido e Proteobacterias são os mais representativos e que mais variam em relação às diferentes estações do ano.
- Dos onze gêneros mais abundantes encontrados no período seco, sabe-se que 6 deles apresentam características consideradas extremofílicas, e seis se mostram capazes de trazer benefícios na interação planta-micro-organismos, indicando a sinalização para a atração desses organismos pela planta.
- A classes se correlacionam, principalmente, entre classes de um mesmo filo. As correlações positivas e negativas encontradas, correspondem ao esperado dentro das características de cada filo.
- Nenhuma característica foi dominante entre as espécies encontradas no período seco. Os dados encontrados são corroborados pela literatura, onde Actinobactérias são predominantes na seca e Proteobacterias predominantes na época de chuva.
- O boro aparece como responsável na modulação da comunidade tanto de bactérias quanto de arqueias. Sabe-se da relação do boro-bactéria sobre sua presença em antibióticos e metabólitos produzidos por esses micro-organismos,

ainda que pouco se saiba sobre seu caminho no metabolismo celular. No entanto, poucos estudos são realizados sobre a interação boro-arquéias, mostrando que essa área ainda necessita de pesquisas.

REFERÊNCIAS

AB'SABER, A.N. **Os domínios da natureza no Brasil: potencialidades paisagísticas**. 2 ed. Ateliê Editorial. São Paulo, 2003. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=lang_pt&id=ckbBFiZrjroC&oi=fnd&pg=PA9&dq=ab%27saber&ots=3l8TC8JiAP&sig=23zRSp2ABRL_FVKuJ3ecfRsCPTo#v=onepage&q=ab'saber&f=false>. Acesso em: 10 jul. 2011.

AMILS, R. Ambientes extremos y geología: el caso de Río Tinto. **Enseñanza de las Ciencias de la Tierra**, Cordoba, v.20, n.2, p. 122-132, 2012.

ALEKHINA, L.K.; DROBOVOL'SKAYA, T.G.; POCHATKOVA, T.N.; ZVYAGINTSEV, D.G. Evaluation of bacterial diversity in soil microcosms at different moisture contents. **Microbiology**, New York, v.70, n.6, p. 731-737, 2001.

ANDRADE, L.; GONZALEZA, A. M.; ARAUJOA, F. V.; PARANHOS, R. Flow cytometry assessment of bacterioplankton in tropical marine environments. **Journal of Microbiological Methods**; Amsterdam; v.55; p.841–850; 2003.

ANDREOTE, F.D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas**. 2007. 201p. Tese (Doutorado na área de Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.40, p. 417-432, 2009.

ARAÚJO, C.S.F.; SOUSA, A.N. Estudo do processo de desertificação na caatinga: uma proposta de educação ambiental. **Ciência & Educação**, Bauru, v. 17, n. 4, p. 975-986, 2011.

AZOVSKY, A. I. Size-dependent species-area relationships in benthos: is the world more diverse for microbes? **Ecography**; Copenhagen; v.25; p.273–282; 2002.

BAAS-BECKING, L. G. M. Geobiologie of inleiding tot de milieukunde. **Van Stockum and Zoon**; The Hague; 1934; 263p.

BACHAR, A.; AL-ASHHAB, A.; SOARES, M. I.; SKLARZ, M. Y.; ANGEL, R.; UNGAR, E. D.; GILLOR, O. Soil Microbial Abundance and Diversity Along a Low Precipitation Gradient. **Microbiology Ecology**; Amsterdam; v. 60; p.453–461; 2010.

BAIS, H.P.; WEIR, T.L.; PERRY, L.G.; GILROY, S.; VIVANCO, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 233-266, 2006.

BALDWIN, D. S.; MITCHELL, A. M. The effects of drying and re-flooding on sediment and soil nutrient dynamics of lowland river-floodplain systems: a syn-thesis. **Regulated Rivers: Research and Management**; Sussex n. 16; p. 457-467; 2000.

BARÁK, I.; RICCA, E.; CUTTING, S.M. From fundamental studies of sporulation to applied spore research. **Molecular Microbiology**, Salem, v.55, n.2, p. 330-338, 2005.

BELAY-TEDLA, A.; ZHOU, X.; SU, B.; WAN, S.; LUO, Y. Labile, recalcitrant, and microbial carbon and nitrogen pools of a tallgrass prairie soil in the US Great Plains subjected to experimental warming and clipping. **Soil Biology & Biochemistry**. Elmsford, v. 41, p. 110–116, 2009.

BERENDSEN, R.L.; PIETERSE, C.M.J.; BAKKER, P.A.H.M. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, Oxford, 2012. In press.

BEVERIDGE, T. J.; HUGHES, M. N.; LEE, H.; LEUNG, K. T.; POOLE, R. K.; SAVVAIDES, I.; SILVER, S.; TREVORS, J. T. Metal-microbe interactions: contemporary approaches. **Advances in Microbial Physiology**; London; v. 38; p. 177–243; 1997.

BLANKENBERG, D.; GORDON, A.; VON KUSTER, G.; CORAOR, N.; TAYLOR, J.; NEKRUTENKO, A. Galaxy Team. Manipulation of FASTQ data with Galaxy. **Bioinformatics**. Oxford, v.14, n. 26, , p.1783-1785, 2010.

BONILLA, I.; GARCIA-GONZALEZ, M.; MATEO, P. Boron requirement in cyanobacteria. **Plant Physiology**; Minneapolis; v. 94; p.1554–1560; 1990.

BUÉE, M.; DE BOER, W.; MARTIN, F.; VAN OVERBEEK, L.; JURKEVITCH, E. The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. **Plant Soil**, The Hague, v.321, p.189–212, 2009.

BULT, C.J.; WHITE, O.; OLSEN, G.J.; ZHOU, L.; FLEISCHMANN, R.D.; SUTTON, G.G.; BLAKE, J.A.; FITZGERALD, L.M.; CLAYTON, R.A.; GOCAYNE, J.D.; KERLAVAGE, A.R.; DOUGHERTY, B.A.; TOMB, J.F.; ADAMS, M.D.; REICH, C.I.; OVERBEEK, R.; KIRKNESS, E.F.; WEINSTOCK, K.G.; MERRICK, J.M.; GLODEK, A.; SCOTT, J.L.; GEOGHAGEN, N.S.; VENTER, J.C. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. **Science**, New York, v. 273, p. 1058–1073, 1996.

CARDOSO, E.J.B.N.; FREITAS, S.S. A rizosfera. In: Cardoso, E.J.B.N., Tsai, S.M. & Neves, M.C. (Coords.) Microbiologia do Solo. Campinas. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 1992. pp.41-59.

CASAMAYOR, E.O.; Massana, R.; Benlloch, S.; Øvreås, L.; Díez, B.; Goddard, V.J.; Gasol, J.M.; Joint, I.; Rodríguez-Valera, F.; Pedrós-Alió, C. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. **Environmental Microbiology**; Oxford; [S.I.]; v. 4; n. 6; p. 338-348; Jun 2002.

CENCIANI; K. **Diversidade bacteriana em solos da Amazônia**: variabilidade dos gêneros associados ao processo de nitrificação. 103p. 2007. Tese (Doutorado na área de) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”; Universidade de São Paulo; Piracicaba; 2007.

CHALLACOMBE; J. ;KUSKE; C. Challacombe J; Kuske C. Mobile genetic elements in the bacterial phylum Acidobacteria. **Mobile Genetic Elements**. Los Alamos, v. 2; p.179 – 183; 2012.

CHEN; W.M.; LEAVENS; S.;LEE; T.M.; COENYE; T.; DE VOS; P.; MERGEAY; M.;VANDAMME; P. *Ralstonia taiwaniensis* sp. nov.; isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Systematic and Evolutionary Microbiology**. Reading, v.51; p.1729-1735; 2001.

CHODAK; M.; GOŁĘBIEWSKI; M.; MORAWSKA-PŁOSKONKA; J.; KUDUK; K.; NIKLIŃSKA; M. The effect of drought on the structure and diversity of bacterial communities in forest soils differently polluted with heavy metals. **Geophysical Research Abstracts**, Vienna, v.15; 1p., 2013.

CHOWDHURY; S.P.; SCHMID; M.; HARTMANN; A.; TRIPATHI; A.K. Diversity of 16S-rRNA and nifH genes derived from rhizosphere soil and roots of an endemic drought tolerant grass, *Lasiurus indicus*. **European Journal of Soil Biology**; Montrouge; v.45; p. 114-122; 2009.

CLAESSON; M.J.; O'SULLIVAN; O.; WANG; Q.; NIKKILA; J.; MARCHESI; J.R.; SMIDT; H.; VOS; W.M. de; ROSS; R.P.; O'TOOLE; P.W. Comparative Analysis of Pyrosequencing and a Phylogenetic Microarray for Exploring Microbial Community Structures in the Human Distal Intestine. **PLOS ONE**, San Francisco, v.4; n.8; p.e6669; 2009.

COLLINS; S.L.; SINSABAUGH; R.L.; CRENSHAW; C.; GREEN; L.; PORRAS-ALFARO; A.; STURSOVA; M.; ZEGLIN; L.H. Pulse dynamics and microbial processes in aridland ecosystems. **Journal of Ecology**; Oxford; n. 96; p. 413-420; 2008.

COUPLAND; K ; JOHNSON; D.B. Evidence that the potential for dissimilatory ferric iron reduction is widespread among acidophilic heterotrophic bacteria. **FEMS**, Amsterdam, v.279; p.30-35; 2009.

CULMAN; S.W.; GAUCH; H.G.; BLACKWOOD; C.B.; THIES; J.E. Analysis of T-RFLP data using analysis of variance and ordination methods: A comparative study. **Journal of Microbiology Methods**, Amsterdam, n.75; p. 55-63; 2008.

CURTIS, T. P.; HEAD, I. M.; LUNN, M.; WOODCOCK, S.; SCHLOSS, P. D.; SLOAN, W. T. What is the extent of prokaryotic diversity? **Philosophical Transaction of the Royal Society B: Biological Sciences**; London; v. 361; p. 2023–2037; 2006.

DAKORA; F.D. ; KEYA; S.O. Contribution of legume nitrogen fixation to sustainable agriculture in Sub-Saharan Africa. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.29; p.809–817; 1997.

DELVASTO; P.; BALLESTER; A.; MUÑOZ; J.A.; GONZÁLEZ; F.; BLÁZQUEZ; M. L.; IGUAL; J.M.; VALVERDE; A.; GARCÍA-BALBOA; C. Mobilization of phosphorus from iron ore by the bacterium *Burkholderia caribensis* FeGL03. **Minerals Engineering**, Oxford, v. 22; n.1; p.1–9; 2009.

DEMBITSKY; V.M.; QUNTAR; A.A.A.A.; SREBNIK; M. Natural and Synthetic Small Boron-Containing Molecules as Potential Inhibitors of Bacterial and Fungal Quorum Sensing. **Chemical Reviews**, Washington, v.111; p.209-237; 2011.

DUNITZ, J.; HAWLEY, D.; MIKLOS, D.; WHITE, D.; BERLIN, Y.; MARUSIC, R.; PRELOG, V. Structure of boromycin. **Helvetica Chimica Acta**; Basel v. 54: p.1709–1713; 1971.

EASTERLING, D.; MEEHL, G. A.; PARMESAN, C.; CHANGNON, S. A.; KARL, T. R.; MEARN, L. O. Climate extremes: observations, modeling, and impacts. **Science**; New York; n. 289; p. 2068–2074; 2000.

ELSAS; J.D.; BOERSMA; F.G.H. A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, n.47; p. 77-87; 2011.

FERNANDES, J. D.; MEDEIROS, A. J. D. Desertificação no nordeste: uma aproximação sobre o fenômeno do Rio Grande do Norte. **Holos**; Rio Claro; v. 3; p. 147-161, 2009.

FERNANDES; J.; DANTAS; A. 2010. **Desertificação no Nordeste**: uma aproximação sobre o fenômeno do Rio Grande do Norte. HOLOS - ISSN 1807-1600. Disponível em: <<http://www.cefet-rn.br/ojs/index.php/HOLOS/article/view/265>>. Acesso em: 16 Jul. 2013.

FERREIRA; A.C.; NOBRE; M.F.; MOORE; E.; RAINEY; F.A.; BATTISTA; J.R.; COSTA; M.S. da. Characterization and radiation resistance of new isolates of *Rubrobacter radiotolerans* and *Rubrobacter xylanophilus*. **Extremophiles**, Tokyo, v.3; n.4; p.235-238.

FERREIRA; A.G. ; MELLO; N.G. da S. 2005. Principais sistemas atmosféricos atuantes sobre a região nordeste do Brasil e a influência dos oceanos pacífico e atlântico no clima da região. **Revista Brasileira de Climatologia**, Presidente Prudente, v.1; n.1; p. 15-28; 2005.

FIERER; N.; SCHIMEL; J.P.; HOLDEN; P. A. Influence of drying-rewetting frequency on soil bacterial community structure. **Microbial Ecology**, New York; n. 45; p. 63-71; 2003.

FIERER, N.; JACKSON, R. B. The diversity and biogeography 1 of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA, Washington**; Washington; n. 103; p. 626-631; 2006.

FILHO; J.B.S. **Degradação de fenol por microrganismos isolados de efluente da gaseificação do carvão**. 1998. 122p. Tese (Doutorado em Ciências do Solo). Faculdade de Agronomia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Porto Alegre; 1998.

FORDE; B.M.; O'TOOLE; P.W. Next-generation sequencing technologies and their impact on microbial genomics. **Briefing in Functional Genomics**; Oxford; p.1-14; 2013.

FRANCIS, C. A.; ROBERTS, K. J.; BEMAN, J. M.; SANTORO, A. E. E.; OAKLEY, B. B. B. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean [Internet]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; Washington; n. 102; 14683; 2005.

FRANCIS, C.A.; BEMAN, J.M.; KUYPERS, M.M. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. **Isme Journal** [S.l.]; Stanford; v. 1; n. 1; p. 19-27; 2007.

FOISSNER, W. Protist diversity and distribution: some basic considerations. **Biodiversity and Conservation**; London; v.17; p. 235–242; 2008.

GAUTAM; V.; SINGHAL; L.; RAY; P. Burkholderia cepacia complex: Beyond pseudomonas and acetinobacter. **Indian Journal of Medical Microbiology**; India; v.29; p.4-12; 2011.

GELSOMINO; A.; KEIJZER-WOLTERS; A.A.; 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**; Berlin; v. 38; p. 1-15; 1999.

GIULIETTI, A.M.; BOCAGE NETA, A.L. du; CASTRO, A.A.J.F.; GAMARRA-ROJAS, C.F.L.; SAMPAIO, E.V.S.B.; VIRGÍNIO, J.F.; QUEIROZ, L.P. de; FIGUEIREDO, M.A.; RODAL, M. de J.N.; BARBOSA, M.R. de V.; HARLEY, R.M. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. In: **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação** SILVA; J.M.C. ; TABARELLI; M.T.; FONSECA; L.V. LINS; (ORG.). Brasília: MMA; UFPE; Conservation International do Brasil; Fundação Biodiversitas; Embrapa Semi-Árido; 2004. p.48-90.

GLENN; T.C. Field guide to next-generation DNA sequencers. **Molecular Ecology Resources**; Oxford; v.11; n.5; p.759-769; 2011.

GOMEZ; J.E. ; McKINNEY; J.D. *M. tuberculosis* resistance; latency; and drug tolerance. **Tuberculosis**; Edinburgh; v.84; n.1/2; p 29-44; 2004.

GOROVOY; A.S.; GOZHINA; O.V.; SVENDSEN; J.S.; DOMORAD; A.A.; TETZ; G.V.; TETZ; V.V.; LEJON;T. Boron-containing peptidomimetics – a novel class of selective anti-tubercular drugs. **Chemical Biology & Drug Design**; Oxford; v.81; p.408-413; 2012.

HALLIN; S.; LINDGREN; P.E. PCR detection of genes encoding nitrile reductase in denitrifying bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**; Washington; [S.I.]; v. 65; n. 4; p. 1652-1657; 1999.

HAMMER; O.; HARPER; D.A.T.; RYAN; P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**; v. 4; n.1; 9p.; 2001.

HEUER, H.; KRSEK, M., BAKER, P., SMALLA, K., WELLINGTON, E.M. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**; Washington; [S.l.]; v. 63; n. 8; p. 3233-3241; Aug 1997.

HEWSON, I.; FUHRMAN, J. A. Richness and diversity of bacterioplankton species along an estuarine gradient in Moreton Bay, Australia. **Applied and Environmental Microbiology**; Washington; v. 70; p.3425–3433; 2004.

HILTNER; L. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründung und Brache. **Arbeiten der Deutschen Landwirtschaft Gesellschaft**; Berlin; v. 98; p. 59-78; 1904.

HIRAISHI; A. ; UEDA; Y. *Rhodoplanes* gen. nov.; a New Genus of Phototrophic Bacteria Including *Rhodopseudomonas rosea* as *Rhodoplanes roseus* comb. nov. and *Rhodoplanes elegans* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.44; n.4 p.665-673; 1994.

HOTELLING, H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. **British Journal of Educational Psychology**; n.24; p.417–441; 1933.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics; with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**; Amsterdam; v.65; p. 151-164; 2000.

HÜBNER; A.; DANGANAN; C.E.; XUN; L.;CHAKRABARTY; A.M.; HENDRICKSON; W. Genes for 2;4;5-Trichlorophenoxyacetic Acid Metabolism in *Burkholderia cepacia* AC1100: Characterization of the *tftC* and *tftD* Genes and Locations of the *tft* Operons on Multiple Replicons. **Applied and Environmental Microbiology**; Washington; v.64; n.6; p.2086-2093; 1988.

IRSCHIK, H.; SCHUMMER, D.; GERTH, K.; HOFLE, G.; REICHENBACH, H. The tartrolons, new boron-containing antibiotics from a myxobacterium, *Sorangium cellulosum*. **The Journal of Antibiotics**; Tokyo; v. 48; p.26–30; 1995.

JESUS, E. C.; MARSH, T. L.; TIEDJE, J. M.; MOREIRA, F. M. S. Changes in land use alter structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **The ISME Journal Heteren**; p. 1-8; 2009.

JOG, R., NARESHKUMAR, G., RAJKUMAR, S. Plant growth promoting potential and soil enzyme production of the most abundant *Streptomyces* spp. from wheat rhizosphere. **Journal of Applied Microbiology**; Oxford; v. 113; p. 1154-1164; 2012.

KANG; K.S. ; COTTRELL; I.W. Polysaccharides.In: PEPPLER; H.J.; PERLMAN; D.(Ed.). **Microbial Technology**; New York:Academic Press; 1979. 417p.

KAVAMURA, V. N.; TAKETANI, R. G., LANÇONI, M. D., ANDREOTE, F. D., MELO, I. S de. Water Regime Influences Bulk Soil and Rhizosphere of *Cereus jamacaru* Bacterial Communities in the Brazilian Caatinga Biome. **PLOS ONE**; San Francisco; v. 8; n. 9; e73606; 2013.

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

KÖBERL; M.; RAMADAN; E.M.; ADAM; M.; CARDINALE; M.; HALLMANN; J.; HEUER; H.; SMALLA; K.; BERG; G. *Bacillus* and *Streptomyces* were selected as broad-spectrum antagonists against soilborne pathogens from arid areas in Egypt. **FEMS Microbiology Letters**; Amsterdam;v.342; n.2; p. 168-178; 2013.

LAIZ; L.; MILLER; A.Z.; JURADO; V.; AKATOVA; E.; SANCHEZ-MORAL; S.; GONZALEZ; J.M.; DIONÍSIO; A.; MACEDO; M.F.; SAIZ-JIMENEZ; C. Isolation of five *Rubrobacter* strains from biodeteriorated monuments. **Naturwissenschaften**; Berlin; v.96; p.71-79; 2009.

LAKSHMI; K.V.N.S.; SASIKALA; Ch.; RAMANA; Ch. V. *Rhodoplanes pokkaliisoli* sp. nov.; a phototrophic alphaproteobacterium isolated from a waterlogged brackish paddy soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**; Reading; v.59; p.2153–2157; 2009.

LEAL; I.R.; TABARELLI; M.; SILVA; J.M.C. da. **Ecologia e conservação da caatinga**. 2.ed. Recife: Ed. Universitária da UFPE; 2005. 822p.

LEE; S.; BOLLINGER; J.; BEZDICEK; D.; OGRAM; A. Estimation of the Abundance of an Uncultured Soil Bacterial Strain by a Competitive Quantitative PCR Method. **Applied and Environmental Microbiology**; Washington, v.62; n.10; p.3787-3793; 1996.

LE HOUEROU, H. N. Climate change, drought and desertification. **Journal of Arid Environments**; London; n. 34; p.133–185; 1996.

LEHOURS; A.C.; BARDOT; C.; THENOT; A.; DEBROAS; D.; FONTY; G. Anaerobic microbial communities in Lake Pavin; a unique meromictic lake in France. **Applied and Environmental Microbiology**; Washington; v. 71; n. 11; p. 7389-7400; 2005.

LESTER; E.D.; SATOMI; M.; PONCE; A. Microflora of extreme arid Atacama Desert soils. **Soil Biology & Biochemistry**; Elmsford; v.39; p.704-708; 2007.

LIESACK; W.;STACKEBRANDT; E. Occurrence of novel groups of the domain *Bacteria* as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. **Journal of Bacteriology**. Washington; v.174; p. 5072–5078; 1992.

LINDBERG, N.; BENGTSSON, J.; PERSSON, T. Effects of experimental irrigation and drought on the composition and diversity of soil fauna in a coniferous stand. **Journal of Applied Ecology**; Oxford; v. 39; p. 924–936; 2002.

LIU, L.; LI, Y.; LI, S.; HU, N.; HE, Y.; PONG, R.; LIN, D.; LU, L.; LAW, M. Comparison of Next-generation sequencing systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**; v. 2012; 11p.; 2012.

LIU, W-T, T MARSH, H CHENG, AND L FORNEY. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphism of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**; Washington;. v. 63; p. 4516- 4522; 1997.

LIU; W.; ZHANG; Z.; WAN; S. Predominant role of water in regulating soil and microbial respiration and their responses to climate change in a semiarid grassland. **Global Change Biology**; Oxford, n. 15; p. 184–195; 2009.

LOCEY, K. J. Synthesizing traditional biogeography with microbial ecology: the importance of dormancy. **Journal of Biogeography**; Oxford; v. 37; p. 1835–1841; 2010.

LUDWIG, W.; STRUNK, O.; WESTRAM, R.; RICHTER, L.; MEIER, H.; YADHUKUMAR; BUCHNER, A.; LAI, T.; STEPPI, S.; JOBB, G.; FÖRSTER, W.; BRETTSCHE, I.; GERBER, S.; GINHART, A.W.; GROSS, O.; GRUMANN, S.; HERMANN, S.; JOST, R.; KÖNIG, A.; LISS, T.; LÜßMANN, R.; MAY, M.; NONHOFF, B.; REICHEL, B.; STREHLOW, R.; STAMATAKIS, A.; STUCKMANN, N.; VILBIG, A.; LENKE, M.; LUDWIG, T; BODE, A.; SCHLEIFER; KH. ARB: a software environment for sequence data. **Nucleic Acids Research**; Oxford; . v. 32; n. 4; p.1363-1371; 2004.

LYNCH, J.; HOBIE, J. E. Micro-organisms action: concepts and applications in microbial ecology. Blackwell, Oxford; 2ed.; 1988.

MacELROY; R.D. Some comments on the evolution of extremophiles. **Biosystems**; Limerick; v. 6; p. 74-75; 1974.

MADIGAN; M.T.; MARTINKO; J.M.; DUNLAP; P.V.; CLARK; D.P. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: ArtMed; 2010; 1160p.

MARSHALL, B. J.; ARMSTRONG, J. A.; FRANCIS, G. J.; NOKES, N. T.; WEE, S. H. Antibacterial action of bismuth in relation to *Campylobacter pyloridis* colonization and gastritis. **Digestion**; Basel; v. 37(Suppl. 2); p. 16–30; 1987.

MARTINY, J. B. H., BOHANNAN, B. J. M.; BROWN, J. H.; COLWELL, R. K.; FUHRMAN, J. A.; GREEN, J. L.; HORNER-DEVINE, M. C.; KANE, M.; KRUMINS, J. A.; KUSKE, C. R.; MORIN, P. J.; NAEEM, S.; ØVREAS, L.; REYSENBACH, A.;

SMITH, V. H.; STALEY, J. T. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. **Nature Reviews**; London; v. 4; p. 102–112; 2006.

MARULANDA; A. ;BAREA; J.; AZCÓN; R. Stimulation of Plant Growth and Drought Tolerance by Native Microorganisms (AM Fungi and Bacteria) from Dry Environments: Mechanisms Related to Bacterial Effectiveness. **Journal of Plant Growth Regulation**; New York; v.28; p.115-124; 2009.

MEDZKER; M.L. Sequencing Technologies: the next generation. **Nature Reviews Genetics**; London; n.11; p.31-46; 2010.

MELO; A.S. ; HEPP; L.U. Ferramentas estatísticas para analyses de dados provenientes de biomonitoramento. **Oecologia Brasiliensis**; Rio de Janeiro, v. 12; n. 3; p. 463-486; 2008.

MENDES, L. W. Análise molecular das estruturas e diversidade de comunidades microbianas em solo de manguezal preservado da Ilha do Cardoso-SP. 2009. Dissertação (Mestrado), Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MENDES, R.; KRUIJT, M.; BRUIJN, I. de; DEKKERS, E.; VAN DER VOORT, M.; SCHNEIDER, J. H. M.; PICENO, Y. M.; DESANTIS, T. Z.; ANDERSEN, G. L.; BAKKER, P. A. H. M.; RAAIJMAKERS, J. M. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science**; New York; v. 332; p. 1097-1100; 2011.

MORAGA; N.B.; POMA; H.R.; AMOROSO; M.J.; RAJAL; V.B. Isolation and characterization of indigenous *Streptomyces* and *Lentzeastrains* from soils containing boron compounds in Argentina. **Journal of Basic Microbiology**; Berlin, 2012. DOI: 10.1002/jobm.201200714.

MORAN; M.A. Metatranscriptomics: eavesdropping on complex microbial communities. **Microbes**; Paris; v.4; n.7; p.329-335; 2009.

MUTHAMIA; J.M.; RAVICHANDRA; N.G. Effect or root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*); *Fusarium oxysporum.sp.lycopersici* and *Ralstonia solanacearum* wilt complex on uptake of essential minerals (NPK) in tomato. **Mysore Journal of Agricultural Sciences**; Karnataka; v.46; n.1; p.186-188; 2012.

NIELSEN, U. N.; OSLER, G. H. R.; CAMPBELL, C. D.; BURSLEM, D. F. R. P.; VAN DER WAL, R. The influence of vegetation type, soil properties and precipitation on the composition of soil mite and microbial communities at the landscape scale. **Journal of Biogeography**; Oxford; n. 37, p. 1317-1328, 2010.

NOZELA; E.F. **Valor Nutricional De Espécies Arbóreo-Arbustivas nativas da caatinga e utilização de tratamentos físico-químicos para redução do teor de taninos**. 2006. 99p. Tese (Doutorado na área de) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura; Universidade de São Paulo; Piracicaba; 2006.

O'MALLEY, M. A. 'Everything is everywhere: but the environment selects': ubiquitous distribution and ecological determinism in microbial biogeography. **Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences**; v. 39; p. 314–325; 2008.

O'NEILL, M.; EBERHARD, S.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for Arabidopsis growth. **Science**; New York; v. 294; p. 846–849; 2001.

OCHSENREITER, T.; SELEZI, D.; QUAISER, A.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, L.; SCHELPER, C. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. **Environmental Microbiology**; Oxford; v. 7; n.12; p.1967–1984; 2003.

PEARSON; K. On Lines and Planes of Closest Fit to Systems of Points in Space. **Philosophical Magazine**; London; v.2; n.6; p.559–572; 1901.

PEDRO-ALIÓS, C. Marine microbial diversity: can it be determined? **Trends in Microbiology**; Cambridge; v. 14; p. 257–263; 2006.

PETROSINO; J.F.; HIGHLANDER; S.; LUNNA; R.A.; GIBBS; R. A.; VERSALOVIC; J. Metagenomics pyrosequencing and microbial identification. **Clinical Chemistry**; Baltimore, v.55; n.5; p.856-866; 2009.

PHILIPPOT; L.; HALLIN; S. Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, [S.I.]; v. 8; n. 3; p. 234-239; Jun 2005.

POINTING, S. B.; BELNAP, J. Microbial colonization and controls in dryland systems. **Nature Reviews**; London; v. 10; p. 551-562; 2012.

PRESS; F; SIEVER R.; GROTZINGER; J.; JORDAN; T.H. **Para Entender a Terra**. Tradução Rualdo Menegat; 4 ed. Porto Alegre: Bookman; 2006. 656 p.

QAZI; J.I. Biotechnological potential and conservatory of extremophiles from climatically wide ranged developing countries: Lesson from Pakistan. **Critical Reviews in Microbiology**; Boca Raton; v.39; n.1; p.1-8; 2013.

QIN; S.; LI; J.; CHEN; H.H.; ZHAO; G.Z.; ZHU; W.Y.; JIANG; C.L.; XU; L.H.; LI; W.J. Isolation; diversity; and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna; China. **Applied Environmental Microbiology**; Washington; v.75; n.19; p. 6176-6186; 2009.

QUAISER A; ;OCHSENREITER T; ;LANZ C; SCHUSTER, S.C.; TREUSCH, A.H.; ECK, J.; SCHLEPER, C. Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. **Molecular Microbiology**; Salem; v.50; n.2; p. 563–575; 2003.

QUAN, C.S.; ZHENG, W.; LIU, Q.;OHTA, Y.; FAN, S.D. Isolation and characterization of a novel *Burkholderia cepacia* with strong antifungal activity against *Rhizoctonia solani*. **Applied Microbiology and Biotechnology**; Berlin; v.72; n.6; p. 1276-1284; 2006.

QUEIROZ; L.P. **Leguminosas da Caatinga**. Feira de Santana:Universidade Estadual de 2006. . 913p.

QUISPEL, A. Lourens GM Baas Becking (1985–1963). Inspirator for many (micro)biologists. **International Microbiology**; v.1; p.69–72; 1998.

RAMACHANDRAN; P.V. Focusing on boron in medicinal chemistry. **Future Medical Chemistry**; v.5; n.6; p.611-612; 2013.

RAYMOND; J. SIEFERT, J.L., STAPLES, C.R.; BLANKENSHIP, R.E. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**; Chicago, [S.l.]; v. 21; n. 3; p. 541-554; Mar 2004.

REIS JUNIOR; F.B. dos; MENDES; I C.; TEIXEIRA; K.R.S.; REIS; V.M. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo**. Planaltina; DF: Embrapa Cerrados; 2002. p.33.

REIS JUNIOR; F.B. dos; FARIA; S.M. de; MENDES; I. de C.; SIMON; M.F.; LOUREIRO; M. de F.; ELLIOT; G.N.; YOUNG; P.; SPRENT; J.I.; JAMES; E.K. "Beta-rizóbios": os novos simbiossitos encontrados em espécies de *Mimosa*. Local:Embrapa; 2006. 20p. Documentos/Embrapa Cerrado.

RIESENFELD; C.S.; SCHLOSS; P.D.; HANDLESMAN; J. Metagenomics: genomic analysis os microbial communities. **Annual Reviews of Genetics**; Palo Alto; n.38; p.525-552; 2004.

RINNAN, R.; MICHELSEN, A.; BÅÅTH, E.; JONASSON, S. Fifteen years of climate change Manipulations alter soil microbial communities in a subarctic heath ecosystem. **Global Change Biology**; v. 13; p. 28–39; 2007.

RODRIGUES; A.C.; ANTUNES; J.E.L.; COSTA; A.F. da; OLIVEIRA; J. de P.; FIGUEIREDO; M. do V.B. Interrelationship of *Bradyrhizobium* sp. and Plant Growth-Promoting Bacteria in Cowpea: Survival and Symbiotic Performance. **Journal of Microbiology**; London, v. 51; n. 1; p. 49–55; 2013.

RONAGHI; M. Pyrosequencing shed lighth on DNA sequencing. **Genome Research**; Cold Spring Harbor; n.11; p.3-11; 2001.

ROSSETI; M.L.R.; VALIM; A.R.M.; SILVA; M.S.N.; RODRIGUES; V.S. Tuberculose resistente: revisão molecular. **Revista de Saúde Pública**; São Paulo; v.36; n.4; p. 525-532; 2002.

ROTTTHAUWE; J.H. WITZEL, K.P., AND LIESACK, W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. **Applied and Environmental Microbiology**; Washington, [S.l.]; v. 63; n. 12; p. 4704-4712; Dec 1997.

ROUGHLEY; R.J.; GEMELL; L.G.; THOMPSON; J.A.; BROCKWELL; J. The number of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) applied to seed and its effect on rhizosphere colonization; nodulation and yield of lupin. **Soil Biology and Biochemistry**; Elmsford; v. 25; n.10; p. 1453-1458; 1993.

SANGER; F.; DONELSON; J.E.; COULSON; A.R.; KÖSSEL; H.; FISCHER; D. Use of DNA Polymerase I Primed by a Synthetic Oligonucleotide to Determine a Nucleotide Sequence in Phage f1 DNA. **PNAS**; Washington; v.70; n.4; p.1209-1213; 1973.

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

SANTHANAM; R.; OKORO; C.K.; RONG; X.; HUANG; Y.; BULL; A.T.; ANDREWS; B.A.; ASENJO; J.A.; WEON; H.-Y.; GOODFELLOW; M. *Streptomyces deserti* sp. nov.; isolated from hyper-arid Atacama desert soil. **Antonie van Leeuwenhoek**; Wageningen; v. 101; p. 575-581; 2012.

SANTOS, S.N.; KAVAMURA, V.N.; SILVA, J.L.; MELO, I.S.; ANDREOTE, F.D. Plant growth promoter rhizobacteria in plants inhabiting harsh tropical environments and its role in agricultural improvements. In: MAHESHWARI, D.K. (Ed.). **Plant Growth and Health Promoting Bacteria**, Berlin: Springer-Verlag, 2011. p. 251-272. (Microbiology Monographs 18).

SANTOS; V.C.P. dos. **Atividade antibacteriana de *Burkholderia* spp. Endofíticas e da rizosfera de cana de açúcar**. 2010. 114p. Tese (Doutorado na área de) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”; Universidade de São Paulo; Piracicaba; 2010.

SCHIMEL; J.; BALSER; T.C.; WALLENSTEIN; M.D. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. **Ecology**; Tempe; n. 88; p. 1386-1394; 2007.

SCHLOSS; P.D.; WESTCOTT, S.L.; RYABIN, T.; HALL, J.R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E.B.; LESNIEWSKI, R.A.; OAKLEY, B.B.; PARKS, D.H.; ROBINSON, C.J.; SAHL, J.W.; STRES, B.; THALLINGER, G.G.; VAN HORN, D.J.; WEBER, C.F. Introducing mothur: Open-source; platform-independent; community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied Environmental Microbiology**; Washington; v. 75; n. 23; p. 7537-41; 2009. 108.

SEAGER, R.; TING, M.; HELD, I.; KUSHNIR, Y.; LU, J.; VECCHI, G.; HUANG, H. P.; HARNIK, N.; LEETMAA, A.; LAU, N. C.; LI, C.; VELES, J.; NAIK, N. Model of an imminent transition to a more arid climate in southwestern North America. **Science**; New York; v. 316; n. 5828; p. 1181–1184; 2007.

SERVAIS, P.; CASAMAYOR, E. O.; COURTIES, C.; CATALA, P.; PARTHUISOT, N.; LEBARON, P. Activity and diversity of bacterial cells with high and low nucleic acid content. **Aquatic Microbial Ecology**; New York; v.33; p. 41–51; 2003.

SHAKIR; M.A.; BANO; A.; ARSHAD; M. Rhizosphere bacteria containing ACC-deaminase conferred drought tolerance in wheat grown under semi-arid climate. **Soil Environmental**; Dordrecht; v.31; n.1; p. 108-112; 2012.

SHEPARD; R.N. Metric structures in ordinal data. **Journal of Mathematical Psychology**; New York; v.3; n.2; p.287–315; 1966.

SHOKRALLA, S.; SPALL, J. L.; GIBSON, J. F.; HAJIBABAEI, M. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. **Molecular ecology**; LOCAL; n. 21; p. 1794-1805; 2012.

SINGH; B.K.; NAZARIES; L.; MUNRO; S.; ANDERSON; I.C.; CAMPBELL; C.D. Use of Multiplex Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism for Rapid and Simultaneous Analysis of Different Components of the Soil Microbial Community. **Applied and Environmental Microbiology**; Washington; v.72; n.11; p. 7278-7285; 2006.

SOGIN; M.L.; MORRISON; H.G.; HUBER; J.A.; WELCH; D.M.; HUSE; S.M.; NEAL; P.R.; ARRIETA; J.M.; HERNDL; G.J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". **PNAS**; Washington, v. 103; n.32; p.12115-12120; 2006.

STARK, J. M.; FIRESTONE, M. K. Mechanisms for soil-moisture effects on activity of nitrifying bacteria. **Applied Environmental Microbiology**. v. 61; p. 218–221; 1995.

STEVENSON, F.J.; COLE, M.A. Cycles of soil: Carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients. 2.ed. New York, John Wiley & Sons, 1999. 427p.

SUTHERLAND; I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**; Amsterdam; n. 16; p.41–46; 1998.

THATCHER, R. A proposed classification of the chemical elements with respect to their function in plant nutrition. **Science**; New York; v. 79; p.463–466; 1934.

TEIXEIRA; F.C.P.; BORGES; W.L.; XAVIER; G.R.; RUMJANEK; N.G. Characterization of indigenous rhizobia from Caatinga. **Brazilian Journal of Microbiology**; São Paulo; v. 41; p. 201-208; 2010.

TEIXEIRA; W.; TOLEDO; M.C.M. de; FAIRCHILD; T.R.; TAIOLI; F. (Org.). **Decifrando a Terra**. São Paulo: Oficina de Textos; 2000. 568 p.

TERATO; H.; SUZUKI; K.; NISHIOKA; N.; OKAMOTO; A.; SHIMAZAKI-TOKUYAMA; Y.; INOUE; Y.; SAITO; T. Characterization and Radio-resistant Function of Manganese Superoxide Dismutase of *Rubrobacter radiotolerans*. **Journal of Radiation Research**; Tokyo; v.52; n.6; p. 735-742; 2011.

TOLEDO; K. Quinto relatório IPCC mostra intensificação das mudanças climáticas. **Agência Fapesp**. Disponível em:<agencia.fapesp.br/17944>. Acesso em: 29 de set 2013. 109.

URBAN; D. L. **Spatial Analysis in Ecology: Mantel's Test**. 2003. Disponível em: <<http://www.nceas.ucsb.edu/files/scicomp/Dloads/SpatialAnalysisEcologists/SpatialEcologyMantelTest.pdf>>. Acesso em: 25 de janeiro de 2012.

VANDAMME; P.; COENYE; T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**; Reading; v.54; p. 2285-2289; 2004.

VANDAMME; P.; DAWYNDT; P. Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: Past; present and future. **Systematic and Applied Microbiology**; Stuttgart; v.34; p. 87-95; 2011.

VEBLEN; T.T.; YOUNG; K.R.; ORME; A.R. **The physical geography of South America**. New York:Oxford University Press: 2007. p.380.

VIEIRA, R. P.; CLEMENTINO, M. M.; CARDOSO, A. M.; OLIVEIRA, D. N.; ALBANO, R. M.; GONZALEZ, A. M.; PARANHOS, R.; MARTINS, O. B. Arquéal communities in a tropical estuarine ecosystem: Guanabara Bay, Brazil. **Microbial Ecology**. v. 54; n. 3; p.460–468. 2007.

WANI; P.A.; KHAN; M.S.; ZAIDI; A. Effect of metal tolerant plant growth promoting *Bradyrhizobium* sp. (vigna) on growth; symbiosis; seed yield and metal uptake by greengram plants. **Chemosphere**; Oxford; v. 70; p. 36-45; 2007.

WARD; N.L.; CHALLACOMBE; J.F.; JANSSEN; P.H.; HENRISSAT; B.; COUTINHO; P.M.; HENRISSAT, B.; 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 Acidobacteria genomes provide a first glimpse of their lifestyles in soils and sediments. **Applied and Environmental Microbiology**; Washington, v.75; p.2046–2056; 2009.

WEBER; K.A.; ACHENBACH; L.A.; COATES; J.D. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. **Nature Reviews**; London; v.4; p.752-764; 2006.

WIEHLMANN; L.; WAGNER; G.; CRAMER; N.; SIEBERT; B.; GUDOWIUS; P.; MORALES; G.; KO; T.; DELDEN; C.; WEINEL; C.; SLICKERS; P.; TU; B. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; cidade; v.104; p. 8101–8106; 2007.

WILLIAMS; M.A.; RICE; C.W. Seven years of enhanced water availability influences the physiological; structural; and functional attributes of a soil microbial community. **Applied Soil Ecology**; Amsterdam; n. 35; p. 535-545; 2007.

WHITTAKER, R. H. Evolution and Measurement of Species Diversity. **TAXON**; LOCAL; v. 21; n.2/3; p. 213-251; 1972.

YAO; H.; GAO; Y.; NICOL; G.W.; CAMPBELL; C.D.; PROSSER; J.I.; ZHANG; L.; HAN; W.; SINGH; B.K. Links between Ammonia Oxidizer Community Structure; Abundance; and Nitrification Potential in Acidic Soils. **Applied and Environmental Microbiology**; Washington; v.77; n.13; p. 4618-4625; 2011.

YAIR, A.; VESTE, M.; ALMOG, R.; BRECKLE, S. W. Sensitivity of a sandy area to climate change along a rainfall gradient at a desert fringe. **Arid Dune Ecosystems – The Nizzana Sands in the Negev Desert, Ecological Studies Series**. Berlin; v. 200; p.425–440; 2008.

ZENOVA; G.M.; KURAPOVA; A.I.; LYSENKO; A.M.; ZVYAGINTSEV; D.G. The Structural–Functional Organization of Thermotolerant Complexes of Actinomycetes in Desert and Volcanic Soils. **Soil Biology**; Paris; n.5; p.575-580; 2009.

ZHANG, W.; PARKER K. M.; LUO, Y.; WAN, S.; WALLACE, L. L.; HU, S. Soil microbial responses to experimental warming and clipping in a tallgrass prairie. **Global Change Biology**; Oxford; v. 11; p. 266–277; 2005.

ZHANG; H.; MURZELLO; C.; SUN; Y.; KIM; M.; XIE; X.; JETER; R.M.; ZAK; J. C.; DOWD; S.E.; PARÉ; P.W. Choline and osmotic-stress tolerance induced in *Arabidopsis* by the soil microbe *Bacillus subtilis* (GB03). **Molecular Plant-Microbe Interactions**; Saint Paul; v.23; n.8; p. 1097-1104; 2010.

ZOLLA; G.; BADRI; D.V.; BAKKER; M.G.; MANTER; D.K.; VIVANCO; J.M. Soil microbiomes vary in their ability to confer drought tolerance to *Arabidopsis*. **Applied Soil Ecology**; Amsterdam; v.68; p. 1-9; 2013.

ANEXOS

ANEXO A: Gráfico da Análise de Agrupamento com Paired-group e distância Euclidiana

ANEXO B: Valores de *forward selection* com permutação de Monte Carlo de CCA de bactéria

Variável	Efeitos Condicionais		
	LambdaA	P	F
Zn	0.21	0.002	3.34
P	0.16	0.002	2.51
Ca	0.16	0.002	2.65
Mn	0.09	0.008	1.52
M.O.	0.07	0.060	1.33
V.	0.08	0.082	1.29
H+Al	0.07	0.160	1.21
Cu	0.07	0.056	1.28
Fe	0.08	0.130	1.27
Mg	0.09	0.010	1.56
CTC	0.08	0.030	1.43
S.B.	0.05	0.438	1.02
B	0.05	0.780	0.86
K	0.05	0.904	0.74
pH	0.04	0.940	0.72

ANEXO C: Valores de *forward selection* com permutação de Monte Carlo de CCA de Arquéias

Variável	Efeitos condicionais		
	LambdaA	P	F
K	0.13	0.018	1.36
B	0.13	0.018	1.33
Zn	0.12	0.118	1.20
P	0.11	0.180	1.15
M.O.	0.11	0.226	1.12
H+Al	0.10	0.406	1.03
Fe	0.10	0.278	1.09
Mn	0.10	0.460	1.02
pH	0.08	0.860	0.82
Cu	0.10	0.340	1.07
V.	0.10	0.436	1.00
Mg	0.11	0.200	1.16
CTC	0.11	0.240	1.16
S.B.	0.08	0.838	0.81
Ca	0.06	0.982	0.59

ANEXO D: Valores de *forward selection* com permutação de Monte Carlo de CCA de AOA

Variável	Efeitos condicionais		
	LambdaA	P	F
Zn	0.10	0.022	1.89
M.O.	0.09	0.014	1.69
K	0.07	0.044	1.44
CTC	0.07	0.080	1.40
Ca	0.09	0.014	1.79
B	0.07	0.220	1.25
Cu	0.04	0.536	0.97
V.	0.07	0.172	1.27
Mn	0.05	0.526	0.97
H+Al	0.05	0.488	1.01
Fe	0.04	0.606	0.89
Mg	0.05	0.564	0.94
pH	0.04	0.644	0.86
P	0.04	0.874	0.69
S.B.	0.03	0.930	0.58

ANEXO E: Tabela com valores de ANOSIM para os três perfis amostrados

	R	p-value
Bacteria		
Estação	0.400	0.001
Espécie de planta	0.017	0.180
Ponto	0.120	0.001
Arquéia		
Estação	0.092	0.005
Espécie de planta	0.028	0.093
Ponto	0.031	0.119
AOA*		
Estação	0.272	0.001
Espécie de planta	0.004	0.343
Ponto	0.014	0.273

*Arquéias oxidadoras de amônia

ANEXO F: Análise Network mostrando as correlações ($p < 0,01$) entre as classes bacterianas encontradas ($>1\%$) nos cinco pontos de coleta no período de Seca para ambas as plantas.

ANEXO G: Análise Network mostrando a correlação ($p < 0,01$) entre as classes bacterianas encontradas ($> 1\%$) nos 5 pontos no período de Chuva.

ANEXO H: Análise Network mostrando a correlação ($p < 0,01$) entre as classes bacterianas encontradas ($> 1\%$) e os atributos do solo nos 5 pontos nos períodos de Chuva e Seca.

ANEXO I: Tabela com os índices de diversidade de Shannon e Simpson aplicados para as 40 amostras.

Amostras	Shannon (H)	Simpson(1-D)	Amostras	Shannon (H)	Simpson (1-D)
M11ch	1.703	0.5611	M11sc	1.687	0.6567
M12ch	1.398	0.4767	M12sc	1.265	0.4523
M21ch	1.277	0.4414	M21sc	1.23	0.4135
M22ch	1.474	0.6131	M22sc	0.9302	0.3162
M31ch	0.8042	0.2577	M31sc	1.468	0.4633
M32ch	1.133	0.3411	M32sc	1.391	0.4408
M41ch	1.227	0.3582	M41sc	1.202	0.4408
M42ch	1.149	0.3459	M42sc	1.372	0.4754
M51ch	1.408	0.4193	M51sc	1.768	0.5473
M52ch	1.483	0.4849	M52sc	1.217	0.4277
S11ch	1.7	0.5674	S11sc	1.466	0.5039
S12ch	1.865	0.6112	S12sc	1.576	0.5667
S21ch	1.388	0.5238	S21sc	1.327	0.4138
S22ch	1.069	0.3839	S22sc	1.258	0.4247
S31ch	1.006	0.3093	S31sc	1.329	0.4357
S32ch	1.348	0.4696	S32sc	1.172	0.374
S41ch	0.9112	0.2713	S41sc	1.095	0.3521
S42ch	0.9937	0.3262	S42sc	1.304	0.4233
S51ch	1.382	0.453	S51sc	1.235	0.4093
S52ch	0.931	0.3013	S52sc	1.183	0.3709

ANEXO J: Heatmaps comparando os índices de dissimilaridade A – Jaccard e B – thetaYC. Cada quadrado dentro do heatmap representa um única comparação par-a-par entre a amostra correspondente. Como indicado na legenda, comunidades mais dissimilares são mais vermelhas e comunidades mais similares são menos vermelhas. A ordem das amostras é a mesma apresentada na Tabela 3.