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

**Variações das estruturas das comunidades de bactérias e fungos
em Espodossolos sob diferentes regimes de drenagem**

Elisa Rabelo Matos

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2015**

Elisa Rabelo Matos
Bacharel em Ciências Biológicas

**Variações das estruturas das comunidades de bactérias e fungos em
Espodossolos sob diferentes regimes de drenagem**
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2015

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

Matos, Elisa Rabelo

Variações das estruturas das comunidades de bactérias e fungos em Espodossolos sob diferentes regimes de drenagem / Elisa Rabelo Matos. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.
155 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Podzol 2. Matéria orgânica 3. Sequenciamento MiSeq rRNA 16S 4. Sequenciamento
5. Pirólise 6. Lignina I. Título

CDD 630.46
M433v

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

*À mamãe Maria Olínda, papai José Domingos,
meus irmãos Emília e Eduardo,
cunhados Vinícius e Cristiane,
meu namorado Gustavo
e minhas sobrinhas Manuela, Livia e Marina
pelo amor incondicional, apoio e incentivo pra que tudo isso fosse
possível,
DEDICO.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais, pela orientação, incentivo e confiança durante todo o tempo do mestrado e doutorado.

Ao programa de Microbiologia Agrícola e à Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP) pela oportunidade de crescimento profissional e por fornecer estrutura para realização do trabalho.

À FAPESP pela bolsa concedida por três anos de curso e auxílio financeiro para desenvolvimento do projeto; ao CNPq, pela bolsa concedida nos meses iniciais do curso.

Ao Prof Pablo Vidal Torrado e Peter Buurman pelas valiosas sugestões e contribuições no trabalho, pela amizade e ajuda nas coletas de campo.

Ao Prof. Dr. Jorge Rodrigues (The University of Texas at Arlington - UTA) pelo acolhimento no laboratório durante os 9 meses do meu estágio no exterior em Arlington, pelos ensinamentos, pelas contribuições e discussões, pelos momentos agradáveis e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Fernando Andreote, Dr. Adriano Lucheta e Prof. Dra. Brigitte Feigl pelas valiosas sugestões durante o exame de qualificação.

Aos funcionários Denise Mescolotti, Luis Fernando e Wladimir Rosignolo pela amizade e disponibilidade de sempre nos experimentos em laboratório.

Aos colegas da UTA e de Arlington: Nitzy Peakkai, Luiz Velazquez, Malini Kotak, Madhu Rani, Fabio Soares, Wadud Khan, Dora Avramovich, Paula Rodrigues, Cleverson Mattioli, Debanjana Roy, Shweta Panchal, Jill Castoe, Morgan Niewinski, Alycia H. e Tiffany Besett por me acolherem tão bem e que me ajudarem tanto no trabalho quanto em minha adaptação em Arlington, TX. Thank you all!

À amiga e companheira de trabalho Josiane Lopes por estar sempre disponível, pela ajuda no trabalho, pela companhia nas coletas, momentos de risadas e amizade acima de tudo! Muito obrigada!

Ao Leandro Nascimento e Victor Pyro pelo auxílio e sugestões nas análises de bioinformática.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Molecular, aos que ainda estão, aos que já concluíram seus trabalhos: Rafael Armas, Kelly Justin, Sandra Montenegro, Eder dos Santos, Alice Cassetari, Vivian Carvalho, Miguel Zelaya, Paula Pafetti, Felipe Bozza, Felipe Del Lama em especial Silvia Barrera, Adriano Lucheta, Rafael Valadares, Gisele Nunes, Giselle Fracetto, pela disponibilidade de sempre, amizade, ajuda nas análises, coletas e sugestões.

Aos meus pais Maria Olinda, José Domingos, aos irmãos Emília e Eduardo, meus cunhados Vinícius e Cristiane e minhas sobrinhas Manuela, Lívia e Marina, que foram meus maiores presentes durante o doutorado, por todo amor dedicado e palavras de incentivo em momentos difíceis. Amo vcs!

Ao Gustavo, por se fazer presente todo momento mesmo à distância, pelo carinho, paciência e amor que sempre me dedicou. E à família Lima Milani por me acolherem tão bem há tantos anos!

Aos amigos da pós-graduação e de Piracicaba: Adriano Lucheta, Gisele Nunes, Giselle Fracetto, Rafael Valadares, Silvia Barrera, Paulo Roger, Luciano França, Maísa Heluany, Felipe Cury, Emiliana Romagnoli, Júlia Lima, Juliana Eschholz, Maryeimy Varon, Bruna Oliveira, André Mazzetto, Myllene Pinheiro, Marcelo Vaz, Ana Paula Andreote, Ligia Leite, Tatiane Beloni, Layanne Souza, Vivian Carvalho, Fabiana Mingossi, Michele Silva, Jessica Nora, Fabio Paulino, Danilo Tosta, Monise Christofolletti, Nil Mayolo, Leticia Terashima, Jacqueline Azevedo, Aloísio Coelho e Antonio Bianchi. Meu muito obrigada por fazerem meus dias em Piracicaba mais leves e mais divertidos!

Aos amigos que me acolheram em Arlington e foram minha família “brasileira” nos EUA: Paula Rodrigues, Cleverson Mattioli, Eduardo Costa e Maressa Dolzan. Meus sinceros agradecimentos por tudo o que significam pra mim, pelos momentos vividos, risadas, pizzas, jantares, encontros e viagens! Vocês fizeram toda a diferença e conquistaram um lugar muito especial em meu coração!

Às meninas da Casa do Seu Heleno Layanne Souza, Fabiana Mingossi, Vívian Carvalho, Tatiane Beloni, Juliana Eschholz, Daiane Fausto, Michele Silva e Jessica Nora, pela amizade, carinho, conselhos, convívio, por serem minha família em Piracicaba. Sem vocês tudo seria mais difícil.

Aos eternos amigos de Poços, Lavras e a turma da Biologia 2003/2 por estarem sempre comigo, pela amizade, força e carinho de sempre.

À minha GRANDE FAMÍLIA Rabelo e Matos por sempre torcerem por mim, pelas mensagens de carinho e força de sempre!

A todos que não foram mencionados, mas que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

“Um dia você entende que o tempo não é inimigo. E que ele é o nosso maior mestre. Que tudo vem na hora que deve vir. Que não adianta espernear nem se esconder da vida. Que a fuga não é a melhor saída. E que no fim das contas a gente sempre acaba agradecendo tudo que passou. Porque o tempo (ah, o tempo!) está sempre ao nosso lado para nos mostrar o que realmente vale a pena.”
Clarissa Corrêa

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO GERAL	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Espodossolos: características e formação	17
2.2 Diversidade genética e funcional da microbiota do solo	22
2.3 Papéis dos micro-organismos na formação de Espodossolos	25
2.4 Hipóteses	29
2.5 Objetivo geral	29
2.5.1 Objetivos específicos	29
Referências	30
3 ESTRUTURA DAS COMUNIDADES E ABUNDÂNCIA DE BACTÉRIAS E FUNGOS EM TRÊS PERFIS DE ESPODOSSOLOS	37
Resumo	37
3.1 Introdução	38
3.2 Material e Métodos	40
3.2.1 Área de amostragem	40
3.2.2 Amostragem	41
3.2.3 Extração de DNA total do solo	44
3.2.4 Quantificação do número de cópias dos genes rRNA 16S e região ITS1 rRNA	45
3.2.5 Análise da estrutura de comunidades de bactérias e fungos	46
3.3 Resultados e Discussão	47
3.3.1 Quantificação de bactérias e fungos	47
3.3.2 Análise da estrutura das comunidades bacterianas por PCR-DGGE	52
3.3.3 Análise da estrutura das comunidades fúngicas por PCR-DGGE	57
3.3.4 Conclusões	61
Referências	63
4 ANÁLISE DA DIVERSIDADE E ESTRUTURA DAS COMUNIDADES BACTERIANAS EM ESPODOSSOLOS ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO MASSIVO DA REGIÃO V4 DO GENE rRNA 16S	67
Resumo	67
Abstract	68
4.1 Introdução	69
4.2 Material e Métodos	70

4.2.1 Local de amostragem	70
4.2.2 Amostragem	71
4.2.4 Análise da matéria orgânica do solo por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e à espectrometria de massa (Pi-CG/EM).....	75
4.2.5 Extração de DNA total do solo	75
4.2.6 Análise da estrutura das comunidades e diversidade de bactérias	75
4.2.7 Análise dos Resultados	77
4.3 Resultados.....	78
4.3.1 Análises Químicas	78
4.3.2 Análise da matéria orgânica do solo por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e à espectrometria de massa (Pi-CG/EM).....	79
4.3.3 Avaliação da diversidade e estrutura das comunidades bacterianas através do sequenciamento massivo da região V4 do generRNA 16S	80
4.3.4 Atributos químicos do solos que podem determinar a estrutura das comunidades bacterianas de Espodossolos.....	94
4.3.5 Compostos orgânicos do solo que podem determinar a estrutura das comunidades bacterianas de Espodossolos.....	99
Referências.....	109
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	119
ANEXOS.....	121

RESUMO

Variações das estruturas das comunidades de bactérias e fungos em Espodossolos sob diferentes regimes de drenagem

Os Espodossolos são os solos de maior ocorrência na planície costeira do litoral do Estado de São Paulo e são caracterizados pela presença de um horizonte espódico (Bh ou Bhm). Poucas são as informações relacionadas à gênese destes solos em regiões tropicais, assim como da composição química da matéria orgânica (MO) nos mesmos e da influência dos micro-organismos em sua formação. É possível que micro-organismos envolvidos na degradação seletiva da MO sejam importantes para a gênese de Espodossolos, como observado anteriormente em Espodossolos de Bertioga e Ilha Comprida. O primeiro estudo teve como objetivo avaliar a variação espacial da estrutura das comunidades e a abundância de bactérias e fungos em três perfis de Espodossolos sob drenagem intermediária, nos diferentes horizontes e nas manchas brancas através de PCR-DGGE e quantificação por qPCR dos genes rRNA 16S de bactérias e ITS de fungos. O segundo estudo teve como objetivo avaliar a variabilidade espacial das comunidades de bactérias nos horizontes e nas manchas brancas de Espodossolos sob três regimes de drenagem, e determinar se a diversidade genética e estrutura das comunidades de bactérias estão associadas à composição molecular da MO nessas regiões, através do sequenciamento massivo da região V4 do gene do rRNA 16S de bactéria e análise de compostos orgânicos por pirólise-GC/MS. As estruturas das comunidades bacterianas, determinada por PCR-DGGE, nos diferentes horizontes de cada perfil foram mais similares entre si do que nos mesmos horizontes em diferentes perfis de Espodossolos. A estrutura das comunidades fungos não apresentou diferenças significativas, independente da localidade do perfil e profundidade dos horizontes. A abundância de cópias do gene rRNA 16S e região ITS, determinada por qPCR, foi maior no horizonte A do que no horizonte Bh, para os três perfis de Espodossolos estudados. Apesar de não haver diferenças significativas na estrutura das comunidades, grupos específicos de bactérias e fungos podem estar envolvidos na degradação seletiva da matéria orgânica nos diferentes horizontes, bem como nas manchas brancas e suas adjacências. A estrutura das comunidades de bactérias, determinada por sequenciamento massivo do gene rRNA 16S, nos horizontes mais superficiais (A e AE) foi distinta daquela observada nos horizontes mais profundos (EB, BE e Bh). Porém, as comunidades bacterianas nas manchas brancas e suas regiões adjacentes foram mais similares entre si, do que em relação as comunidades bacterianas nos horizontes, em todos os perfis analisados, independente do regime de drenagem. Acidobacteria, Proteobacteria e Actinobacteria foram os filos mais abundantes nos solos estudados. Actinobacteria e Alphaproteobacteria mostraram associação positiva com moléculas orgânicas derivadas da pirólise da lignina, as quais foram mais abundantes nos horizontes superficiais (A e AE), enquanto Acidobacteria mostrou associação positiva com compostos mais recalcitrantes encontrados em horizontes mais profundos (Bh), sugerindo um papel específico e diferenciado de cada grupo bacteriano na degradação de compostos orgânicos específicos. Os resultados desses estudos sugerem que grupos bacterianos específicos podem estar envolvidos na gênese de Espodossolos através da degradação de compostos orgânicos específicos em diferentes horizontes.

Palavras-chave: Podzol; Matéria orgânica; Sequenciamento MiSeq rRNA 16S;
Sequenciamento; Pirólise; Lignina

ABSTRACT

Changes in the bacterial and fungal communities structures in Podzols under distinct drainage regimes

Podzols are highly frequent soils in the coastal plains of the São Paulo State, and are characterized by the presence of a spodic horizon (Bh or Bhm). Studies on the pedogenetic processes in Podzols of tropical regions are scarce, as well as studies on the molecular characterization of their organic matter (OM) and on the microorganisms involved in their genesis. It is possible that microorganisms involved in the selective degradation of the soil OM are important for the genesis of Podzols, as previously observed in Podzols of Bertioga and Ilha Comprida. The aim of the first study was to evaluate the spatial variation of the community structure and abundance of bacterial and fungi in the different horizons, bleached mottles and their immediate vicinity of three Podzol profiles under intermediary drainage regime, using PCR-DGGE and qPCR of the bacterial rRNA 16S gene and fungal ITS region. The aim of the second study was to determine the spatial variability of the bacterial communities in the horizons and bleached mottles of Podzols under three drainage regimes, and whether the bacterial genetic diversity and community structure were associated to the molecular OM composition, using high-throughput sequencing of the V4 region of the bacterial 16S rRNA gene and analyses of organic compounds by pyrolysis GC/MS. The structure of bacterial communities, determined by PCR-DGGE, in the different horizons of each soil profile were more similar to each other than in the same horizons of different soil profiles. The fungal community structures did not show significant differences, independent of the soil profile location and horizons depth. Abundance of copies of the bacterial 16S rRNA gene and fungal ITS region, determined by qPCR, was higher in the A horizon than in the Bh horizon, for the three Podzol profiles studied. Even though there were no significant differences in community structures, specific groups of bacteria and fungi may be involved in the selective degradation of organic matter in different horizons, bleached mottles and their immediate vicinity. The bacterial community structures, determined by high-throughput sequencing of the 16S rRNA gene, in the surface horizons (A and AE) were distinct of that in the deeper horizons (EB, BE and Bh). However, the bacterial community structures in the bleached mottles and their immediate vicinity were more similar to each other than to the community structures in the horizons, in all profiles studied, regardless of the drainage regime. Acidobacteria, Proteobacteria and Actinobacteria were the most abundant phyla in the soils studied. Actinobacteria and Alphaproteobacteria showed a positive relationship organic compounds derived from lignin degradation, which were more abundant in the surface horizons (A and AE), whereas Acidobacteria showed a positive relationship with more recalcitrant compounds detected in deeper horizons (Bh), suggesting a specific and distinct roles of each bacterial group in the degradation of specific organic compounds. The results of these studies suggest that specific bacterial groups may be involved in the genesis of Podzols by degrading specific organic compounds in different horizons.

Keywords: Podzol; Organic matter; rRNA 16S Sequencing MiSeq; Sequencing; Pyrolysis; Lignin

1 INTRODUÇÃO GERAL

O ecossistema de restinga é muito importante para a manutenção da vida marinha e terrestre ao longo da costa brasileira. Considerando a sua estrutura e a dinâmica dos processos que garantem o equilíbrio do sistema ecológico, as restingas são especialmente frágeis frente às intervenções antrópicas. Embora protegidos por lei, a pressão pelo uso urbano e agrícola desses ambientes se faz presente em muitos municípios litorâneos brasileiros. Neste contexto, é necessário melhorar o conhecimento sobre o funcionamento desses ecossistemas para garantir um manejo ambiental adequado dos mesmos e evitar sua degradação.

A classe de solos de maior ocorrência sob a mata de restinga são os Espodossolos ou Podzóis. Os processos envolvidos na formação desses solos, genericamente conhecidos como podzolização, têm sido intensivamente estudados desde o final do século XIX. No entanto, esses estudos concentram-se em grande parte no hemisfério norte, sob clima frio ou temperado úmido. Estudos de Espodossolos em climas tropicais e equatoriais são escassos. No Brasil, os estudos sobre a gênese de Espodossolos concentram-se predominantemente na região amazônica (bacia do Rio Negro). Relatos sobre o papel dos micro-organismos na formação de Espodossolos são pontuais.

Com base em estudos de Espodossolos da região sul da Holanda e de Bertioja e Ilha Comprida, tem sido sugerido que a gênese desses solos depende de micro-organismos específicos envolvidos na degradação preferencial de substâncias húmicas ao longo do perfil do solo. A diversidade funcional dos micro-organismos influencia a estabilidade do ecossistema e as diferenças na estrutura da comunidade microbiana refletem a habilidade desses micro-organismos em responder a fatores ambientais e substratos específicos. Porém, a associação de grupos de micro-organismos ou suas atividades com a degradação seletiva da matéria orgânica (MO) em Espodossolos ainda não foi claramente estabelecida.

Assim, a caracterização da diversidade genética da microbiota de Espodossolos e sua relação com as substâncias húmicas em condições distintas de podzolização são essenciais para definir o papel dos micro-organismos na gênese desse tipo de solo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Espodossolos: características e formação

Espodossolos ocorrem em regiões úmidas, principalmente boreais e temperadas e em menor proporção nas regiões tropicais, abrangendo cerca de 485 milhões de hectares em todo mundo (DRIESSEN et al, 2001). No Brasil, os Espodossolos são encontrados principalmente nas planícies litorâneas e em algumas regiões no Norte da Amazônia, totalizando cerca de 14 milhões de hectares (COELHO et al., 2002).

Espodossolos são conhecidos também como Podzóis, termo amplamente utilizado em outros sistemas de classificação para caracterizar solos desenvolvidos a partir de materiais quartzosos, principalmente sedimentos de regiões temperadas e frias do Hemisfério Norte. O termo Podzol, é derivado do russo e significa sob (pod) cinza (zola) (DRIESSEN et al., 2001; SAUER et al., 2007). O processo de formação dos Espodossolos é chamado podzolização e é caracterizado pelo transporte em solução de matéria orgânica (MO) associada a Fe e/ou Al, dos horizontes superficiais aos mais profundos do solo, constituindo as fases de mobilização e de imobilização desses componentes (van BREEMEN; BUURMAN, 2002).

Em geral, pelo menos cinco horizontes podem ser diferenciados em um típico perfil de Espodossolo (Figura 1.1): uma camada superficial com serrapilheira (O e/ou A); seguida de uma outra camada com matéria orgânica rica em minerais (Ah); um horizonte branco iluvial (E); seguido de um horizonte com acúmulo de matéria orgânica (Bh, Bhs ou Bs) e por último uma camada de material de origem rico em quartzo (van BREEMEN; BUURMAN, 2002, BUURMAN; JONGMANS, 2005, SILVA; VIDAL-TORRADO; LAMBAIS, 2014). O horizonte B espódico pode ser classificado, tanto em função dos compostos iluviais dominantes como pelo grau de cimentação, em Bs, Bhs, Bh e Bhm (“ortstein”). O horizonte Bh é caracterizado por ter iluviação dominante de complexos MO-Al, com pouca ou nenhuma evidência de Fe iluvial, já o “ortstein” ou Bhm é caracterizado por sua forma consolidada (EMBRAPA, 2006).

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a formação dos Espodossolos (DE CONINCK, 1980; ANDERSON et al., 1982; LUNDSTRÖM et al.,

2000; BUURMAN; JONGMANS, 2005) no entanto, aspectos como mobilização, migração e acúmulo de MO complexada ou não a metais no horizonte B desses solos e em ambientes tropicais, ainda não estão totalmente elucidados (van HEES; LUNDSTRÖM; GIESLER, 2000).

Buurman e Jongmans (2005) consideram os seguintes paradigmas para os processos de podzolização: (1) metais são transportados do horizonte A para o B como complexos orgânicos; (2) acúmulo de metais no horizonte B ocorre devido à precipitação parcial desses complexos e decomposição microbiológica de carregadores orgânicos; (3) a MO nos horizontes B tem duas origens: a) DOC (carbono orgânico dissolvido) que precipita sob fluxo lateral principalmente do lençol freático (predominantemente em podzóis mal drenados) e b) raízes em decomposição (dominantes em podzóis bem drenados e identificadas como MO polimórfica); (4) aprofundamento do horizonte E através da redissolução da MO e remoção dos íons metálicos de complexos orgânicos da parte superior do horizonte Bh e consequente decomposição da matéria orgânica restante não complexada; (5) decomposição microbiana de compostos orgânicos recalcitrantes na transição entre E e B. Nesse contexto, a microbiota do solo tem papel fundamental, pela decomposição da MO e alteração da solubilidade de metais através da síntese de complexantes orgânicos. A decomposição incompleta da serrapilheira também é uma fonte de agentes complexantes, bem como os exsudatos e produtos de decomposição das raízes de plantas (SAUER et al., 2007). Os diferentes perfis de Espodossolos possuem zonas quimicamente diferentes como os horizontes O e A, E, EB e BE, topo do horizonte Bh e este propriamente dito (Figura 1.1), os quais diferem em cor, textura e consistência. Provavelmente esses diferentes horizontes podem conter diferentes populações de micro-organismos decompositores já que a composição química da MO dos horizontes é distinta (BUURMAN et al., 2005).

Espodossolos podem apresentar manchas brancas empobrecidas em MO, em relação às áreas adjacentes e mais concentradas nos horizontes de transição e mais profundos, como EB, BE e Bh, raramente encontradas em horizontes mais superficiais como A e AE. Buurman e colaboradores (2007) sugerem que essas manchas se desenvolvem pela degradação seletiva da MO por micro-organismos do solo, no entanto, os micro-organismos que participam desse processo ainda não são conhecidos.

Figura 1.1—Perfil típico de Espodossolo. Horizontes identificados A, AE, E, EB, BE, Bh1, Bh2, Bh3. As setas indicam as manchas brancas.

Os horizontes O e A são os locais onde ocorre a decomposição primária da serrapilheira, incluindo as raízes finas da vegetação presente; horizonte E é onde provavelmente toda a MO facilmente decomponível foi removida desses horizontes e a MO remanescente é mais recalcitrante e só pode ser decomposta por grupos específicos de micro-organismos. Em horizontes E com raízes, as fontes primárias de MO são as raízes e seus exsudatos. Nos horizontes EB e BE, as substâncias orgânicas de fácil degradação já foram decompostas, e somente o material mais estável permanece. Por ainda ocorrer decomposição, é provável que exista uma comunidade microbiana ativa. Nesses horizontes não há altos teores de Al ou Fe. No topo do horizonte Bh, os metais são removidos e as substâncias húmicas

acumuladas tornam-se disponíveis para a decomposição (BUURMAN et al., 2005). Os primeiros estágios da decomposição após a remoção de metais podem ser vistos neste horizonte. No horizonte Bh (mais abaixo) ainda ocorre Al-complexado às substâncias húmicas, restringindo as atividades de várias populações microbianas. Provavelmente os organismos presentes nas manchas não são prejudicados pela presença de Al, por isso nesses locais é provável que haja uma comunidade microbiana diferente da presente nos horizontes EB e no topo do Bh. Com a profundidade, a saturação de água pode desempenhar um papel crucial na oxigenação local, também influenciando a comunidade microbiana (BUURMAN et al., 2005, BUURMAN et al., 2007).

Há tempos já se sabe que o efeito da drenagem na gênese dos Espodossolos é maior do que o efeito climático (ANDRIESSE, 1969). Andriesse (1969) estudando Espodossolos localizados nas planícies tropicais úmidas de Sarawak na Malásia durante sete anos, observou que esses Espodossolos tropicais eram morfologicamente semelhantes aos que se desenvolviam em regiões de clima temperado e o processo de formação também era semelhante, porém, as causas para o desenvolvimento não eram idênticas. Nas regiões tropicais, as condições ideais para o desenvolvimento de horizonte Bh consiste em uma reduzida taxa de decomposição devido às más condições de drenagem combinada à ocorrência de ácidos orgânicos, material de origem rico em quartzo, serrapilheira com alto teor de compostos derivados de lignina e uma topografia relativamente plana.

Os principais efeitos da drenagem na gênese dos Espodossolos estão relacionados com o transporte de matéria orgânica dissolvida (MOD) através do perfil e processos de oxirredução. Este último afeta predominantemente os compostos de ferro, quando presentes (BUURMAN et al., 2006). Em Espodossolos bem drenados, o movimento dominante da água é vertical, e a profundidade de desenvolvimento é limitada pela profundidade da penetração da água das chuvas. Nesse caso, o horizonte B tende a apresentar acumulação de MO em formas onduladas que seguem a orientação da posição de raízes grandes, causando a aparência de “línguas” no horizonte E. Em Espodossolos mal drenados, a MO se move através do perfil com a percolação vertical e lento fluxo lateral subsuperficial da água. O resultado aparente da água de circulação em profundidade é o acúmulo horizontal da MOD, que tende a seguir a estratificação do sedimento ou do material de origem. Esses horizontes podem com o tempo tornarem-se fortemente

cimentados e dar origem ao Bhm ou “ortstein”. Espodossolos mal drenados geralmente apresentam poucas raízes no horizonte B, de modo que a estratificação original é pouco perturbada.

Em condições tropicais, resíduos vegetais se acumulam na superfície do solo onde são submetidos a intenso processo de decomposição pela fauna e pela microbiota (KINDEL; GARAY, 2002) e essa dinâmica de decomposição é bastante influenciada pelas condições hidrológicas existentes. A melhoria nas condições de drenagem em Espodossolos em função do rebaixamento do lençol por motivos geomorfológicos (erosão), climáticos (variações no nível médio do mar, p.e.) ou tectônicos, pode acarretar uma série de mudanças, especialmente em solos muito mal drenados. As principais alterações morfológicas decorrentes dessa melhoria são o aumento da quantidade e crescimento de raízes em profundidade, causando uma maior friabilidade nos horizontes subsuperficiais e estabelecendo rotas de fluxo preferencial da água pela reacomodação dos grãos de quartzo; a decomposição acelerada de raízes presentes nos horizontes subsuperficiais, as quais não sofriam degradação devido ao ambiente anaeróbico em profundidade; espessamento do horizonte E com consequente diminuição da espessura do horizonte B; recolonização pela mesofauna, a qual pode retrabalhar a MO presente e contribuir para o aumento da degradação microbiana da MO (BUURMAN et al., 2005, BUURMAN et al., 2006).

Espodossolos sobre areias quartzosas podem apresentar manchas brancas principalmente nos horizontes espódicos, raramente encontradas em horizontes mais superficiais (Figura 1.1). As manchas brancas são individualizadas, pobres em MO e separadas por uma área adjacente com maior teor de MO (BUURMAN et al., 2007). Existem poucos estudos relacionando a microbiota do solo e a formação das manchas brancas. Pela análise de perfis de ácidos graxos de fosfolipídeos (PLFA), Buurman e colaboradores (2007) observaram que as manchas brancas de cinco perfis de podzóis do sul da Holanda possuem maior quantidade de fungos e/ou actinobactérias, se comparado a bactérias, do que o solo adjacente. Entretanto as diferenças observadas não foram significativas estatisticamente. Nesse trabalho, os pesquisadores sugerem que essas manchas brancas se desenvolvem pela degradação seletiva da MO por esses micro-organismos ali presentes, no entanto, os micro-organismos que participam desse processo ainda não são conhecidos.

2.2 Diversidade genética e funcional da microbiota do solo

A diversidade funcional dos micro-organismos pode ter influência na estabilidade dos ecossistemas e as alterações nas estruturas das comunidades microbianas refletem a habilidade desses micro-organismos em responder a fatores ambientais e substratos específicos (SATYANARAYANA, JOHRI, 2005). Micro-organismos degradam materiais orgânicos, promovem o crescimento de plantas, estão intimamente relacionados a mudanças na estruturação do solo e alteram a disponibilidade de nutrientes para as plantas (PRESTON et al., 2001). Nos solos são encontrados diversos micro-habitats com diferentes gradientes físico-químicos e condições ambientais descontínuas, e os micro-organismos se adaptam a esses micro-habitats vivendo em consórcio com outros organismos. As interações entre os diferentes organismos, e desses com o ambiente, controlam a estrutura e a diversidade da comunidade microbiana (SMIT et al, 2001; ROSLING et al., 2003).

A quantidade e qualidade do substrato disponível para a assimilação microbiana pode ser o principal fator regulador das funções microbianas envolvidas na gênese dos solos em geral. Em Espodossolos, por exemplo, sugere-se que fungos podem produzir ácidos orgânicos através da degradação da serrapilheira, ocasionando a liberação de Fe e Al. Os ácidos orgânicos formam complexos organometálicos com esses minerais, os quais percolam ao longo do perfil de solo, sendo depositados no horizonte Bh durante a podzolização (BUURMAN et al., 2007). Por outro lado, bactérias poderiam estar mais envolvidas na degradação aeróbia de algumas moléculas orgânicas complexas como proteínas, celulose e quitina, sendo importantes na degradação de material vegetal depositados no solo em horizontes superficiais (AISLABIE; DESLIPPE; DYMOND, 2013) além de também participarem da degradação de compostos aromáticos relacionados a lignina (OHTA et al., 2012).

O desenvolvimento intensivo de raízes pode favorecer a atividade microbiana e é capaz de modificar a estrutura e a natureza mineral do solo. Em horizontes espódicos, o impacto das raízes ainda não é muito conhecido. O que se sabe é que as raízes podem controlar a atividade dos micro-organismos e contribuir para o desenvolvimento de microagregados no solo (PAGÉ; GUILLET, 1991). Embora a maior parte da atividade microbiana dos solos em geral seja encontrada em camadas mais superficiais, a vida microbiana não se restringe a esses horizontes,

pois raízes de árvores podem penetrar por pelo menos 1 metro de profundidade em Espodossolos, estando acompanhadas por micro-organismos exploradores dos exsudatos radiculares e de raízes mortas (BUURMAN et al., 2007; FRITZE; PIETIKÄINEN; PENNANEN, 2000, ROSLING et al., 2003).

Os micro-organismos estão também associados à manutenção do equilíbrio dos ciclos biogeoquímicos, fluxos de gases e outros processos que determinam a sustentabilidade dos ecossistemas, até mesmo alterações climáticas globais. Embora a importância dos organismos do solo seja amplamente reconhecida, estudos esclarecendo seus papéis funcionais ainda são escassos devido a dificuldade metodológica em se associar um táxon microbiano a funções específicas (CHRISTENSEN, 1989; THORN, 1997; DORAN; ZEISS, 2000; HILL et al., 2000; CABELLO; ARAMBARRI, 2002; KIRK et al, 2004; SILVA; VIDAL-TORRADO; LAMBAIS, 2014; MUMMEY et al., 2010).

A comunidade microbiana dos solos é constituída por representantes dos três domínios: Bacteria, Archaea e Eucarya. Micro-organismos do domínio Bacteria são os mais abundantes no planeta (TORSVIK; ØVREÅS, 2002). As bactérias podem ter papéis importantes no solo como: degradação da MO, oxidação/redução de enxofre, ferro e manganês, além de estarem intimamente relacionadas a disponibilidade de N, participando dos processos de amonificação, nitrificação, desnitrificação e fixação biológica do N₂ (CHATTERJEE et al., 2009; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O primeiro trabalho realizado para estimar a diversidade de bactérias no solo, utilizando técnicas independentes de cultivo, mostrou uma riqueza de aproximadamente 10.000 genomas de bactérias por grama de solo, utilizando ensaios de cinética de reassociação de DNA extraído do solo de floresta de faias, em Bergen na Noruega (TORSVIK et al., 1990). Já Gans, Wolinsky e Dunbar (2005) estimaram em 100.000.000 a riqueza de espécies de procariotos por grama de solo, também utilizando ensaios de reassociação de DNA. Porém, um estudo utilizando pirosequenciamento do gene rRNA16S com amostras de solo de quatro locais diferentes (Rio Grande do Sul, Flórida, Illinois e Ontário), sugere que a riqueza de bactérias no solo não seja maior do que 52.000 espécies por grama (ROESCH et al., 2007). Delmont e colaboradores (2011) mencionam que as divergentes estimativas em relação à riqueza microbiana se devem aos diferentes

métodos de isolamento de DNA adotados nos diversos trabalhos publicados bem como a limitação dos métodos análise desses dados.

Além das bactérias, fungos compõem um dos grupos funcionais mais importantes no solo, devido à sua participação na ciclagem de nutrientes, promoção do crescimento de plantas e indução ou supressão de doenças, além de serem capazes de decompor substratos orgânicos mais recalcitrantes (CHRISTENSEN, 1989; THORN, 1997; BRIDGE; SPOONER, 2001; ANDERSON; CAIRNEY, 2004; CHATTERJEE et al., 2009). Fungos saprófitos representam a maior proporção de espécies fúngicas no solo e desempenham papel crucial na decomposição de polímeros estruturais de plantas, como celulose, hemicelulose e lignina, contribuindo para a manutenção global do ciclo de carbono (CHRISTENSEN, 1989; THORN, 1997; DORAN; ZEISS, 2000; HILL et al., 2000; ANDERSON et al., 2003, GADD, 2007). Espodossolos são solos pobres em nutrientes e, por isso, plantas e micro-organismos precisam competir por esses nutrientes pouco disponíveis (ROSLING et al., 2003). Hifas de fungos simbióticos são capazes de penetrar em locais inacessíveis às raízes das plantas translocando minerais dissolvidos no solo diretamente dos microporos até as plantas hospedeiras, fazendo com que essas não precisem captar os nutrientes diretamente da solução do solo, criando uma conexão entre o solo e a planta para evitar a competição por elementos com outros organismos (JONGMANS et al., 1997; SCHNEPF; JONES; ROOSE, 2011). Apesar da reconhecida importância dos papéis dos fungos nos ecossistemas, o entendimento dos mecanismos que regulam a diversidade e o funcionamento das comunidades de fungos do solo permanece relativamente restrito, em comparação com as comunidades bacterianas (KENT; TRIPLETT, 2002).

O estudo e caracterização da diversidade microbiana do solo são essenciais tanto para a definição de estratégias para a preservação de biomassa quanto para o desenvolvimento de sistemas indicadores de alterações ambientais associadas a distúrbios causados por práticas de manejo e pela presença de poluentes (LAMBAIS et al., 2005). Além disso, é importante para aumentar o conhecimento das fontes de diversidade genética em uma comunidade, entender padrões de distribuição dos micro-organismos e compreender o envolvimento da biodiversidade no funcionamento e na sustentabilidade de ecossistemas (ØVREÅS, 2000).

2.3 Papéis dos micro-organismos na formação de Espodossolos

A contribuição dos micro-organismos na gênese e evolução de paisagens litorâneas e de Espodossolos, em particular, não foi ainda estudada. A maioria dos estudos se concentra na avaliação de determinados perfis de solo, com características específicas. Silva e colaboradores (2014) avaliaram a estrutura das comunidades e diversidade de Bacteria e Archaea em Espodossolos mal drenados e com manchas brancas empobrecidas em MO, que ocorrem em Espodossolos de Bertioga e Ilha Comprida, no Estado de São Paulo. Nesse estudo foram observadas diferenças significativas nas estruturas das comunidades de Bacteria no interior das manchas e o solo adjacente. Em relação aos grupos bacterianos dominantes, foi observado uma menor diversidade nas manchas brancas em relação ao solo adjacente, sugerindo seleção de grupos bacterianos específicos. Através do sequenciamento de clones do gene rRNA 16S, foi observada uma predominância de *Pseudomonas* nas manchas brancas dos perfis de espodossolo de Bertioga, enquanto que, nas manchas dos perfis de Espodossolos de Ilha Comprida, o grupo predominante foi Acidobacteria, sugerindo o envolvimento desses grupos na degradação seletiva da MO durante a formação dessas manchas.

Um estudo feito com fungos ectomicorrízicos mostrou a capacidade desses organismos em transportar Al *in vitro*, sugerindo um possível papel desses fungos na movimentação desse elemento em Espodossolos (SMITS; HOFFLAND, 2009). Sabe-se que o Al tem papel crucial na formação de Espodossolos, pois se dissocia dos minerais de argila no horizonte E (parte superior do horizonte mineral) e é translocado para o horizonte Bh, onde precipita juntamente com a matéria orgânica. Em Espodossolos boreais observa-se um desequilíbrio na entrada e saída de Al no horizonte O, indicando haver um transporte ascendente de Al dos horizontes E e B para o horizonte O. Esse transporte ascendente poderia ser mediado por fungos ectomicorrízicos, cujas hifas extrarradiculares complexariam Al dos minerais de argila do solo e o transportariam até as raízes no horizonte O (SMITS; HOFFLAND, 2009), sugerindo uma participação ativa de fungos ectomicorrízicos no processo de formação de Espodossolos.

Além disso, Buurman e colaboradores (2005) observaram em Espodossolos na Holanda que quando a cobertura de areia inibia o suprimento de material vegetal fresco no horizonte superficial, a decomposição microbiana no horizonte A

acarretaria uma mudança na composição química do horizonte subsequente, horizonte E. O húmus do horizonte A coberto por areia se tornava, com o tempo, muito similar ao húmus do horizonte E devido à degradação microbiana preferencial dos compostos menos resistentes à degradação e adição de compostos orgânicos produzidos por micro-organismos. Como consequência disso, observaram um relativo aumento de compostos alifáticos de cadeia longa em detrimento dos polissacarídeos, sendo essas mudanças atribuídas à degradação das substâncias húmicas mediada por fungos. Além disso, os autores sugerem que a decomposição aeróbica microbiana pode mudar tanto a coloração do horizontes Bh, de preto a marrom escuro, quanto modificar a aparência micromorfológica do húmus em Espodosolos.

Apesar dessas evidências, raros são os estudos que demonstram a função da comunidade fúngica na gênese de Espodosolos e outros trabalhos são necessários para melhor compreender os papéis funcionais desses organismos nesse solo, principalmente em Espodosolos tropicais.

Estudos relacionando a diversidade microbiana e processos microbianos são de grande importância para compreensão dos mecanismos de gênese dos solos, mas trabalhos que estabelecem essa relação ainda são escassos. O cultivo de micro-organismos e técnicas moleculares independentes de cultivos são metodologias que permitem explorar a diversidade microbiana presente no solo. Entretanto, o cultivo e o isolamento de micro-organismos, apesar de tradicionais, abrangem apenas valores entre 0,1% e 10% da comunidade microbiana no solo (NANNIPIERI et al., 2003; TORVISK et al., 2002). Com a diversidade microbiana subestimada através desses métodos de cultivo, a capacidade de correlacioná-la com os fatores físico-químicos do solo, bem como com a cobertura vegetal é diminuída, o que ressalta o maior interesse no uso de métodos independentes de cultivo para essas análises.

O estudo das comunidades microbianas e sua relação com seu respectivo ambiente ou seu hospedeiro é essencial para o melhor entendimento da dinâmica dos ecossistemas e a análise genômica de amostras ambientais complexas está se tornando uma ferramenta importante para a compreensão da história evolutiva, funcional e ecológica da biodiversidade (SHOKRALLA et al., 2012, PYLRO et al., 2014). Micro-organismos em ambientes naturais podem conter genes que codificam e expressam rotas metabólicas biossintéticas ou biodegradativas de interesse, as

quais ainda não puderam ser identificadas (KAKIRDE et al., 2010). Métodos de cultivo foram então suplementados por abordagens moleculares independentes de cultivo, inicialmente baseadas em amplificação por PCR, clonagem e sequenciamento de Sanger de moléculas universalmente conservadas como, por exemplo, o gene rRNA 16S (DEGNAN;OCHMAN, 2012). Portanto, métodos dependentes e independentes de cultivo tem sido usados conjuntamente, a fim de ampliar cada vez mais o entendimento do real papel dos micro-organismos nos diversos ambientes.

Nesse contexto, avanços na tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS) tem revolucionado a ciência na última década. A análise de DNA ambiental através do uso de *tags* de identificação específicos tem sido uma aplicação chave para essas tecnologias recém-desenvolvidas (SHOKRALLA et al., 2012). O surgimento e desenvolvimento dessas técnicas de sequenciamento em larga escala criou uma nova era nos estudos de diversidade microbiana. Estudos de metagenômica, metatranscriptômica, metaproteômica e metabolômica surgiram para auxiliar um maior entendimento da ecologia microbiana (CARVALHAIS et al., 2012). O desenvolvimento de análises metagenômicas tem permitido o acesso a genomas microbianos de vários ambientes, permitindo a caracterização da diversidade filogenética e funcional de organismos não cultiváveis de vários biomas de interesse. O ritmo acelerado do desenvolvimento e melhorias nas técnicas de sequenciamento pode refletir em aplicações cada vez mais amplas e mais robustas em pesquisas ecológicas e ambientais, ainda mais considerando o custo acessível dessas análises, democratizando o uso dessas tecnologias (SHOKRALLA et al., 2012; van DIJK, 2014).

O primeiro sequenciador de tecnologia de sequenciamento de DNA em larga escala foi o 454 GS20 baseada na tecnologia de pirosequenciamento lançado em 2005. Um ano depois, a plataforma de sequenciamento da Solexa/Illumina começou a ser comercializada pela Illumina e posteriormente as plataformas SOLiD, Heliscope e Ion Torrent foram apresentadas pelas empresas Applied Biosystems, Helicos e Life Technologies respectivamente (van DIJK, 2014). Desde então, empresas envolvidas no desenvolvimento desses sequenciadores voltaram suas pesquisas no aprimoramento dessas tecnologias, levando a um processo crescente de atualização de plataformas capazes de gerar um volume de dados

cada vez maior, com maior precisão de bases e geração de tamanhos de sequências cada vez maiores. Uma desvantagem dessas tecnologias NGS no entanto, são ainda as sequências de pequeno tamanho geradas, o que torna mais difícil a montagem de genomas completos, exigindo, assim, o desenvolvimento de novos algoritmos de alinhamento e programas de análises cada vez mais robustos (van DIJK, 2014).

Já tem-se as plataformas MiSeq e o HiSeq da Illumina que já contam com a geração de um maior tamanho de sequências e elevada taxa de cobertura (SHOKRALLA et al., 2012; THOMAS; GILBERT; MEYER, 2012; van DIJK, 2014) e com o PacBio RS (PacBio Biosciences) que, ao contrário dos outros sequenciadores citados, gera sequências enormes (20 Kb), tornando-o ideal para montagem de genomas total (van DIJK, 2014). Outra tecnologia promissora é o sequenciamento Nanopore, que se baseia no trânsito de uma molécula de DNA através de um poro enquanto a sequência é lida através de um sinal de corrente elétrica ou ótica. O Nanopore é considerado uma tecnologia de terceira geração, pois permite o sequenciamento de moléculas individuais em tempo real (CLARKE et al., 2009). A análise de metagenomas de solo tem sido feita a fim de determinar a relação entre diversidade microbiana e funções bioquímicas da microbiota e tem se mostrado uma poderosa ferramenta para explorar a ecologia microbiana nos variados ambientes (GILBERT; DUPONT, 2010; QIN et al., 2010; SIMON; DANIEL, 2011). A prevalência de diferentes grupos funcionais pode ser usada para prever as condições ambientais de cada ecossistema e as análises resultantes de dados gerados por sequenciamento em larga escala permitem a exploração da diversidade funcional e taxonômica e do sistema biológico de diversos ecossistemas (SIMON; DANIEL, 2011).

Considerando a importância dos estudos de ecologia microbiana em regiões tropicais e a necessidade de reunir novas informações sobre a estrutura da comunidade microbiana e o papel funcional desses organismos em diferentes ambientes, esta tese foi definida com base na utilização de novas tecnologias de sequenciamento, como Illumina MiSeq, correlacionada a dados de análise da matéria orgânica do solo por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e à espectrometria de massa. Esse trabalho tem uma abordagem multidisciplinar, já que envolve a caracterização dos processos de gênese dos Espodossolos (dados físicos, químicos e micromorfológicos) e sua microbiota a fim de fornecer novas

percepções não apenas sobre a diversidade, mas também sobre as características funcionais dos micro-organismos em condições distintas de podzolização, através da determinação dos grupos microbianos mais abundantes nos diferentes horizontes e dentro das manchas e associação desses com moléculas orgânicas mais recalcitrantes à biodegradação. Essa abordagem será essencial para definir o papel desses organismos na gênese desse tipo de solo.

2.4 Hipóteses

- ✓ As estruturas das comunidades bacterianas e fúngicas nos perfis de Espodossolos, e nas manchas brancas, estão associadas com o regime de drenagem atual.
- ✓ As comunidades de bactérias e fungos são específicas e distintas nas manchas em relação ao solo adjacente.
- ✓ As estruturas das comunidades microbianas estão associadas com a composição molecular da MO do solo.
- ✓ Os grupos microbianos mais abundantes nas manchas brancas estão associados com moléculas orgânicas mais recalcitrantes à biodegradação.

2.5 Objetivo geral

- ✓ Avaliar a diversidade genética da microbiota nos diferentes perfis de Espodossolos sob regime de drenagem distintos.

2.5.1 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a variabilidade espacial das comunidades de bactérias e fungos dos Espodossolos, nos diferentes horizontes e nas manchas brancas, em função do regime de drenagem;
- ✓ Determinar se a diversidade genética de bactérias está associada aos fatores químicos dos diferentes horizontes e das manchas brancas, em função do regime de drenagem;

- ✓ Determinar se a diversidade genética de bactérias está associada à composição molecular da MO e aos atributos químicos nos diferentes horizontes e nas manchas brancas, em função do regime de drenagem atual.

Referências

AISLABIE, J., DESLIPPE, J.R., DYMOND, J. R. Soil microbes and their contribution to soil services. In: DYMOND JR. **Ecosystem services in New Zealand: conditions and trends**. Lincoln: Manaaki Whenua Press, 2013. p. 143-161.

ANDERSON, H.A.; BERROW, M.L.; FARMER, V.C.; HEPBURN, A.; RUSSELL, J.D.; WALKER, A.D. A reassessment of podzol formation processes. **Journal of Soil Science**, Oxford, v.33, p.125-136, 1982.

ANDERSON, I.C.; CAIRNEY, J.W.G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 8, p. 769-779, 2004.

ANDERSON, I.C.; CAMPBELL, C.D.; PROSSER, J.I. Diversity of fungi in organic soils under a moorland-Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gradient. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 1121-1132, 2003.

ANDRIESSE, J.P. A study of the environment and characteristics of tropical podzols in Sarawak (east-Malaysia). **Geoderma**, Amsterdam, v. 2, p. 201-227, 1969.

BREEMEN, N.V.; BUURMAN, P. **Soil formation**. 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic, 2002. 404p.

BRIDGE, P.; SPOONER, B. Soil fungi: diversity and detection. **Plant and Soil**, London, v. 232, p. 147-154, 2001.

BUURMAN, P.; JONGMANS, A.G. Podzolisation and soil organic matter dynamics. **Geoderma**, Amsterdam, v. 125, p. 71-83, 2005.

BUURMAN, P.; VAN BERGEN, P.F.; JONGMANS, A.G.; MEIJER, E.L.; DURAN, B.; VAN LAGEN, B. Spatial and temporal variation in podzol organic matter studied by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry and micromorphology. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 56, p. 253–270, 2005.

BUURMAN, P.; SCHELLEKENS, J.; FRITZE, H.; NIEROP, K.G.J. Selective depletion organic matter in mottled podzol horizons. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 607- 621, 2007.

BUURMAN, P.; NIEROP, K.G.J.; PONTEVEDRA-POMBAL, X.; MARTINEZ-CORTIZAS, A. Molecular chemistry by pyrolysis-GC/MS of selected samples of the Penido Vello peat deposit, Galicia, NW Spain. In: MARTINI, I.P.; MARTINEZ-CORTIZAS, A.; CESWORTH, W. **Peatlands: evolution and records of**

environmental and climate change. Amsterdam: Elsevier, 2006. chap. 10, p. 217-240.

BUURMAN, P.; SCHELLEKENS, J.; FRITZE, H.; NIEROP, K.G.J. Selective depletion organic matter in mottled podzol horizons. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 607- 621, 2007.

CABELLO, M.N.; ARAMBARRI, A.M. Diversity in soil fungi from undisturbed and disturbed *Celtis tala* and *Scutia buxifolia* forests in the eastern Buenos Aires province (Argentina). **Microbiological Research**, Amsterdam, v.157, p. 115-125, 2002.

CARVALHAIS, L.C.; DENNIS, P.G.; TYSON, G.W.; SHENK, P. Applying metatranscriptomics to soil environments. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, 2012. In press.

CHATTERJEE, A.; INGRAM, L.J.; VANCE, G.F.; STAHL, P.D. Soil process and microbial community structures in 45- and 135-year-old lodgepole pine stands. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v.39, p. 2263–2271, 2009.

CHRISTENSEN, M. A view of fungal ecology. **Mycologia**, Dordrecht, v. 81, p. 1–19, 1989.

CLARKE, J.; WU, H.-C.; JAYASINGHE, L.; PATEL, A.; REID, S.; BAYLEY, H. Continuous base identification for single- molecule nanopore DNA sequencing. **Nature Nanotechnology**, London, v. 4, p. 265–270, 2009.

COELHO, M.R.; SANTOS, H.G.; SILVA, E.F.; AGLIO, M.L.D. O recurso natural soloIn: MANZATTO, C.V.; FREITAS JÚNIOR, E.; PERES, J.R.R. (Ed.). **O uso agrícola dos solos brasileiros**.Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2002. p. 1-11.

DE CONINCK, F. Major mechanisms in formation of spodic horizons. **Geoderma**, Amsterdam, v.24, p.101-128, 1980.

DEGNAN PH, O.H. Illumina-based analysis of microbial community diversity. **The ISME Journal**, New York, v.6, p. 183–194, 2012.

DELMONT, T.O.; ROBE, P.; CECILLON, S., CLARK, I.M., CONSTANCIAS, F., SIMONET, P.; HIRSCH, P.R.; VOGEL, T.M. Accessing the soil metagenome for studies of microbial diversity. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, p. 1315–1324, 2011.

DINSDALE, E.A., EDWARDS, R.A., HALL, D., ANGLY, F., BREITBART, M., BRULC, J.M., FURLAN, M., DESNUES, C., HAYNES, M., LI, L., MCDANIEL, L., MORAN, M.A., NELSON, K.E., NILSSON, C., OLSON, R., PAUL, J., BRITO, B.R., RUAN, Y., SWAN, B.K., STEVENS, R., VALENTINE, D.L., THURBER, R.V., WEGLEY, L., WHITE, B.A., ROHWER, F. Functional metagenomic profiling of nine biomes. **Nature**, London, v. 452, p.629–633, 2008.

DORAN, J.W.; ZEISS, M.R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.1, p.3–11, 2000.

DRIESSEN, P.M.; DUDAL, R. **Lecture notes on the geography, formation, properties and use of the major soils of the world**. Wageningen: Wageningen Agricultural University; Katholieke; Universiteit Leuven, 2001. 296 p.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2.ed. Rio de Janeiro, 2006. 306p.

FRITZE, H.; PIETIKÄINEN, J.; PENNANEN, T. Distribution of microbial biomass and phospholipid fatty acids in Podzol profiles under coniferous forest. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 51, n. 4, p. 565-573, 2000.

GADD, G.M. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. **Mycological Research**, Manchester, v. 111, p. 3–49, 2007.

GANS, J.; WOLINSKY, M.; DUNBAR, J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. **Science**, Washington, v. 309, n. 5739, p. 1387-1390, 2005.

GILBERT, J.A.; DUPONT, C.L. Microbial metagenomics: beyond the genome. **Annual Review of Marine Science**, Palo Alto, v. 3, p. 347–371, 2010.

HILL, G.T.; MITKOWSKI, N.A.; ALDRICH-WOLFE, L.; EMELE, L.R.; JURKONIE, D.D.; FICKE, A.; MALDONADO-RAMIREZ, S.; LYNCH, S.T.; NELSON, E.B. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, p. 25–36, 2000.

JONGMANS, A.G.; VAN BREEMEN, N.; LUNGSTROM, U.; VAN HEES, P.A.W.; FINLAY, R.D.; SRINIVASAN, M.; UNESTAM, T.; GIESLER, R.; MELKERUD, P.A.; OLSSON, M. Rock-eating fungi. **Nature**, London, v.389, p. 682–683, 1997.

KAKIRDE, K.S.; PARSLEY, L.C.; LILES, M.R. Size does matter: application-driven approaches for soil metagenomics. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 42, n. 11, p. 1911-1923, 2010.

KENT, A.D.; TRIPLETT, E.W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 56, p. 211–236, 2002.

KINDEL, A.; GARAY, I. Humus form in ecosystems of the Atlantic Forest, Brazil. **Geoderma**, Amsterdam, v. 108, p. 101-118, 2002.

KIRK, J.L.; BEAUDETTE, L.A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIROMOS, J.N.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 58, p. 169-188, 2004.

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

LUNDSTRÖM, U.S.; VAN BREEMEN, N.; BAIN, D. The podzolization process. A review. **Geoderma**, Amsterdam, v. 94, p. 91-107, 2000.

LUNDSTRÖM, U.S.; VAN BREEMEN, N.; BAIN, D.C.; VAN HEES, P.A.W.; GIESLER, R.; GUSTAFSSON, J.P.; ILVESNIEMI, H.; KARLTUN, E.; MELKERUD, P.A.; OLSSON, M.; RIISE, G.; WAHLBERG, O.; BERGELIN, A.; BISHOP, K.; FINLAY, R.; JONGMANS, A.G.; MAGNUSSON, T.; MANNERKOSKI, H.; NORDGREN, A.; NYBERG, L.; STARR, M.; TAU STRAND, L. Advances in understanding the podzolization process resulting from a multidisciplinary study of three coniferous forest soils in the Nordic Countries. **Geoderma**, Amsterdam, v.94, p.335-353, 2000.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006. 729p.

MUMMEY, D.L.; CLARKE, J.T.; COLE, C.A.; O'CONNOR, B.G.; GANNON, J.E.; RAMSEY, P.W. Spatial analysis reveals differences in soil microbial community interactions between adjacent coniferous forest and clearcut ecosystems. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 1138-1147, 2010.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENLLE, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v.54, p.655-670, 2003.

OHTA, Y.; NISHI, S.; HAGA, T.; TSUBOUCHI, T.; HASEGAWA, R.; KONISHI, M.; NAGANO, Y.; TSURUWAKA, Y.; SHIMANE, Y.; MORI, K.; USUI, K.; SUDA, E.; TSUTSUI, K.; NISHIMOTO, A.; FUJIWARA, Y.; MARUYAMA, T.; HATADA, Y. Screening and phylogenetic analysis of deep-sea bacteria capable of metabolizing lignin-derived aromatic compounds. **Open Journal Marine Science**, San Antonio, v. 2, p.177-187, 2012.

ØVREÅS, L. Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. **Ecology Letters**, Malden, v.3, p.236-251, 2000.

PAGÉ, F.; GUILLET, B. Formation of loose and cemented B horizons in Podzolic soils: evaluation of biological actions from micromorphological features, C/N values and ¹⁴C datings. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 71, p. 485-494, 1991.

PRESTON, S.; WIRTH, S.; RITZ, K.; GRIFFITHS, B.S.; YOUNG, I.M. The role played by microorganisms in the biogenesis of soil cracks: importance of substrate quantity and quality. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 1851-1858, 2001.

PYLRO, V.S.; ROESCH, L.F.W.; MORAIS, D.K.; CLARK, I.M.; HIRSCH, P.R.; TÓTOLA, M.R. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms, **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.107, p.30-37, 2014.

QIN, J.; LI, R.; RAES, J.; ARUMUGAM, M.; BURGDORF, K.S.; MANICHANH, C.; NIELSEN, T.; PONS, N.; LEVENEZ, F.; YAMADA, T.; MENDE D. R.; LI, J. ; XU, J. ; LI, S. ; LI, D.; CAO, J.; WANG, B.; LIANG, H.; ZHENG, H.; XIE, Y.; TAP, J. ; LEPAGE, P.; BERTALAN, M.; BATTO, J.M.; TORBEN, H.; LE PASLIER, D.; LINNEBERG A.; NIELSEN, H. B.; PELLETIER, E. ; RENAULT, P. ; SICHERITZ-PONTEN, T., TURNER, K.; ZHU, H.; YU, C.; LI S., ; JIAN M.; ZHOU Y.; LI Y.; ZHANG,X.; LI,S.; QIN, N.; YANG, H.; WANG, J.; BRUNAK, S.; DORÉ, J.; GUARNER, F.; KRISTIANSEN,K.; PEDERSEN, O.; PARKHILL, J.; WEISSENBACH, J.; BORK, P.; EHRLIC, S. D.; WANG, J.A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, London, v. 464, p.59-65, 2010.

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

ROESCH, L.F.W.; FULTHORPE, R.R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A.K.M.; KENT, A.D.; DAROUB, H.S.; CAMARGO, F.A.O.; FARMERIE, W.G.; TRIPLETT, E.W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **ISME Journal**, New York, v.1, p. 283-290, 2007.

ROSLING, A.; LANDEWEERT, R.; LINDAHL, B.D.; LARSSON, K-H.; KUYPER, T.W.; TAYLOR, A.F.S.; FINLAY, R.D. Vertical distribution of ectomycorrhizal fungal taxa in a podzol soil profile. **New Phytologist**, Oak Ridge, v. 159, p. 775–783, 2003.

SATYANARAYANA, T. JOHRI, B.N. Microbial diversity: current perspectives and potential applications. In: SINGH, A; WARD, O.P. **Relevance of microbial diversity to environmental biotechnology**. New Delhi: I.K. International Publ. House, 2005.p. 521-536.

SAUER, D.; SPONAGEL, H.; SOMMER, M.; GIANI, L.; JAHN, R.; STAHR, K. Review article – Podzol: Soil of the year 2007 – A review on its genesis, occurrence, and functions. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 170, p.581-597, 2007.

SCHNEPF, A.; JONES, D.; ROOSE, T. Modelling nutrient uptake by individual hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi: temporal and spatial scales for an experimental design. **Bulletin of Mathematical Biology**, Oxford, v. 73, p. 2175 – 2200, 2011.

SHOKRALLA, S.; SPALL, J.; GIBSON, J.; HAJIBABAEI, M. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. **Molecular Ecology**, Malden, v. 21, p. 1794–1805, 2012.

SILVA, K.J.; VIDAL-TORRADO, P.; LAMBAIS, M.R. Bacterial and archaeal communities in bleached mottles of tropical podzols. **Microbial Ecology**, New York,

2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25219446>> Acesso: 01 nov. 2014.

SIMON, C.; DANIEL, R. Metagenomics analysis: past and future trends. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.77, n. 4, p. 1153-1161, 2011.

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GOMMANS, S.; VAN DEN BROEK, J.; VAN MIL, S.; WERNARS, K. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. **Applied Environment Microbiology**, Washington, v. 67, n. 5, p. 2284–2291, 2001.

SMITS, M.M.; HOFFLAND, E. Possible role of ectomycorrhizal fungi in cycling of aluminium in podzols. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 491-497, 2009.

THOMAS, T.; GILBERT, J.; MEYER, F. Metagenomics: a guide from sampling to data analysis. **Microbial Informatics and Experimentation**, London, v. 2, p. 3, 2012

THORN, G. The fungi in soil. In: VAN ELSAS, J.D.; TREVES, D.S.; WELLINGTON, E.M.H. (Ed.). **Modern soil microbiology**. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 63–127.

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

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 782–787, 1990.

van BREEMEN, N.; BUURMAN, P. **Soil formation**. 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic, 2002. 404p.

van DIJK EL, AUGER H, JASZCZYSZYN Y, THERMES C. Ten years of next-generation sequencing technology. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 30, p. 418–26, 2014.

van HEES, P.A.W.; LUNDSTRÖM, U.S.; GIESLER, R. Low molecular weight organic acids and their Al-complexes in soil solution-composition, distribution and seasonal variation in three podzolized soils. **Geoderma**, Amsterdam, v. 94, p.173-200, 2000.

3 ESTRUTURA DAS COMUNIDADES E ABUNDÂNCIA DE BACTÉRIAS E FUNGOS EM TRÊS PERFIS DE EPODOSSOLOS

Resumo

O processo envolvido na formação de Espodossolos, conhecido como podzolização, têm sido intensivamente estudado desde o final do século XIX, principalmente em regiões de clima frio ou temperado úmido. Embora seja amplamente conhecida a contribuição dos micro-organismos nos diversos ciclos biogeoquímicos dos solos, estudos sobre o papel dos micro-organismos na gênese de Espodossolos ainda são escassos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a variação espacial da estrutura das comunidades e a abundância de bactérias e fungos nos diferentes horizontes e manchas brancas de três perfis de Espodossolos sob drenagem intermediária (P11, P38 e P37). Para isso foi utilizado PCR-DGGE e quantificação por PCR quantitativo dos genes rRNA 16S de bactérias e região ITS de fungos. As estruturas das comunidades bacterianas foram mais similares entre si dentro de cada perfil, independente da profundidade dos horizontes, do que entre perfis diferentes. As estruturas das comunidades de fungos não apresentaram diferenças significativas, independente da localidade do perfil ou profundidade dos horizontes. A abundância de cópias do gene rRNA 16S e região ITS foi maior no horizonte superficial (A) do que no horizonte mais profundo (Bh), para os três perfis de Espodossolos estudados. As estruturas das comunidades bacterianas dos três diferentes perfis mostraram diferenças significativas, sendo a estrutura da comunidade bacteriana do perfil P11 distinta daquela dos perfis P37 e P38, os quais não mostram diferenças estatisticamente significativas. O perfil P11 estava localizado em uma falésia, sob influência direta do mar, enquanto os perfis P37 e P38 localizavam-se no interior da restinga, influenciados pela drenagem natural da ilha. A drenagem diferenciada e a liteira da vegetação local podem ter contribuído para a seleção de populações específicas em P37 e P38, as quais diferiram daquelas de P11. As estruturas das comunidades bacterianas, determinada por PCR-DGGE, nos diferentes horizontes de cada perfil foram mais similares entre si do que nos mesmos horizontes em diferentes perfis de Espodossolos. Apesar de não haver diferenças significativas na estrutura das comunidades, grupos específicos de bactérias e fungos podem estar envolvidos na degradação seletiva da matéria orgânica nos diferentes horizontes, bem como nas manchas brancas e suas adjacências.

Palavras-chave: Podzol; PCR quantitativo; PCR-DGGE; Abundância microbiana, Degradação microbiana da MO

Abstract

The process of Podzols formation, known as podzolization, have been intensively studied since at the end of XIX century, mainly in cold and temperate climate. Although the contribution of micro-organisms in several biogeochemical cycles in soils is widely known, studies involving the role of micro-organisms in genesis of Podzols are still scarce. The aim of this study was to evaluate the spatial

variation of the community structure and abundance of bacterial and fungi in the different horizons, bleached mottles and their immediate vicinity of three Podzol profiles under intermediary drainage regime. Thus, PCR-DGGE analysis and quantification of the rRNA 16S genes and ITS region by quantitative PCR were carried out. Structure of bacterial communities, in the different horizons of each soil profile were more similar to each other, regardless horizons depth. The fungal community structures did not show significant differences, regardless soil profile location and horizons depth. Abundance of copies of the bacterial 16S rRNA gene and fungal ITS region, determined by qPCR, was higher in the A horizon than in the Bh horizon, for the three Podzol profiles studied. Structures of bacterial communities of the three profiles showed significant separation, being structures of bacterial communities of P11 different than P37 and P38, although structures of bacterial communities of P37 and P38 did not differ. P11 profile was located in front of the sea, whereas P37 and P38 profiles were trenches, located within restinga, influenced by natural drainage of the island. Differential drainage and influence of restinga vegetation may be contributed to select specific bacterial population in P37 and P38, which differed of P11. Structure of bacterial communities by PCR-DGGE, from different horizons of each profile were more similar to each other than in the same horizons in different Podzols profiles. Although no significant differences in the structure of communities were observed, specific groups of bacteria and fungi may be involved in selective degradation of organic matter as well as in different horizons, bleached mottles and their immediate vicinity.

Key words: Podzols; Quantitative PCR; PCR-DGGE; Microbial abundance, Microbial degradation of OM

3.1 Introdução

Na última década, vários estudos envolvendo a caracterização botânica e a biogeografia florística foram desenvolvidos em ambientes de restingas, no entanto, são poucos os relatos dos solos costeiros, principalmente se considerarmos os Espodossolos. O processo envolvido na formação de Espodossolos, conhecido como podzolização, têm sido intensivamente estudado desde o final do século XIX, principalmente em regiões de clima frio ou temperado úmido. Embora seja amplamente conhecida a contribuição dos micro-organismos nos diversos ciclos biogeoquímicos dos solos em geral, estudos envolvendo o papel dos micro-organismos na gênese e evolução de paisagens litorâneas e de Espodossolos ainda é pouco estudada, principalmente quando se trata de Espodossolos tropicais. O conhecimento é restrito, uma vez que poucos estudos foram realizados e a maioria deles se concentra na avaliação de determinados perfis de solo com características específicas.

Recentemente, Silva e colaboradores (2014) avaliaram a estrutura e diversidade das comunidades de Bacteria e Archaea em Espodossolos e manchas brancas empobrecidas em MO, localizados na região de Bertiooga e Ilha Comprida no Estado de São Paulo. Nesse estudo os pesquisadores ressaltaram a provável participação de bactérias do gênero *Pseudomonas* na degradação seletiva da MO durante a formação das manchas brancas em Espodossolos de Bertiooga, enquanto representantes do grupo Acidobacteria parecem estar envolvidos na degradação da MO durante a formação das manchas em Ilha Comprida, evidenciando uma seleção de determinados grupos bacterianos no interior das manchas brancas, em relação ao local amostrado.

Fungos normalmente estão entre os mais abundantes micro-organismos que habitam o solo em termos de biomassa e atividade fisiológica (BILLS et al., 2004). São importantes para manutenção da biodiversidade, essenciais para a sobrevivência de alguns organismos, manutenção da estrutura do solo devido a produção de exopolímeros e hábito de crescimento filamentoso, atuam em processos ecológicos globais, podem ser fontes de novos compostos bioativos, além de exercerem papel na supressão de doenças de plantas (HAWKSWORTH, 2001; GADD, 2007). A atividade de bactérias e arqueias em ciclos geoquímicos já é bem documentada principalmente em ambientes com limitação de fontes de carbono e anaeróbios, entretanto, em ambientes aeróbios os fungos são de grande importância, especialmente em superfícies rochosas, solos e interface raiz-solo de plantas (GADD, 2007). Apesar de seus papéis nos ecossistemas serem bem documentados, poucas espécies de fungos foram descritas e ainda é pequeno o conhecimento sobre a dinâmica populacional, estrutura das comunidades e diversidade desse grupo de micro-organismos, principalmente quando se considera a gênese e evolução de paisagens litorâneas e de Espodossolos (HAWKSWORTH, 2001).

Dentre as funções exercidas pelos fungos, a capacidade de translocar nutrientes através da sua rede de micélios é uma característica importante para explorar ambientes heterogêneos (GADD, 2007). Smits e Holland (2009) testaram a habilidade de fungos ectomicorrízicos em transportar Al *in vitro* e sugeriram um possível papel desses micro-organismos na ciclagem de nutrientes em Espodossolos, já que o Al tem papel crucial na formação de Espodossolos.

Espodossolos boreais apresentam um desequilíbrio na entrada e saída de Al no horizonte O, indicando haver um transporte ascendente de Al dos horizontes E e B para o horizonte O e esse estudo sugere a participação de fungos ectomicorrízicos nesse transporte ascendente de Al. Isso indica uma participação ativa dos micro-organismos no processo de formação de Espodossolos. Além disso, Buurman e colaboradores 2007, através da análise do perfil de ácidos graxos de fosfolipídeos (PLFA), observaram que as manchas brancas Espodossolos da região do sul da Holanda apresentavam grande quantidade de fungos e/ou actinobactérias, quando comparado a outros grupos bacterianos. A variação nos perfis de PFLA e compostos orgânicos observados nas manchas brancas e áreas adjacentes, sugerem uma complexa sucessão de populações microbianas durante a degradação seletiva da matéria orgânica.

Apesar dessas evidências, ainda são poucos os estudos que relacionam a ocorrência de bactérias e fungos e a relação desses grupos microbianos com a gênese de Espodossolos. Estudos utilizando a técnica de PCR em tempo real para quantificação da abundância de grupos microbianos, bem como a quantificação de genes funcionais em Espodossolos ainda são escassos, principalmente quando se trata de Espodossolos tropicais. O objetivo desse capítulo foi avaliar a variação espacial da estrutura das comunidades e a abundância de bactérias e fungos em 3 perfis de Espodossolos sob drenagem intermediária (P11, P38 e P37), nos seus diferentes horizontes e nas manchas brancas. Para isso foi utilizado PCR-DGGE e quantificação por PCR quantitativo dos genes rRNA 16S de bactérias e ITS de fungos.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Área de amostragem

As amostras foram coletadas em Ilha Comprida, no litoral sul do Estado de São Paulo. A Ilha Comprida é uma ilha barreira com face oceânica de aproximadamente 74 km de comprimento e largura variando de 625 m a 5,37 km (GERARDI; MENDES, 2001) e está separada do continente pelo Mar Pequeno, ou de Iguape, e pelo Mar de Cananéia, sendo que esta face interna ou continental apresenta 80 km de extensão.

A Ilha Comprida é constituída predominantemente de sedimentos arenosos dispostos sob a forma de cordões litorâneos, que são expressão geomórfica de uma barreira progradante. A diversidade de sedimentos que compõem a planície costeira é fruto do contato entre oceano e continente. A área de estudo está localizada sobre a Formação Ilha Comprida, que representa um ambiente misto e que faz parte do Grupo Mar Pequeno (INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS - IPT, 1989).

Na face sul da Ilha Comprida há uma falésia exposta pela erosão, na qual é possível visualizar a grande variação morfológica dos Espodossolos presentes. Essa área foi escolhida para o presente trabalho devido à grande variedade de feições morfológicas evidentes, representatividade e facilidade de acesso aos Espodossolos, na tentativa de elucidar alguns mecanismos relacionados à formação desses solos, com variação de drenagem, em ambientes costeiros.

Segundo Troppmair (2004), o clima da região é predominantemente tropical úmido, com temperaturas médias entre 22° e 23°C. Com o domínio das massas tropicais, a média das temperaturas máximas fica em torno dos 30°C, sendo que as máximas absolutas podem chegar a 38°C. Durante os meses de inverno, a precipitação sofre um leve declínio, no entanto, as chuvas são bem distribuídas durante todo o ano. No verão, as precipitações estão entre 1.300 e 1.500 mm em 100 dias, enquanto no inverno ficam em torno de 500 mm em 60 dias. Tais condições climáticas da região influenciam o tipo de vegetação existente na planície costeira e nas áreas serranas. A cobertura vegetal nessas áreas compreende tanto espécies pioneiras (gramíneas) como formações arbustivas e arbóreas das matas de restinga (ROSS; MOROZ, 1997).

3.2.2 Amostragem

Em outubro de 2011 foi feito o reconhecimento e escolha dos locais amostragem, bem como a descrição morfológica dos perfis de Espodossolos localizados na face sul da Ilha Comprida. Foi realizada amostragem de solo de perfis e trincheiras abertas em pontos selecionados aleatoriamente dentro da restinga.

Para esse primeiro trabalho, foram coletadas amostras de solo de 3 perfis (P11, P38 e P37) sob drenagem intermediária para avaliar a distribuição diferencial

das estruturas das comunidades de bactérias e fungos do perfil sob influência do mar comparado aos perfis encontrados dentro da restinga. O perfil P11 estava localizado na falésia e os outros dois perfis P38 e P37 a 50 e 100 metros, respectivamente, no interior da restinga. P11, P38 e P37 seguiam um transecto para dentro da restinga. Os perfis dentro da mata estavam sob influência do regime de drenagem natural da ilha e da vegetação local enquanto que o P11 tem melhor drenagem por estar exposto (Figura 3.2).

No total, foram avaliadas 32 amostras de solo dos 3 perfis. As amostras foram coletadas com espátulas e armazenadas em sacos plásticos. Foram coletadas amostras compostas de 5 sub-amostras aleatórias de cada horizonte, conforme descrito na Tabela 3.1. Foram também coletadas amostras de manchas e regiões adjacentes as manchas. As amostras de solo foram então transportadas em gelo até o laboratório e depois preservados à -80°C.

Figura 3.1- Manchas brancas concêntricas (A) e arredondadas (B) nos perfis de Espodossolos analisados.

Tabela 3.1- Amostras coletadas dos três perfis de Espodossolos

	Perfil 11	Perfil 38	Perfil37
Horizontes	A E EB Bh1 Bh2 Bh3	A AE BE EB E C Bh1 Bh2	A AE E C Bh1 Bh2
Manchas	M1 (E) M2 (Bh1)	M1 (Bh2) M2 (Bh2) M3 (Bh2)	M1 (E)
Solo Adjacente as manchas	M1Ad M2Ad	M1Ad M2Ad M3Ad	M1Ad

As amostras foram submetidas à extração de DNA para posterior análise do gene rRNA 16S e região ITS. A partir dessa etapa, foi feita a quantificação por PCR em tempo real dos genes rRNA 16S de bactérias e ITS de fungos das amostras de solos dos 3 perfis com drenagem intermediária: P11, P38 e P37. Também foi feita a análise da estrutura das comunidades de bactérias e fungos usando PCR-DGGE.

Figura 3.2- Perfis de Espodosolos amostrados. **A.** Localização da área estudada; **B.** Perfis amostrados; (D) Horizontes amostrados nos perfis: P11 - de frente para o mar (falésia); P38 - a 50 metros de P11, no interior da mata; P37 - a 100 metros de P11, no interior da restinga. Os horizontes previamente identificados e amostrados estão indicados. Foram coletadas também amostras de manchas e solos adjacentes dos três perfis

3.2.3 Extração de DNA total do solo

As amostras foram submetidas à extração de DNA com o kit comercial PowerSoil DNA Isolation (MoBio, Carlsbad, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do DNA foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1X TAE-1,0%, depois de corado com “Sybr Green” (Life Technologies, São Paulo, Brasil). A concentração do DNA foi determinada por fluorimetria utilizando-se um fluorímetro “Qubit®” (Life Technologies, São Paulo, Brasil).

3.2.4 Quantificação do número de cópias dos genes rRNA 16S e região ITS1

O número de cópias dos genes rRNA 16S e região ITS nas amostras de solo dos três perfis de Espodossolos selecionados foi determinada por PCR quantitativo (qPCR). Foram realizadas em termociclador RotorGene 6000 (Cobertt Research, Austrália).

As reações de qPCR foram realizadas em volume total de 25 µL, contendo 12,5 µL de solução do kit Platinum® Quantitative PCR SuperMix – UDG (Invitrogen, Brasil) e 10 nM de oligonucleotídeos. As amplificações da região V3 do gene rRNA 16S de bactérias foram feitas com iniciadores 341f (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') e 518r (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') (MUYZER et al., 1993) em amplificação com desnaturação inicial de 3 min a 95 °C, seguidos de 35 ciclos de 60s a 94 °C; 60s a 55 °C e 60s a 72 °C. Já para as amplificações da região ITS1 para fungos, foram utilizados os iniciadores ITS1f (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e 5.8S (5'-CGC TGC GTT CTT CAT CG-3') de acordo com FIERER e colaboradores (2005), em amplificação com desnaturação inicial de 3 min a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de 30s a 95 °C; 30s a 53 °C e 60s a 72 °C, sendo realizada posteriormente uma extensão final de 45s a 72 °C.

Para a quantificação do gene rRNA 16S e região ITS1, foram obtidas curvas padrões por meio de amplificações com o número de cópias conhecido do DNA molde adicionado nas reações. No entanto, sabe-se que existem fungos com diferentes números de cópias desta região do DNA bem como variações no tamanho do fragmento de ITS, o que pode gerar algum viés nessa estimativa. Diluições do produto de amplificação por PCR obtidos das amostras de DNA dos Espodossolos foram utilizadas para obtenção das curvas padrões. A eficiência de amplificação para cada iniciador foi determinada através de curva padrão de diluição serial do DNA (1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000). Os valores de Ct ('cycle threshold') obtidos para cada amostra em cada uma das reações foram utilizados para a quantificação absoluta do DNA de interesse.

Os dados de quantificação dos genes foram submetidos à análise de variância (ANOVA) através do Programa R (R Development Core Team, 2011) e as médias foram comparadas com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.2.5 Análise da estrutura de comunidades de bactérias e fungos

A estrutura das comunidades de bactérias e fungos dos três perfis de Espodossolos selecionados também foram avaliadas por PCR-DGGE. As reações de PCR foram realizadas utilizando iniciadores 341fGC (5'- CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG CCT ACG GGA GGC AGC AG - 3') e 518r (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') (MUYZER et al., 1993). A amplificação do gene rRNA 16S ocorreu em duplicata, em 25 µL de solução contendo: 2,5 µL de 10x Tampão Taq (750 mM Tris-HCL pH 8,8, 200 mM de (NH₄)₂SO₄ e 0,1% de Tween); 2,5 µL de 25 mM MgCl₂, 0,25 µL de albumina de soro bovino (BSA) em 1mg/mL, 2,0 µL de 2 mM de dNTP (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos), 0,25 µL de 5 U µL⁻¹ de Taq DNA Polimerase recombinante (Bioline Life Sciences), 1 µL de cada iniciador (10 pmol µL⁻¹) e 10 ng de DNA . O restante do volume foi completado com água ultra pura. As condições de amplificação foram: 3 min a 95 °C; 30 ciclos de 60 s a 94 °C; 60 s a 55 °C; 60 s a 72 °C e extensão final de 7 min a 72° C. A região ITS1 foi amplificada por *nested* PCR utilizando-se o DNA metagenômico extraído e os seguintes iniciadores: primeira reação: EF4 (5' AAGGG[G/A]TGTATTTATTAG 3') (SMIT et al., 1999) e ITS4 (5' CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG 3') (WHITE et al., 1990) e para a segunda reação: ITS1-F-GC (5' CCC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GCC G CTTGGTCATTTAGAGG AGTAA 3') (GARDES & BRUNS, 1993) e ITS2 (5' GCTGCGTTCTTCATCGATGC 3') (ANDERSON et al, 2003). A reação de amplificação do DNA foi feita com 25 ng do DNA metagenômico, 10 pmol de cada um dos iniciadores, 2,5 mM de MgCl₂, 10x buffer [10nM Tris-HCl (pH9.0), 50 mM KCl, 0,1 % Triton R X-100], 200 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP,dTTP) e 1,5 U Taq DNA polimerase (Fermentas). As condições da primeira reação da PCR foram: 94 °C por 5 min, seguidos de 34 ciclos de 94 °C por 5 min, 55 °C por 30s, 72 °C por 1 min e 30s, com extensão final de 72 °C por 5 min. Para a segunda reação da PCR foram usadas as seguintes condições: 94 °C por 5 min, seguidos de 34 ciclos de 94 °C por 30s, 55 °C por 30s, 72 °C por 30s, com extensão final de 72 °C por 5 min.

Todos os produtos de amplificação foram verificados em gel de agarose 1%. As análises por DGGE foram realizadas utilizando-se o aparato de eletroforese Ingeny PhorU System (Ingeny, Goes, The Netherlands). Para a análise, foram preparados géis de poliacrilamida 6% (w/v), com gradiente desnaturante de 30 a 60% para o gene rRNA 16S e 30 a 55% para ITS. O DNA foi separado por eletroforese por 16 horas a 100 V com temperatura de 60 °C. Após eletroforese, o DNA foi corado com “Sybr Green” (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e a imagem dos géis obtida por varredura usando um scanner Typhoon Trio (GE Healthcare, São Paulo, Brasil).

A similaridade entre as estruturas das comunidades de bactérias ou fungos foi determinada com base na presença ou ausência de amplicons detectados após DGGE. Os géis foram analisados utilizando-se o programa Diversity Database (BioRad, Hercules, CA, USA) para determinação da riqueza de amplicons. A partir das matrizes geradas foram realizadas análises de Coordenadas principais (PCoA) através do programa ‘PAST’ (HAMMER et al., 2001), usando uma matriz de similaridade de ‘Bray-Curtis’. Adicionalmente, os dados dos perfis das comunidades de bactérias e fungos foram submetidos à Análise de Similaridade (ANOSIM) através do programa ‘PAST’ (HAMMER et al., 2001). Essa análise permite avaliar o distanciamento entre grupos através das correlações (R) entre eles, variando em uma escala de 0 a 1. Valores de R próximos a 1 indicam plena separação entre os grupos, os valores entre 0,5 a 0,7 representam separações com sobreposições enquanto que valores menores que 0,5 não apresentam separação (CLARKE; GORLEY, 2001).

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Quantificação de bactérias e fungos

A técnica de PCR quantitativo permitiu determinar o número de cópias dos genes rRNA 16S de bactérias e da região ITS de fungos nas amostras dos três perfis selecionados. O valor de eficiência (E) para o gene rRNA 16S foi 0,99 e o de ITS foi de 0,97. Os valores de regressão logarítmica obtidos na curva padrão (R^2) foram 0,99 para ambas as quantificações.

Para o domínio Bacteria, os números de cópias do gene rRNA 16S para os perfis P11, P38 e P37 (soma do número de cópias dos horizontes dentro de cada perfil) foram $2,1 \times 10^8$, $9,3 \times 10^7$ e $2,4 \times 10^8$ cópias/g solo, os quais não diferiram estatisticamente entre si. Esses valores corroboram com estudos anteriores, que sugerem que a abundância de genes rRNA 16S de bactérias é de aproximadamente $10^8 - 10^9$ cópias/g solo (OKANO et al, 2004, HENRY et al, 2006, SIMON; DANIEL, 2011). Já o número de cópias da região ITS de fungos para os perfis P11, P38 e P37 foram $1,7 \times 10^7$, $6,07 \times 10^6$ e $1,9 \times 10^7$ cópias/g de solo, respectivamente, os quais também não diferiram estatisticamente entre si. A quantificação de fungos com base no número de cópias da região ITS em 11 perfis de solos com diferentes sistemas de uso da terra também apresentou valores de aproximadamente 10^7 cópias de ITS por g de solo (GRANTINA et al., 2011).

Os diferentes horizontes foram analisados com relação ao número de cópias dos genes rRNA 16S de bactérias e ITS para fungos, os resultados estão apresentados na Figura 3.3a e Figura 3.3b, respectivamente. Foram analisados apenas os horizontes comuns aos três perfis de Espodossolos, i.e. horizontes A, E e Bh. A abundância de genes rRNA 16S de bactérias e região ITS de fungos foi maior em todos os horizontes A dos três perfis analisados sendo o número de cópias do gene rRNA 16S de bactérias iguais a $5,1 \times 10^8$, $5,1 \times 10^8$ e $1,0 \times 10^9$, em P11, P38 e P37, respectivamente, o número de cópias da região ITS de fungos igual a $7,3 \times 10^7$, $5,3 \times 10^7$ e $1,1 \times 10^8$, em P11, P38 e P37, respectivamente.

Ácidos orgânicos são produzidos no horizonte O e A através da exsudação das plantas e da decomposição da serapilheira e raízes por fungos, os quais poderiam solubilizar Fe e Al dos minerais de argila. Esses ácidos orgânicos formariam complexos com esses metais, e os transportariam ao longo do perfil de solo durante a podzolização (JONGMANS et al., 1997; BUURMAN et al., 2007). Em Espodossolos boreais já foi relatado que o Al e o Fe seriam imobilizados pela decomposição de complexos organometálicos por micro-organismos heterotróficos (BUURMAN et al., 2007). Além disso, Jongmans e colaboradores (1997) relataram que em Espodossolos na Suécia, Finlândia, Dinamarca, Holanda e Suíça é comum encontrar hifas de fungos em microporos no solo, de onde translocariam minerais dissolvidos diretamente para as raízes das plantas hospedeiras no horizonte A, criando uma conexão entre a solução do solo e a planta, evitando a competição por elementos com outros organismos. Nesse mesmo estudo, os pesquisadores

observaram que esses microporos são raros em horizontes mais profundos e seriam formados por fungos saprofíticos e micorrízicos através da exsudação de ácidos orgânicos da extremidade de suas hifas, elevando a taxa de intemperismo dos minerais através da formação de complexos com Al. Essas evidências podem justificar a maior abundância de fungos e bactérias no horizonte A dos perfis analisados neste estudo.

Fungos eram conhecidos por serem estritamente aeróbios, ou seja, se desenvolviam apenas em ambiente rico em oxigênio (DURRANT; CANALE-PAROLA; LESCHINE, 1995). Porém, fungos já foram isolados de habitats tanto anaeróbios como microaeróbios (DURRANT; CANALE-PAROLA; LESCHINE, 1995; SILVA; GROSSMAN; DURRANT, 2009). Esses fungos anaeróbicos e microaeróbios foram reportados possuírem grande capacidade de degradar compostos lignocelulósicos através da produção de enzimas ligninolíticas, além da capacidade de degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) (SILVA; GROSSMAN; DURRANT, 2009). No horizonte Bh dos três perfis avaliados foram encontradas cópias da região ITS de fungos indicando, possivelmente, a presença de fungos microaeróbios bem como anaeróbios nesse horizonte mais profundo. Sabendo da capacidade desses fungos em degradar compostos mais recalcitrantes mesmo em condições adversas, esses organismos presentes no horizonte Bh podem estar relacionados à degradação da MO depositada nesse local.

Figura 3.3 - Número de cópias do gene rRNA 16S de bactérias **(a)** e região ITS de fungos **(b)** dos diferentes horizontes (A, E e Bh) dos diferentes perfis de Espodossolos analisados. Os valores indicam o logaritmo do número de cópias (média $\pm$ erro padrão. Barras do histograma seguidas de mesma letra dentro de cada horizonte não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $p < 0,05$)

Como mencionado anteriormente, os Espodossolos podem apresentar manchas brancas em seus horizontes. Essas manchas são individualizadas e pobres em MO, em relação à área adjacente. As manchas brancas encontradas em cada perfil e nas respectivas adjacências foram analisadas com relação à abundância dos genes rRNA 16S de bactérias (Figura 3.4) e ITS de fungos (Figura 3.5).

O número de cópias do gene rRNA 16S não foi significativamente diferente ($p < 0,05$) entre as regiões de dentro e fora da mancha.

Figura 3.4 - Número de cópias do gene rRNA 16S de bactérias dentro (M) e nas regiões adjacentes (MAd) as manchas brancas dos três diferentes perfis de Espodossolos analisados. Os valores indicam o logaritmo do número de cópias (média $\pm$ erro padrão). Médias seguidas de mesma letra, em cada perfil P11, P37 e P38 não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $p < 0,05$)

Por outro lado, a abundância de cópias de ITS de fungos apresentou diferenças significativas, sendo maior nas regiões adjacentes as manchas brancas nos perfis P38 e P37 do que no interior destas. O oposto foi observado no perfil P11 (Figura 3.5).

Figura 3.5- Número de cópias da região ITS de fungos dentro (M) e nas regiões adjacentes (MAd) as manchas dos três diferentes perfis de Espodossolos analisados. Os valores indicam o logaritmo do número de cópias (média $\pm$ erro padrão); as barras indicam o erro padrão gerado a partir das repetições. Barras do histograma seguidas de mesma letra dentro de cada amostra não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $p < 0,05$)

O fato de encontrar grande abundância de fungos dentro das manchas no perfil exposto a influência do mar (P11) corrobora os resultados encontrados por Buurman e colaboradores (2007) quando estudaram essas manchas brancas em cinco perfis de podzóis do sul da Holanda, embora eles tenham utilizado perfis de ácidos graxos de fosfolipídeos (PFLA) como método de análise. Esses pesquisadores apontaram que as regiões adjacentes às manchas brancas podem conter uma quantidade maior de matéria orgânica e este poderia ser o motivo pelo qual provavelmente encontram-se fungos e MO decomposta por esses no interior das manchas.

As manchas brancas geralmente são encontradas nos horizontes de transição e mais profundos, como EB, BE e Bh e raramente são encontradas em horizontes mais superficiais como A e AE. A química da matéria orgânica pode diferir significativamente entre os horizontes (ROSLING et al., 2003). Os micro-organismos decompositores, tanto bactérias quanto fungos, atuam na decomposição de praticamente todos os tipos de componentes orgânicos (BUURMAN et al., 2007), o que poderia justificar a observação de uma quantidade considerável (OKANO et al, 2004, HENRY et al, 2006, SIMON; DANIEL, 2011; GRANTINA et al., 2011) de ambos os grupos, tanto no interior quanto fora dessas manchas, e em todos os horizontes dos perfis analisados.

3.3.2 Análise da estrutura das comunidades bacterianas por PCR-DGGE

A técnica de PCR-DGGE é muito utilizada em estudos de ecologia microbiana por ser pouco onerosa e possibilitar a análise simultânea de amostras múltiplas, permitindo detectar mudanças nas estruturas das comunidades de micro-organismos em função de alterações no ambiente (MUYZER; SMALLA, 1998).

A análise de amplicons da região V3 do rRNA 16S por DGGE permitiu a comparação da estrutura da comunidade de bactérias nos 3 perfis de solo (P11, P37 e P38) estudados (Figura 3.6).

Figura 3.6 - Perfil de amplicons da região V3 do gene 16S rRNA de bactérias das amostras de Espodossolos de três perfis: P11 – falésia, P38 - trincheira e P37 - trincheira. MM – marcador. Amostras: **P11**: A –P11; **E**–P11; EB–P11; Bh1–P11; Bh2–P11; Bh3–P11; M1–P11 (mancha 1 no perfil P11); M1Ad–P11 (solo adjacente a mancha 1); M2–P11 (mancha 2); M2Ad–P11 (solo adjacente a mancha 2); **P37**: A–P37; AE–P37; E–P37; C–P37; Bh1–P37; Bh2–P37; M1–P37 (mancha 1 no perfil P37); M1Ad–P37 (solo adjacente a mancha 1); **P38**: A–P38; AE–P38; BE–P38; E–P38; EB–P38; C–P38; Bh1–P38; Bh2–P38; M1–P38 (mancha 1 no perfil P38); M1Ad–P38 (mancha 1 no perfil P38); M2–P38 (mancha 2 no perfil P38); M2Ad–P38 (solo adjacente a mancha 2); M3–P38 (mancha 3 no perfil P38); M3Ad–P38 (solo adjacente a mancha 3)

Os perfis de amplicons foram analisados com base na matriz de presença ou ausência de amplicons, usando Análise de Coordenadas Principais (PCoA) (Figura 3.7). As duas primeiras coordenadas da PCoA explicam 48,19% da variabilidade dos grupos formados sendo 28,6% explicados pelo eixo 1 e 20,27% pelo eixo 2.

Figura 3.7 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) da estrutura da comunidade de bactérias a partir do PCR-DGGE, evidenciando a tendência de agrupamento das comunidades de bactérias dentro de cada perfil. Perfis analisados: P11 – falésia, P38 - trincheira e P37 – trincheira. Elipses de dispersão (95% de confiabilidade)

Através da análise de PCoA pode-se observar um agrupamento evidente da comunidade microbiana de cada perfil, ou seja, a estrutura da comunidade bacteriana dos diferentes horizontes é mais similar dentro de cada perfil do que entre perfis diferentes.

As significâncias estatísticas dos agrupamentos observados foram determinadas por meio da análise de ANOSIM, usando o índice de similaridade Bray-Curtis (Tabela 3.2). Esta análise para o PCR-DGGE de amplicons da região V3 do gene rRNA 16S para bactérias das amostras coletadas nos horizontes mostrou uma separação significativa do perfil P11 em relação aos outros perfis (P37 e P38). No entanto, P37 e P38 não foram estatisticamente diferentes. Esse teste confirmou o que foi observado pela PCoA (Figura 3.7).

Tabela 3.2 – Análise de ANOSIM efetuada com o coeficiente de similaridade Bray – Curtis utilizando a técnica de DGGE para amostras de horizontes.

Perfis	Valor de $R_{\text{Bray-Curtis}}$
P11 x P37	0,577*
P11 x P38	0,892*
P37 x P38	0,435

Valores de R são derivados das matrizes de similaridade Bray-Curtis calculadas através de dados binários representando a presença ou ausência de amplicons do gene rRNA 16S dos perfis de DGGE ($p < 0,001$)

*valores de $R_{\text{Bray-Curtis}}$ ANOSIM estatisticamente diferentes

Como mencionado anteriormente, o perfil P11 estava localizado no falésia, sob influência direta do mar, enquanto os perfis P37 e P38 localizavam-se no interior da restinga, influenciados pela drenagem natural da Ilha. A influência do material vegetal proveniente da vegetação da restinga pode ter colaborado para a maior similaridade das estruturas das comunidades bacterianas nos perfis de trincheira, em relação ao perfil exposto e próximo ao mar.

As manchas brancas e seus respectivos solos adjacentes foram analisados também com relação às estruturas das comunidades de bactérias. Os perfis de amplicons dessas manchas (M) e do solo adjacente (MAd) foram analisados através da PCoA (Figura 3.8). Foram analisadas três manchas do perfil P38 (M1, M2 e M3), uma do perfil P37 (M1) e duas do perfil P11 (M1 e M2). De acordo com a PCoA, pode-se observar alta similaridade entre as estruturas das comunidades bacterianas tanto do interior das manchas quanto do solo adjacente, independente da localidade dos perfis. As duas primeiras coordenadas explicam 43,94% da variabilidade dos grupos formados, sendo o 25,8% explicados pelo eixo1 e 18,14% pelo eixo 2.

Figura 3.8- Análise de Coordenadas Principais (PCoA) da estrutura da comunidade de bactérias das manchas e do solo adjacente às manchas, a partir da análise de PCR-DGGE. Foram analisadas três manchas do perfil P38 (M1, M2 e M3), uma do perfil P37 (M1) e duas do perfil P11 (M1 e M2). Os solos adjacentes a cada uma das manchas foram identificados como M_Ad com o respectivo número da mancha analisada. Elipses de dispersão (95% de confiabilidade)

Também foi feita a análise de ANOSIM usando o índice de similaridade Bray-Curtis, para determinar as significâncias estatísticas dos agrupamentos observados (Tabela 3.3). Esta análise para o PCR-DGGE de amplicons da região V3 do gene rRNA 16S para bactérias para as amostras coletadas nas manchas brancas e nas regiões adjacentes a elas não mostrou diferença significativa em relação às amostras dos perfis P11 e P37, e entre os perfis P11 e P38. Por outro lado, a estrutura das comunidades bacterianas das manchas e regiões adjacentes de P37 foram estatisticamente distintas das encontradas em P38 ($R_{\text{Bray-Curtis}}$ entre 0,5 e 0,7). Esse teste confirmou o que foi observado na PCoA (Figura 3.8)

Tabela 3.3 – Análise de ANOSIM efetuada com o coeficiente de similaridade Bray – Curtis utilizando a técnica de DGGE para amostras de manchas e regiões adjacentes as manchas.

Perfis	Valor de R_{Bray-Curtis}
P11 x P37	0,143
P11 x P38	0,504
P37 x P38	0,635*

Valores de R são derivados das matrizes de similaridade Bray-Curtis calculadas através de dados binários representando a presença ou ausência de amplicons do gene rRNA 16S dos perfis de DGGE ($p < 0,001$)

*valores de R_{Bray-Curtis} ANOSIM estatisticamente diferentes

As amostras de manchas do perfil 37 foram coletadas no horizonte E, horizonte esbranquiçado onde provavelmente toda a MO facilmente decomponível foi removida e a MO remanescente é mais recalcitrante e só pode ser decomposta por grupos específicos de micro-organismos (BUURMAN; JONGMANS, 2005), enquanto que as amostras de manchas do perfil 38 foram coletadas no horizonte Bh2 onde há remoção dos metais dos complexos organometálicos que percolaram ao longo do perfil de solo, possibilitando sua decomposição pela microbiota (BUURMAN; JONGMANS, 2005). Apesar de ambos perfis estarem sob influência da drenagem natural da ilha, a variação química desses horizontes pode ter selecionado diferentes grupos de organismos nas manchas brancas e nos solos adjacentes, como observado pela análise de ANOSIM.

Embora as estruturas das comunidades bacterianas sejam mais similares dentro de cada perfil, independente da profundidade dos horizontes, a abundância do gene rRNA 16S foi maior no horizonte superficial (A) para os três perfis de Espodossolos estudados. Esses métodos de análises permitem detectar apenas onde estão os micro-organismos, não permitindo detectar quem são eles e quais seus prováveis papéis onde estão sendo estudados.

3.3.3 Análise da estrutura das comunidades fúngicas por PCR-DGGE

Os amplicons da região ITS do rRNA também foram analisados por DGGE e os perfis de bandejamento estão representados na Figura 3.9.

Figura 3.9 - Perfil de PCR_DGGE das comunidades de fungos das amostras de Espodossolos de três perfis: P11 – falésia, P38 - trincheira e P37 - trincheira. MM – marcador. Amostras: **P11** : A –P11; **E**–P11; EB–P11; Bh1–P11; Bh2–P11; Bh3–P11; M1–P11 (mancha 1 no perfil P11); M1Ad–P11 (solo adjacente a mancha 1); M2–P11 (mancha 2); M2Ad–P11 (solo adjacente a mancha 2); **P37**: A–P37; AE–P37; E–P37; C–P37; Bh1–P37; Bh2–P37; M1–P37 (mancha 1 no perfil P37); M1Ad–P37 (solo adjacente a mancha 1); **P38**: A–P38; AE–P38; BE–P38; E–P38; EB–P38; C–P38; Bh1–P38; Bh2–P38; M1–P38 (mancha 1 no perfil P38); M1Ad–P38 (mancha 1 no perfil P38); M2–P38 (mancha 2 no perfil P38); M2Ad–P38 (solo adjacente a mancha 2); M3–P38 (mancha 3 no perfil P38); M3Ad–P38 (solo adjacente a mancha 3)

Os perfis de amplicons foram analisados com base na presença ou ausência de amplicons, utilizando Análise de Coordenadas Principais (PCoA). De acordo com a PCoA, houve tendência de agrupamento da estrutura da comunidade fúngica de todas as amostras, independente da localidade dos perfis (Figura 3.10). As duas primeiras coordenadas explicam 34,22% da variabilidade dos grupos formados sendo 18,35% explicados pelo eixo1 e 15,87% pelo eixo 2.

Figura 3.10 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) da estrutura da comunidade de fungos nos diferentes horizontes avaliados a partir do PCR-DGGE. Perfis analisados: P11 – falésia, P38 - trincheira e P37 - trincheira. Elipses de dispersão (95% de confiabilidade)

A análise de ANOSIM também foi feita usando o índice de similaridade Bray-Curtis (Tabela 3.4). Esta análise para oPCR-DGGE de amplicons da região ITS de fungos para as amostras coletadas nos horizontes não mostrou separação significativa das amostras entre os três perfis estudados. Esse teste confirmou o que foi observado no gráfico de PCoA (Figura 3.10)

Tabela 3.4 – Análise de ANOSIM efetuada com o coeficiente de similaridade Bray – Curtis utilizando a técnica de DGGE

Perfis	Valor de R _{Bray-Curtis}
P11 x P37	0,003
P11 x P38	0,457
P37 x P38	0,358

Valores de R são derivados das matrizes de similaridade Bray-Curtis calculadas através de dados binários representando a presença ou ausência de amplicons da região ITS1 dos perfis de DGGE (p<0,001)

*valores de R_{Bray-Curtis} ANOSIM estatisticamente diferentes.

A capacidade de crescerem em ambientes oligotróficos, terem hábito de crescimento filamentosos, resistência a fatores ambientais extremos, incluindo locais com altas taxas de metais, irradiação e dessecação, tornam os fungos

colonizadores bem sucedidos de habitats diversos, como por exemplo os Espodossolos, que são solos ricos em metais (GADD, 2007).

O perfil de amplicons do DGGE da região ITS de fungos das manchas brancas encontradas em cada perfil estudado e seus respectivos solos adjacentes também foi analisado através da PcoA (Figura 3.11). As duas primeiras coordenadas explicam 47,59% da variabilidade dos grupos formados sendo 30,86% explicados pelo eixo1 e 16,73% pelo eixo 2.

Figura 3.11-Análise de Coordenadas Principais (PCoA) da estrutura da comunidade de fungos das manchas e do solo adjacente às manchas, a partir da análise de PCR-DGGE. Foram analisadas três manchas do perfil P38 (M1, M2 e M3), uma do perfil P37 (M1) e duas do perfil P11 (M1 e M2). Os solos adjacentes a cada uma das manchas foram identificados como M_Ad com o respectivo número da mancha analisada. Elipses de dispersão (95% de confiabilidade)

A análise de ANOSIM também foi feita usando o índice de similaridade Bray-Curtis (Tabela 3.5). Esta análise para o PCR-DGGE de amplicons da região ITS de fungos para as amostras coletadas nas manchas brancas e suas adjacências também não mostrou separação significativa das amostras entre os três perfis estudados. Esse teste confirmou o que foi observado no gráfico de PCoA (Figura 3.13).

Tabela 3.5 – Análise de ANOSIM efetuada com o coeficiente de similaridade Bray – Curtis utilizando a técnica de DGGE

Perfis	Valor de R_{Bray-Curtis}
P11 x P37	0,133
P11 x P38	0,072
P37 x P38	0,067

Valores de R são derivados das matrizes de similaridade Bray-Curtis calculadas através de dados binários representando a presença ou ausência de amplicons da região ITS1 dos perfis de DGGE ($p < 0,001$)

*valores de $R_{\text{Bray-Curtis}}$ ANOSIM estatisticamente diferentes

Podemos observar agrupamento da estrutura da comunidade de fungos de todas as amostras coletadas no interior das manchas brancas e seus respectivos solos adjacentes, independente da localidade dos perfis e da profundidade dos horizontes, indicando similaridade na estrutura da comunidade de fungos de todas as amostras. O fato das manchas brancas se concentrarem nos horizontes mais profundos de Espodossolos e a química da matéria orgânica diferir fortemente entre os horizontes (BUURMAN et al., 2007), pode ser o motivo pelo qual se encontram comunidades similares de fungos atuando na decomposição de componentes orgânicos tanto interior quanto na região adjacentes a essas manchas.

Diferentemente da comunidade bacteriana, a estrutura da comunidade e abundância de fungos não apresentaram um padrão de distribuição definido, ou seja, não se agruparam de acordo com cada perfil. Não é fácil estabelecer uma relação entre as comunidades microbianas e os fatores ambientais determinantes, já que estes fatores, principalmente edáficos, são inúmeros e interdependentes. Como esperado, a abundância de fungos foi maior nos horizontes superficiais (A) do que nos mais profundos, evidenciando que, conjuntamente com as bactérias, esses fungos também podem participar ativamente da degradação da serrapilheira depositada na superfície do solo. Como citado anteriormente, essas análises não permitem detectar quais fungos estão presentes, sendo possível apenas supor as prováveis funções desses organismos em Espodossolos.

3.3.4 Conclusões

Neste trabalho pode-se inferir que as estruturas das comunidades bacterianas nos diferentes horizontes dos perfis de Espodossolos são similares, enquanto as comunidades fúngicas foram distintas. Através da quantificação por

PCR em tempo real com base no gene rRNA 16S de bactérias e região ITS de fungos pode-se observar que a abundância desses genes foi maior nos horizontes superficiais (A) do que nos mais profundos (Bh) nos três perfis analisados, sugerindo que as populações de bactérias e fungos nesse horizonte sejam mais elevadas do que nos horizontes mais profundos. Por outro lado, nas manchas brancas a abundância de bactérias com base no número de cópias do gene rRNA 16S foi estatisticamente igual ao observado no solo adjacente às manchas; fungos foram mais abundantes no interior da mancha em P11 (falésia) e menos abundantes dentro da mancha nos perfis P38 e P37 (trincheiras).

A estrutura das comunidades de bactérias foram similares dentro de cada perfil, independente da profundidade dos horizontes pedogenéticos, enquanto a estrutura das comunidades de fungos foram similares em todas as amostras, entre os três perfis. Apenas as manchas brancas entre os perfis P37 e P38 apresentaram estrutura de comunidades bacterianas estatisticamente diferentes, enquanto a estrutura das comunidades fúngicas foram iguais nas manchas dos três perfis analisados. A comunidade bacteriana dos 3 diferentes horizontes mostrou uma separação significativa do perfil P11 em relação aos outros perfis (P37 e P38), no entanto, P37 e P38 não foram estatisticamente diferentes. O perfil P11 estava localizado na falésia com melhor drenagem, enquanto os perfis P37 e P38 localizavam-se no interior da restinga, influenciados pela drenagem natural da ilha. A drenagem diferenciada e a influência do material vegetal proveniente da vegetação da restinga podem ter colaborado para a similaridade da estrutura da comunidade bacteriana nos perfis de trincheira diferenciando da estrutura da comunidade bacteriana do perfil próximo ao mar.

Embora a estrutura das comunidades bacterianas seja similar dentro de cada perfil, independente da profundidade dos horizontes, e a estrutura das comunidades de fungos não apresentem diferenças, a abundância do gene rRNA 16S e região ITS foi maior no horizonte superficial (A) do que no horizonte mais profundo (Bh) para os três perfis de Espodossolos estudados. Isso sugere que, apesar de não observarmos diferenças na estrutura das comunidades, grupos específicos tanto de bactérias como de fungos podem estar associados a degradação seletiva da matéria orgânica nos horizontes quimicamente distintos bem como no interior das manchas brancas e suas adjacências.

Referências

- ANDERSON, I.C.; CAMPBELL, C.D.; PROSSER, J.I. Diversity of fungi in organic soils under a moorland-Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gradient. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 1121-1132, 2003.
- BILLS, G. F.; CHRISTENSEN, M.; POWELL, M. J.; THORN, G. Saprobiic soil fungi. In: MUELLER, G. M.; BILLS, G. F.; FOSTER, M. S. (Ed.). **Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods**, San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. p. 271– 302.
- BLACKWELL M. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 98 p.426–438, 2011.
- BUURMAN, P.; SCHELLEKENS, J.; FRITZE, H.; NIEROP, K.G.J. Selective depletion organic matter in mottled podzol horizons. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 607-621, 2007.
- BUURMAN, P., VAN BERGEN, P.F., JONGMANS, A.G., MEIJER, E.L., DURAN, B. & VAN LAGEN, B. Spatial and temporal variation in podzol organic matter studied by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry and micromorphology. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 56, p. 253–270, 2005.
- CLARKE, K.R.; GORLEY, R.N. **Primer 5:0 user manual/tutorial**. Plymouth: PRIMER-E, 2001.
- DURRANT, L.R.; CANALE-PAROLA, E.; LESCHINE, S.B. Facultatively anaerobic cellulolytic fungi from soil. In: COLLINS, H.P.; ROBERTSON, G.P.; KLUG, M.J. (Ed.). **The significance and regulation of soil biodiversity**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 161–167.
- FIERER, N.; JACKSON, J.A.; VILGALYS, R.; JACKSON, R.B. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 4117–4120, 2005.
- GADD, G.M. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. **Mycological Research**, Manchester, v. 111, p. 3–49, 2007.
- GARDES, M.; BRUNS, T.D. Its primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhiza and rusts. **Molecular Ecology**, Malden, v. 2, p. 113-118, 1993.
- GERARDI, L.H.O.; MENDES, I.A. **Teoria, técnicas, espaços e atividades: temas de geografia contemporânea**. Rio Claro: UNESP, Programa de Pós-Graduação em Geografia; Associação de Geografia Teórica AGETEO, 2001. 432 p.
- GRANTINA, L.; SEILE, E.; KENIGSVALDE, K.; KASPARINSKIS, R.; TABORS, G.; NIKOLAJEVA, V.; JUNGERIUS, P.; MUIZNIEKS, I. The influence of the land use on abundance and diversity of soil fungi: comparison of conventional and molecular

methods of analysis. **Environmental and Experimental Biology**, Riga, v. 9, p. 9–21. 2011.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, College Station, v. 4, p. 1-9, 2001.

HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 1422–1432, 2001.

HENRY, S.; BRU, D.; STRES, B.; HALLET, S.; PHILIPPOT, L. Quantitative detection of the nosZ gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of rRNA 16S, narG, nirK, and nosZ genes in soils. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 5181–5189, 2006.

INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS. **Compartimentação estrutural e evolução tectônica do estado de são paulo**. São Paulo, 1989. 288 p.

JONGMANS, A.G.; VAN BREEMEN, N.; LUNGSTROM, U.; VAN HEES, P.A.W.; FINLAY, R.D.; SRINIVASAN, M.; UNESTAM, T.; GIESLER, R.; MELKERUD, P.A.; OLSSON, M. Rock-eating fungi. **Nature**, London, v.389, p. 682–683, 1997.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie Van Leeuwenhoek. International Journal of General And Molecular Microbiology**, Dordrecht, v. 73, n. 1, p. 127-141, 1998.

MUYZER, G.; WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for rRNA 16S. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

NIKOLAUSKZ, M.;SIPOS,R.;RÉVESZ,S.; MÁRIALIGETI,K. Observation of bias associated with re-amplification of DNA isolated from denaturing gradient gels. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 244, p. 385-390, 2005.

OKANO, Y.;HRISTOVA, K.R.; LEUTENEGGER, C.M.; JACKSON, L.E.; DENISON, R.F.; GEBREYESUS, B.; LEBAUER, D.; SCOW, K.M. Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p.1008–1016, 2004.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2011.Disponível em:<<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 01 set. 2014.

ROSS, J.L.S. ; MOROZ, I.C. **Mapa geomorfológico do estado de São Paulo**. São Paulo: IPT; FAPESP, 1997. 64 p.

ROSLING A, LANDEWEERT R, LINDAHL BD, LARSSON K-H, KUYPER TW, TAYLOR AFS, FINLAY RD. Vertical distribution of ectomycorrhizal fungal taxa in a podzol soil profile. **New Phytologist**, Oak Ridge, v. 159, p. 775–783, 2003.

SILVA, K.J.; VIDAL-TORRADO, P.; LAMBAIS, M.R. Bacterial and archaeal communities in bleached mottles of tropical podzols. **Microbial Ecology**, New York, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25219446>> Acesso: 01 nov. 2014.

SILVA, I.S.; GROSSMAN, M.; DURRANT, L.R. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2–7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi, **International Biodeterioration & Biodegradation**, Kidlington, v. 63, p. 224–229, 2009.

SIMON, C.; DANIEL, R. Metagenomics analysis: past and future trends. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 4, p. 1153–1161, 2011.

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GLANDORF, B.; Van ELSAS, J.D.; WERNARS, K. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing cloned pcr-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 6, p. 2614–2621, 1999.

SMITS, M.M.; HOFFLAND, E. Possible role of ectomycorrhizal fungi in cycling of aluminium in podzols. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 491–497, 2009.

TROPPMAIR, H. **Sistemas, geossistemas, geossistemas paulistas, ecologia da paisagem**. Rio Claro: [s.n], 2004. 130 p.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315–322.

4 ANÁLISE DA DIVERSIDADE E ESTRUTURA DAS COMUNIDADES BACTERIANAS EM ESPODOSSOLOS ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO MASSIVO DA REGIÃO V4 DO GENE rRNA 16S

Resumo

Os micro-organismos do solo são essenciais para o funcionamento sustentável dos ecossistemas, e estão envolvidos no processo de decomposição da matéria orgânica e alteração da disponibilidade de nutrientes no solo, dentre outros processos. Tem sido sugerido que a formação de Espodossolos depende de micro-organismos específicos envolvidos na degradação seletiva da matéria orgânica ao longo do perfil de solo e em manchas brancas, a qual pode ser influenciada pelo regime de drenagem local. Porém, a associação de grupos microbianos com a degradação seletiva da MO em Espodossolos ainda não foi estabelecida. O objetivo desse trabalho foi avaliar a variabilidade espacial das comunidades de bactérias em horizontes e manchas brancas de Espodossolos sob diferentes regimes de drenagem, e determinar se a diversidade genética e estrutura das comunidades de bactérias estão associadas à composição molecular da MO. Para isso, foi feita a análise da diversidade e estrutura das comunidades de bactérias em amostras de solo dos horizontes, manchas brancas e região adjacente às manchas de 11 perfis de Espodossolos sob três diferentes regimes de drenagem. Foi feito o sequenciamento da região V4 do gene do rRNA 16S de bactéria, tipo *paired-end* Illumina sistema MiSeq. A abundância relativa de UTOs foi correlacionada com a abundância de compostos orgânicos, determinada por pirólise-GC/MS. A estrutura das comunidades de bactérias, determinada por sequenciamento massivo do gene rRNA 16S, nos horizontes mais superficiais (A e AE) foi distinta daquela observada nos horizontes mais profundos (EB, BE e Bh). Porém, as comunidades bacterianas nas manchas brancas e suas regiões adjacentes foram mais similares entre si, do que em relação as comunidades bacterianas nos horizontes, em todos os perfis analisados, independente do regime de drenagem. Acidobacteria, Proteobacteria e Actinobacteria foram os filos mais abundantes nos solos estudados. Actinobacteria e Alphaproteobacteria mostraram associação positiva com moléculas orgânicas da pirólise de ligninas, as quais foram mais abundantes nos horizontes superficiais (A e AE), enquanto Acidobacteria mostrou associação positiva com compostos mais recalcitrantes encontrados em horizontes mais profundos (Bh), sugerindo um papel específico e diferenciado de cada grupo bacteriano na degradação de compostos orgânicos específicos. Os resultados desses estudos sugerem que grupos bacterianos específicos podem estar envolvidos na gênese de Espodossolos através da degradação de compostos orgânicos específicos em diferentes horizontes.

Palavras-chave: Podzol; Acidobacteria; Matéria orgânica; Pirólise; rRNA 16S; Actinobacteria

Abstract

Soil microorganisms are essential for ecosystems sustainable functioning, and are involved in soil organic matter decomposition process and change the availability of soil nutrients, among other process. It has been suggested that Podzols formation depends on specific micro-organisms involved in preferential degradation of OM along the soil profile and in bleached mottles, which may be influenced by different dranaige regimes. However, the association of microbial groups or their roles with selective degradation of OM in Podzols were not still established. The aim of this study was to evaluate the spatial variability of the bacterial communities in horizons and bleached mottles of Podzols under three different drainage regimes, and determine whether genetic diversity and structure of bacterial community were associated with molecular composition of OM. Thus, analysis of diversity and structure of bacteria communities of 11 Podzols profiles were performed by soil horizons samples, bleached mottles and intermediate vicinity of three different dranaige regimes. Paired-end sequencing of V4 region of rRNA 16S gene by MiSeq Illumina platform was carried out. Relative abundance of OTUs was correlated with abundance of organic compounds, determined by pyrolysis GC/MS. Structure of bacterial communities, determine by high-throughput sequencing of the V4 region of the bacterial 16S rRNA gene, from surface horizons (A and AE) were distinct of deeper horizons (EB, BE and Bh). However, bacterial community in bleached mottles were more similar with their immediate vicinity, than bacterial communities from horizons, in all profiles analyzed, regardless of dranaige regime. Acidobacteria, Proteobacteria and Actinobacteria were the most abundant phyla in the soils studied. Actinobacteria and Alphaproteobacteria showed a positive relationship organic compounds derived from lignin pyrolysis, which were more abundant in the surface horizons (A and AE), whereas Acidobacteria showed a positive relationship with more recalcitrant compounds detected in deeper horizons (Bh), suggesting a specific and distinct roles of each bacterial group in the degradation of specific organic compounds. The results of this study suggest that specific bacterial groups may be involved in the genesis of Podzols by degrading specific organic compounds in different horizons.

Keywords: Podzol, Acidobacteria; Organic matter; Pyrolysis; rRNA 16S, Actinobacteria.

4.1 Introdução

Os micro-organismos do solo são essenciais para o funcionamento sustentável dos ecossistemas, e estão envolvidos no processo de decomposição da matéria orgânica e alteração da disponibilidade de nutrientes no solo, dentre outros processos. A diversidade genética está diretamente associada com a diversidade metabólica, garantindo a degradação dos mais variados tipos de materiais orgânicos e formação do húmus (BORNEMAN et al., 1996).

A capacidade de micro-organismos em degradar compostos orgânicos mais recalcitrantes pode ser importante na gênese de Espodossolos. Tem sido sugerido que a formação de Espodossolos depende de micro-organismos específicos envolvidos na degradação preferencial da matéria orgânica ao longo do perfil de solo, porém a associação de grupos microbianos ou suas atividades com a degradação seletiva da MO em Espodossolos ainda não foi estabelecida.

Espodossolos apresentam grande variação morfológica e estão sob influência de diferentes tipos de vegetação, desde tundra até florestas tropicais. Portanto, é de se esperar grandes variações tanto na química da MO quanto na estrutura da comunidade microbiana nos diferentes horizontes (BUURMAN; VIDAL-TORRADO; LOPES, 2013). Hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos podem ocorrer naturalmente no ambiente, pela combustão incompleta da matéria orgânica, como biomassa vegetal e outros materiais orgânicos e micro-organismos degradadores utilizam vias bioquímicas complexas para transformar os hidrocarbonetos aromáticos em intermediários comuns do seu catabolismo e, a partir daí, em fonte de carbono e energia para o seu crescimento (BAMFORTH; SINGLETON, 2005). Micro-organismos em ambientes naturais podem conter genes que codificam e expressam rotas metabólicas biossintéticas ou biodegradativas de interesse ainda desconhecidas (KAKIRDE et al., 2010) tornando necessária e importante a realização de estudos de ecologia microbiana em ambientes variados, como exemplo, os Espodossolos.

Considerando a importância dos estudos de ecologia microbiana em regiões tropicais e a necessidade de reunir novas informações sobre a estrutura da comunidade microbiana e o papel funcional desses organismos em diferentes ambientes, esse capítulo tem como objetivo avaliar a variabilidade espacial das comunidades de bactérias dos Espodossolos, nos diferentes horizontes e nas

manchas brancas empobrecidas em MO, em função do regime de drenagem atual e determinar se a diversidade genética e estrutura das comunidades de bactérias estão associadas à composição molecular da MO nos diferentes horizontes e nas manchas brancas. A abordagem multidisciplinar desse trabalho contribuirá para o melhor compreensão da dinâmica das populações de bactérias nos Espodossolos além de auxiliar no entendimento da relação dos grupos microbianos com os compostos orgânicos provenientes da MO nos horizontes, nas manchas brancas e suas regiões adjacentes.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Local de amostragem

As amostras foram coletadas em Ilha Comprida, no litoral sul do Estado de São Paulo. A Ilha Comprida é uma ilha barreira com face oceânica de aproximadamente 74 km de comprimento e largura variando de 625 m a 5,37 km (GERARDI; MENDES, 2001) e está separada do continente pelo Mar Pequeno, ou de Iguape, e pelo Mar de Cananéia, sendo que esta face interna ou continental apresenta 80 km de extensão.

A Ilha Comprida é constituída predominantemente de sedimentos arenosos dispostos sob a forma de cordões litorâneos, que são expressão geomórfica de uma barreira progradante. A diversidade de sedimentos que compõem a planície costeira é fruto do contato entre oceano e continente. A área de estudo está localizada sobre a Formação Ilha Comprida, que representa um ambiente misto e que faz parte do Grupo Mar Pequeno (IPT, 1989).

Segundo Troppmair (2004), o clima da região é predominantemente tropical úmido, com temperaturas médias entre 22° e 23°C. Com o domínio das massas tropicais, a média das temperaturas máximas fica em torno dos 30°C, sendo que as máximas absolutas podem chegar a 38°C. Durante os meses de inverno, a precipitação sofre um leve declínio, no entanto, as chuvas são bem distribuídas durante todo o ano. No verão, as precipitações estão entre 1.300 e 1.500 mm em 100 dias, enquanto no inverno ficam em torno de 500 mm em 60 dias. Tais condições climáticas da região influenciam o tipo de vegetação existente na planície costeira e nas áreas serranas. A cobertura vegetal nessas áreas compreende tanto

espécies pioneiras (gramíneas) como formações arbustivas e arbóreas das matas de restinga (ROSS; MOROZ, 1997).

Na face sul da Ilha Comprida há uma falésia exposta pela erosão, na qual é possível visualizar a grande variação morfológica dos Espodossolos presentes. Essa área foi escolhida para o presente trabalho devido à grande variedade de feições morfológicas evidentes, representatividade e facilidade de acesso aos Espodossolos, na tentativa de elucidar alguns mecanismos relacionados à formação desses solos, com variação de drenagem, em ambientes costeiros.

4.2.2 Amostragem

Em outubro de 2011 foi feito o reconhecimento e escolha dos locais amostragem, bem como a descrição morfológica dos perfis de Espodossolos localizados na face sul da Ilha Comprida. Foi realizada também amostragem em trincheiras que foram abertas em pontos selecionados aleatoriamente dentro da restinga.

Em março de 2012 foram coletadas amostras de perfis de Espodossolos localizados em regiões bem drenadas, mal drenadas e drenagem intermediária, já que o regime de drenagem pode ter papel fundamental na gênese desses solos. No total foram coletadas 182 amostras de solo em 16 perfis, sendo 3 amostrados no interior da restinga (Figura 4.1). Foram abertas 3 trincheiras (duas a 50 e uma a 100 metros da orla). As amostras foram coletadas com espátulas e armazenadas em sacos plásticos. Foram coletadas amostras compostas de 5 sub-amostras aleatórias de cada horizonte, conforme descrito na Tabela 4.1

Figura 4.1 - Localização dos perfis no campo. Sequências de perfis localizados na Ilha Comprida, região sul do Estado de São Paulo. Perfis mal drenados: P40, P02 e P04; perfis bem drenados: P30, P31, P32, P34 e P35; perfis com drenagem intermediária: P11, P37 e P38

Dos 16 perfis coletados, 11 foram selecionados para estudo da diversidade microbiana por apresentarem as manchas brancas em pelo menos um de seus horizontes (Tabela 4.1). Os perfis dentro das áreas com regimes de drenagem diferentes foram considerados replicatas, de modo que temos 5 repetições de perfis bem drenados: perfil P30 (Figura suplementar S3), P31 (Figura suplementar S4, S4B), P32 (Figura suplementar S4, S4E), P34 (Figura suplementar S5, S5B) e P35 (Figura suplementar S5, S5E), 3 perfis de drenagem intermediária: perfil P11 (Figura suplementar S6), P38 (Figura suplementar S7) e P37 (Figura suplementar S8) e 3 perfis mal drenados: perfil P02 (Figura suplementar S9), P04 (Figura suplementar S10) e P40 (Figura suplementar S11). Os perfis P37, P38 e P40 correspondem aos perfis das trincheiras, com as respectivas sub-amostras dos horizontes. Um total de 84 amostras foram selecionadas para análises posteriores (Tabela 4.1). Com esse delineamento experimental, podemos avaliar a variabilidade espacial da comunidade microbiana dentro de cada área e entre as áreas amostradas.

Tabela 4.1- Perfis selecionados para estudo da diversidade microbiana em Espodossolos e horizontes amostrados

Perfis bem drenados					Perfis com drenagem intermediária			Perfis mal drenados		
P30	P31	P32	P34	P35	P11	P37	P38	P02	P04	P40
<i>Horizontes</i>					<i>Horizontes</i>			<i>Horizontes</i>		
A	A		A		A	A	A	A	A	A
AE	AE		AE			AE	AE			AE
EB	EB		EB		EB		EB	EB	EB	EB
BE	BE		BE				BE	BE	BE	BE
Bh1	Bh1		Bh1		Bh1	Bh1	Bh1	Bh1		Bh1
<i>Manchas (M)</i>					<i>Manchas (M)</i>			<i>Manchas (M)</i>		
<i>Solo Adjacente (S)</i>					<i>Solo Adjacente (S)</i>			<i>Solo Adjacente (S)</i>		
M1	M1	M1	M1	M1	M1	M1	M1	M1		M1
S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1		S1
M2	M2	M2	M2	M2	M2		M2	M2	M2	M2
S2	S2	S2	S2	S2	S2		S2	S2	S2	S2
		M3					M3			M3
		S3					S3			S3

As amostras de solo foram então transportadas em gelo até o laboratório e preservadas à -80°C. Estas foram submetidas à extração de DNA para posterior análise do gene do rRNA 16S por sequenciamento pelo sistema MiSeq da Illumina.

4.2.3 Análises Químicas

A caracterização química dos solos coletados nos diferentes horizontes e nas amostras de manchas e regiões adjacentes as manchas foi realizada conforme a metodologia proposta pela EMBRAPA (1997). Todas as amostras foram peneiradas em peneiras de 100 mesh. A acidez ativa do solo foi determinada através da medição do pH em solução de CaCl_2 0,01M e a acidez potencial do solo pela determinação de H+Al em solução SMP. A determinação da quantidade de matéria orgânica do solo (MO) foi feita por oxidação por dicromato em meio ácido e posterior análise colorimétrica. Fósforo (P), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) foram extraídos do solo por resina trocadora de íons e mensurados por espectrofotometria de absorção atômica. A extração de sódio (Na) e potássio (K) trocáveis foi feita com HCl 0,5 mol L^{-1} + H_2SO_4 0,0125 mol L^{-1} (Mehlich-1), na proporção 1:10 (v:v) e suas concentrações determinadas por fotometria de emissão de chama. A determinação de alumínio (Al) foi feita por absorção atômica após o processo de extração seletiva por pirofosfato de sódio. Os teores totais de carbono (C), nitrogênio (N) foram determinados por combustão, usando um analisador LECO TruSpec CN (Leco Corporation, St. Joseph, MI, USA).

Com base nos resultados, foram calculados a soma de bases trocáveis ($\text{SB} = \text{Ca} + \text{Mg} + \text{K}^+$), capacidade de troca de cátions ($\text{T} = \text{Ca} + \text{Mg} + \text{K} + \text{Al}^{3+} + \text{H} + \text{Al}$), saturação por bases ($\text{V} = \text{SB}/\text{T} \times 100$); saturação de alumínio ($\text{m}\% = \text{Al}^{3+}/\text{T} \times 100$) (EMBRAPA, 1997).

Para as amostras de solo das manchas e regiões adjacentes foram feitas apenas a determinação de Al^{3+} , Na e K trocáveis e C e N totais devido a pequena quantidade de solo amostrado, o que impossibilitou a análise química completa.

Para avaliar a relação entre a estrutura da comunidade microbiana encontrada nas diferentes amostras e as propriedades físico-químicas do solo, foi utilizada análise de correlação de Spearman, devido a não homogeneidade da variância dos dados físico-químicos e por esses não serem transformados.

4.2.4 Análise da matéria orgânica do solo por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e à espectrometria de massa (Pi-CG/EM)

As amostras coletadas também foram processadas para extração da matéria orgânica do solo e pirólise associada à cromatografia gasosa/espectrometria de massas (Pi-CG/EM) (SCHULTEN; SCHNITZER, 1997; LEINWEBER; SCHULTEN, 1999; GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2012; BUURMAN; VIDAL-TORRADO; LOPES, 2013). A caracterização molecular da MO do solo é parte do projeto de doutorado de Josiane Millani Lopes e os resultados foram usados para identificar os fatores que determinam a estruturação das comunidades de bactérias nos diferentes perfis e regimes de drenagem dos Espodossolos estudados.

4.2.5 Extração de DNA total do solo

As amostras obtidas foram submetidas à extração de DNA com o kit PowerSoil DNA Isolation (Mobio Laboratories, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do DNA foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1X TAE-1,0%, depois de corado com “Sybr Green” (Life Technologies, São Paulo, Brasil). A concentração do DNA foi determinada por fluorimetria, utilizando-se um fluorímetro “Qubit®” (Life Technologies, São Paulo, Brasil).

4.2.6 Análise da estrutura das comunidades e diversidade de bactérias

Para a análise das estruturas das comunidades e diversidade de bactérias foi utilizado o sequenciamento do tipo *paired-end* no sistema Illumina MiSeq. As amostras de DNA foram submetidas à amplificação da região V4 do gene do rRNA 16S. Foram selecionados 11 perfis de solo, de acordo com o regime de drenagem local, como citado anteriormente. Para essa amplificação foram utilizados iniciadores com adaptadores para posterior sequenciamento. Adicionalmente, os iniciadores *reverse* usados para cada amostra receberam uma *tag* de identificação, composta por 12 bases, que serviu posteriormente para identificar a origem de cada uma das sequências obtidas (CAPORASO et al., 2010, 2012).

O iniciador *foward* utilizado para amplificação da região V4 do rRNA 16S foi o 515F (5' – GTGCCAGCMGCCGCGGTAA – 3') antecedido por um adaptador Illumina 5' (AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC), um *foward primer pad* (TATGGTAATT) e um *linker* (GT) compondo a seguinte sequência: 5' AATGATACGGCGACCACCGAGA TCTACAC TATGGTAATT GT GTGCCAGCMGCCGCGGTAA 3'. O iniciador *reverse* utilizado foi o 806R (5' GGACTACHVGGGTWTCTAAT 3') antecedido também por um adaptador Illumina (CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT), a *tag* de identificação 12 bases, um *reverse primer pad* (AGTCAGTCAG) e um *reverse primer linker* (CC) compondo a seguinte sequência: 5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT XXXXXXXXXXXXX AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT 3' (sequência X representa a *tag* de identificação). As amostras de DNA foram amplificadas em reações de 25 uL cada, em triplicata, resultando em uma amplificação heterogênea de uma mesma amostra ambiental. Na solução foram adicionados 200 nM de cada um dos iniciadores *foward* e *reverse*, 3ng de DNA, 0,04 mg de BSA e 10 µL de Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix. A amplificação foi feita com uma desnaturação inicial de 94° C por 3 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 45 segundos, pareamento a 50° C por 1 minuto e extensão a 72° C por 90 segundos, seguida de uma extensão final de 72° C por 10 minutos. As amplificações foram feitas em termociclador C100 Thermal Cycler (BioRad, Hercules, CA, USA). Para todas as reações foram utilizados controles negativos sem DNA, não apresentando produtos de amplificação. Todos os produtos de amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1X TAE-1,5%.

Alíquotas de 20 uL de cada replicata técnica, de cada amostra, foram misturadas e purificadas através do QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Os produtos de PCR puros foram quantificados por fluorimetria usando o fluorômetro Qubit (Invitrogen), e, com base na quantificação, foram misturados. O conjunto de produtos de PCR foi sequenciado em 2 corridas no sistema Illumina MiSeq, na *Genomic Core Facility*, da Universidade do Texas em Arlington, Estados Unidos.

4.2.7 Análise dos Resultados

As análises computacionais foram realizadas por meio do pipeline disponibilizado pelo *Brazilian Microbiome Project* (PYLRO et al., 2014). Para eliminação de sequências de baixa qualidade e agrupamento em Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) foi utilizado o software USEARCH7 (Uparse) (EDGAR, 2013). A identificação taxonômica das UTOs, determinação da estrutura filogenética e diversidade microbiana foram realizadas pelo pacote Qiime versão 1.8.0 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (CAPORASO et al., 2010). Através do Qiime os amplicons *forward* e *reverse* foram montados em contigs utilizando o “*fastq.join*” (ARONESTY, 2013). O arquivo gerado (.fastq), juntamente com o arquivo de barcodes (.fastq) e respectivo *mapping file* (.txt) foram então processados utilizando o “*split_libraries_fastq.py*”, adotando-se os parâmetros padrões do pacote Qiime versão 1.8.0 (CAPORASO et al., 2012). O arquivo gerado pelo USEARCH7 foi utilizado para selecionar um grupo representativo de sequências utilizando o *script* “*pick_rep_set.py*” para posteriormente fazer a afiliação taxonômica utilizando o uclust e o banco de dados Greengenes (13_08) como referência no Qiime (*assign_taxonomy.py*). Os arquivos gerados, “*seqs_otu.txt*” e “*tax_assignments.txt*”, foram utilizados para construir uma tabela de UTOs (formato BIOM) através do *script* “*make_otu_table.py*”. Além disso, foram feitas as análises de diversidade (Shannon, Diversidade Filogenética – *PD_whole_tree*, Chao1, Número de OTUs, Recíproca de Simpson, Cobertura) no Qiime através do *script* “*core_diversity_analyses.py*”.

As estruturas das comunidade bacterianas nas amostras de solo dos horizontes e das manchas, foram analisadas por Análise de Componentes Principais (Principal Component Analysis - PCA) através do software Statistical Analysis of Metagenomic Profiles (STAMP) (PARKS;BEIKO, 2010), utilizando-se a tabela com o número total UTOs de cada amostra como arquivo de entrada. Além disso, o mesmo arquivo de entrada foi utilizado no STAMP para comparar estatisticamente a abundância entre os diferentes grupos filogenéticos bacterianos detectados nas amostras. Nessa análise, *op-value* foi calculado usando o teste *two sided Fisher's Exact* (FISHER, 1958), e a correção foi feita baseada no critério de FDR (False Discovery Rate) proposto por Benjamini e Hochberg (1995), de acordo com Mendes e colaboradores (2014). Da tabela geral de UTOs, foram obtidas as 500 UTOs

significativamente mais abundantes. A partir dessa seleção, foram selecionadas as 50 primeiras UTOs mais abundantes (Tabela Suplementar S9, S10, Figura Suplementar S2) para melhor discussão dos dados.

Análises de redundância (RDA) foram utilizadas para determinar a correlação entre a estrutura da comunidade e a abundância dos compostos orgânicos detectados através da análise de pirólise e GC/MS de cada amostra de solo. As matrizes foram inicialmente analisadas usando a análise de correspondência retificada (DCA) afim de avaliar o tamanho do gradiente da distribuição de espécies. Essa análise indicou uma distribuição linear dos dados (comprimento do gradiente menor que 3), sugerindo que o melhor modelo de correlação canônica a ser utilizado seria a RDA. Foram aplicadas a Seleção *Forward* (FS) e o teste de permutação de Monte Carlo com 999 permutações aleatórias para verificar a significância das propriedades químicas do solo que influenciam a comunidade microbiana. Biplots foram gerados a partir de 23 amostras de solo de manchas e regiões adjacentes e 38 amostras de diferentes horizontes, usando-se o programa Canoco 4.5 (Biometrics, Wageningen, The Netherlands).

4.3 Resultados

4.3.1 Análises Químicas

Os resultados das análises químicas das amostras de Espodossolos estudados estão apresentadas na Tabela Suplementar S1. A translocação da matéria orgânica e Al das regiões superficiais e acúmulo em horizontes mais profundos é o que caracteriza os Espodossolos. Os solos estudados são considerados ácidos (pH em água entre 4,1 e 5,14 e em CaCl_2 entre 3,22 e 3,87) e distróficos (apresentam saturação por bases – V – menor que 50%) sendo, portanto, considerados de baixa fertilidade. Como esperado, apresentaram maiores concentrações tanto de Al trocável (Al^{3+}) quanto de Al total nos horizontes mais profundos (Bh1) (0,97, 1,32 e 0,94 cmolc/kg de Al^{3+} em solos bem drenados, com drenagem intermediária e mal drenados, respectivamente, e 0,7, 0,58 e 0,86 cmolc/kg de Al_t nos três tipos diferentes de drenagem citados anteriormente). Quantidades menores de Al^{3+} foram observadas nas manchas brancas (M) (0,60; 0,70 e 0,51 cmolc/kg em solos bem drenados, com drenagem intermediária e mal

drenados, respectivamente) enquanto as amostras coletadas nas regiões adjacentes a essas manchas (S) apresentaram maiores concentrações de Al^{3+} (0,79; 1,04 e 8,54 cmolc/kg em bem drenados, drenagem intermediária e mal drenados respectivamente).

No geral, a concentração de carbono orgânico (C_{org}) e MO, determinados por oxidação com dicromato, foram menores nos horizontes de transição AE, BE e EB para os três diferentes regimes de drenagem, enquanto que os horizontes A e Bh1 apresentaram valores maiores para esses parâmetros. Tanto os baixos valores de pH quanto a maior concentração de C_{org} e MO nos horizontes superficiais (horizonte A) podem estar relacionados à decomposição do material vegetal que ocorre frequentemente nesse horizonte. Os altos valores de C_{org} e MO encontrados nos horizontes mais profundos (Bh1) podem ser explicados pelo próprio processo de formação dos Espodossolos (podzolização), o qual compreende o transporte de MO em solução dos horizontes superficiais para os mais profundos, ocorrendo assim, o acúmulo desses compostos orgânicos nos horizontes mais profundos (van BREEMEN; BUURMAN, 2002). Os maiores teores de Al_t encontrados em horizontes mais profundos também evidenciam o processo de podzolização (BUURMAN et al., 2007). Os teores totais de N foram menores do que 0,1% para grande parte das amostras. Valores similares de C e N foram observados em Espodossolos da Holanda e Espodossolos previamente estudados em Bertiooga e Ilha Comprida (BUURMAN et al., 2007; SILVA; VIDAL-TORRADO; LAMBAIS, 2014).

4.3.2 Análise da matéria orgânica do solo por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e à espectrometria de massa (Pi-CG/EM)

A quantificação dos produtos obtidos através da análise de pirólise está listada na Tabela Suplementar S2. Esses dados serão discutidos conjuntamente com os resultados da diversidade da comunidade bacteriana obtida através do sequenciamento da região V4 do rRNA 16S pelo sistema MiSeq Illumina.

4.3.3 Avaliação da diversidade e estrutura das comunidades bacterianas através do sequenciamento massivo da região V4 do generRNA 16S

Foram 84 amplificações de DNA das amostras selecionadas em triplicata (Figura 4.2). Os amplicons foram purificados e as replicatas misturadas para sequenciamento. Na primeira corrida em MiSeq foram sequenciadas 23 amostras de manchas e 23 de regiões adjacentes às manchas, dos 11 perfis identificados em ambientes bem e mal drenados e com drenagem intermediária. Foram gerados cerca de 12,27 milhões de sequências que, após filtração por qualidade, somaram 11,35 milhões de sequências válidas (aproveitamento de 92,5% das sequências), com média de 252 mil sequências por amostra.

O número de UTOs variou de 1629 a 2022 nos horizontes, 2621 em manchas e 2532 em regiões adjacentes às manchas em horizontes bem drenados. Em horizontes com drenagem intermediária o número de UTOs foi de 1534 a 2108 nos horizontes, e 2624 em manchas e 2642 em regiões adjacentes às manchas. Em horizontes mal drenados, o número de UTOs variou de 1377 a 1609 enquanto que nas manchas foi 2830 e nas regiões adjacentes as manchas, foi 2845 (Figura 3.15, 3.18, Tabela Suplementar S3). As curvas de rarefação indicando o número estimado de UTOs em função do esforço de sequenciamento podem ser observadas na figura suplementar S1A. Esta grande quantidade de sequências obtidas permitiu uma elevada cobertura de amostragem da comunidade bacteriana (>98%) (Tabela Suplementar S3), embora as curvas de rarefação sugiram que a diversidade bacteriana das amostras não foi totalmente coberta. A maior riqueza de UTOs foi observada nos horizontes dos perfis bem drenados (Figura suplementar S1A).

Figura 4.2-Amplificação das amostras em triplicata para sequenciamento. **23-** P32 M1 (mancha), **24-** P32 S1 (solo adjacente à mancha), **26-** P32 S2, **27-** P32 M3, **28-** P32 S3, **34-** P34 M1, **35-** P34 S1, **36-** P32 M2; **+** controle positivo, **-** controle negativo

Na segunda corrida foram sequenciadas 38 amostras dos horizontes A, AE, EB, BE e Bh1 dos 11 perfis dos três regimes de drenagem avaliados (bem e mal drenados e com drenagem intermediária). Foram geradas cerca de 9 milhões de sequências que, após filtração por qualidade, totalizaram 8,9 milhões de sequências válidas (aproveitamento de 99,3% das sequências), com média de 235 mil sequências por amostra. As curvas de rarefação indicando o número estimado de UTOs em função do esforço de sequenciamento podem ser observadas na figura suplementar S1B. A grande quantidade de sequências obtidas também permitiu uma elevada cobertura de amostragem da comunidade bacteriana (>98%) (Tabela Suplementar S3), embora as curvas de rarefação também tenham sugerido que a diversidade bacteriana nas amostras de manchas e suas adjacências não foi totalmente coberta. A maior riqueza de UTOs foi observada nas manchas coletadas em perfis com drenagem intermediária (Figura suplementar S1B).

A comparação das similaridades das estruturas das comunidades bacterianas dos horizontes ao longo dos perfis de Espodossolos amostrados, das manchas e regiões adjacentes foi feita através de PCA (Figura 4.3). Os resultados obtidos revelaram que as estruturas das comunidades bacterianas nos horizontes mais superficiais (A e AE) são mais similares entre si, do que em relação aos demais horizontes (BE, EB, Bh1), independente do regime de drenagem (Figura 4.3 A). Já as comunidades bacterianas nas manchas e nas regiões adjacentes a elas apresentam maior variação e não apresentam um padrão de agrupamento por similaridade definido, independentes do regime de drenagem (Figura 4.3 B).

Figura 4.3 - Análise de Componentes Principais (PCA) baseada no número total de UTOs obtidos em cada amostra. **(A)** PCA das amostras coletadas de Espodossolos nos diferentes regimes de drenagem (WD – bem drenados, ID – drenagem intermediária, PD – mal drenados, nos horizontes A, AE, EB, BE e Bh1) **(B)** PCA amostras coletadas nas manchas em Espodossolos nos diferentes regimes de drenagem (WD – bem drenados, ID – drenagem intermediária, PD – mal drenados, em manchas (M) e regiões adjacentes às manchas (S). Os grupos formados são significativos de acordo com o teste ANOVA - Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

As manchas brancas são geralmente encontradas em horizontes mais profundos e/ou de transição, como EB, BE e Bh. Foi feita uma PCA para verificar se as estruturas das comunidades bacterianas encontradas nos horizontes onde foram coletadas as manchas eram similares às estruturas das comunidades encontradas no interior das manchas e respectivas adjacências (Figura 4.4).

Os resultados mostram que as estruturas das comunidades bacterianas encontrada nos horizontes são mais similares entre si do que em relação àquela observada nas manchas e adjacências (Figura 4.4).

Figura 4.4 - Análise de Componentes Principais (PCA) baseada no número total de UTOs obtidos em cada amostra de horizontes onde foram coletadas as manchas e suas respectivas regiões adjacentes. Horiz_Bh1 (PD) – horizonte Bh1 em perfis mal drenados; Horiz_EB (PD) – horizonte EB em perfis mal drenados; Horiz_BE (PD) – horizonte BE em perfis mal drenados; Horiz_Bh1 (WD) – horizonte Bh1 em perfis bem drenados; Horiz_EB (WD) – horizonte EB em perfis bem drenados; Horiz_Bh1 (ID) – horizonte Bh1 em perfis com drenagem intermediária; Horiz_BE (ID) – horizonte BE em perfis com drenagem intermediária e Horiz_EB (ID) – horizonte EB em perfis com drenagem intermediária. M_EB – Manchas coletadas em horizontes EB; M_BE – Manchas coletadas em horizontes BE, M_Bh1 – Manchas coletadas em horizontes Bh1; S_EB – regiões adjacentes as manchas coletadas em horizontes EB, S_BE – regiões adjacentes as manchas coletadas em horizontes BE e S_Bh1 – regiões adjacentes as manchas coletadas em horizontes Bh1. Os grupos formados são significativos de acordo com o teste ANOVA -Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

Considerando esses resultados, os dois grupos de amostras foram analisados separadamente, sendo o primeiro grupo composto pelas manchas e regiões adjacentes e o segundo grupo composto pelos horizontes. A estimativa de riqueza (Chao1), número de UTOs, diversidade filogenética, índices de diversidade (Shannon e Recíproca de Simpson) e cobertura de amostragem das amostras coletadas nos horizontes, nas manchas e regiões adjacentes sob os três regimes de drenagem avaliados são representados na Tabela Suplementar S3.

No primeiro grupo de amostras composto pelas manchas e regiões adjacentes, observou-se influência da drenagem na riqueza de UTOs observada. Em perfis bem drenados, o número de UTOs foi estatisticamente maior nas manchas do que na região adjacente, ao contrário do que foi observado para perfis com drenagem intermediária, onde o maior número de UTOs foi observado nas

regiões adjacentes às manchas. Por outro lado, perfis mal drenados apresentaram número semelhante de UTOs tanto nas manchas quanto adjacências (Figura 4.5).

Figura 4.5 - Número de UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais) observadas em amostras coletadas nas manchas brancas (M) e regiões adjacentes (S) e perfis de Espodossolos sob diferentes regimes de drenagem: bem drenados, drenagem intermediária e mal drenados. Letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A alfa diversidade da comunidade bacteriana nas manchas e em regiões adjacentes a essas está representada na Figura 4.6. A riqueza de UTOs foi estatisticamente maior nas manchas em perfis bem drenados e mal drenados e fora das manchas em perfis com drenagem intermediária (Figura 4.6A). Esse resultado pode ser observado também para diversidade filogenética, com exceção dos perfis mal drenados onde não houve diferença estatística nos valores encontrados dentro e fora das manchas (Figura 4.6B). A maior riqueza de espécies observada nas manchas brancas possivelmente deve-se ao microambiente específico encontrado por esses micro-organismos nesses locais, o que já foi relatado por Buurman e colaboradores (2007), embora a estrutura da comunidade não tenha sido distinta entre esses locais (Figura 4.3B).

Figura 4.6 - Estimativa da riqueza taxonômica de espécies bacterianas representada pela riqueza de espécies (Chao1) **(A)** e diversidade filogenética (P.D. whole tree) **(B)** em amostras coletadas dentro de manchas (M) e regiões adjacentes as manchas (S) e em diferentes regimes de drenagem: bem drenados, drenagem intermediária e mal drenados. Letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A frequência e a ocorrência de grupos filogenéticos específicos nas manchas e regiões adjacentes estão representadas na Figura 4.7A. Em geral, o grupo de maior predominância tanto na mancha quanto em suas adjacências em todos os tratamentos foram Acidobacteria, seguido de Proteobacteria e Actinobacteria. Em perfis bem drenados, 45,0% das sequências nas manchas e 48,6% na região adjacente foram afiliadas a Acidobacteria; em perfis com drenagem intermediária 47,5% das sequências nas manchas e 46,7% na região adjacente, enquanto em perfis mal drenados 46,6% das sequências em manchas e 46,7% das sequências em regiões adjacentes foram afiliadas a esse grupo bacteriano (Tabela Suplementar S7). Em perfis com drenagem intermediária, 27,5% das sequências em manchas e 28,4% em regiões adjacentes foram afiliadas a Proteobacteria, enquanto manchas de perfis bem drenados apresentaram 29,1% e as regiões adjacentes 26,8%. Já em

perfis mal drenados 28,4% das sequências em manchas e 24,8% das sequências em regiões adjacentes foram afiliadas a Proteobacteria. Em perfis com drenagem intermediária, 9,7% das sequências em manchas e 8,2% das sequências em regiões adjacentes foram afiliadas a Actinobacteria (Tabela Suplementar S7).

Silva e colaboradores (2014) avaliando a comunidade bacteriana em Espodossolos na região de Bertioga, litoral norte do Estado de São Paulo, também observaram a predominância de Proteobacteria nas manchas brancas, porém a classe predominante foi Gammaproteobacteria (*Pseudomonas*). Neste estudo, o grupo predominante foi Alphaproteobacteria (Figura 4.7B), família Hyphomicrobiaceae, gênero *Rhodoplanes* (7,4% nas manchas e 4,7% no solo adjacente às manchas em perfis bem drenados; 5,4% nas manchas e 5,3% no solo adjacente às manchas em perfis com drenagem intermediária e 8,0% nas manchas brancas e 4,6% no solo adjacente às manchas em perfis mal drenados) e família Rhodospirillaceae (espécies não identificada) (7,8% nas manchas brancas e 7,3% no solo adjacente às manchas em perfis bem drenados; 8,5% nas manchas e 8,0% no solo adjacente às manchas em perfis com drenagem intermediária e 5,8% nas manchas e 6,2% no solo adjacente as manchas em perfis mal drenados). Silva e colaboradores (2014) analisaram sequências da região V3 do gene rRNA 16S obtidas pelo método de Sanger enquanto que nesse estudo as sequências obtidas foram de região V4 do gene rRNA 16S utilizando-se sequenciamento massivo através da plataforma MiSeq da Illumina. Embora os dois trabalhos tenham avaliado a comunidade bacteriana do mesmo tipo de solo, o local de amostragem, os diferentes tipos de sequenciamento e a avaliação de diferentes regiões do gene rRNA 16S podem ter contribuído para as diferenças nas distintas espécies detectadas, embora os filos predominantes (Acidobacteria e Proteobacteria) tenham sido os mesmos.

Figura 4.7 -Afiliação taxonômica das sequências da região V4 do gene rRNA16S. **(A)** Composição da comunidade microbiana em amostras nas manchas brancas (M) e regiões adjacentes (S) e em Espodossolos sob diferentes regimes de drenagem: bem drenados, drenagem intermediária e mal drenados **(B)** Abundância relativa de sequências afiliadas às classes do filo *Proteobacteria* em amostras de manchas (M) e regiões adjacentes (S) e em diferentes regimes de drenagem: bem drenados, drenagem intermediária e mal drenados.

No segundo grupo de amostras composto pelos horizontes A, AE, EB, BE e Bh1, também foi possível observar a influência da drenagem na riqueza de UTOs observadas e diversidade de UTOs. Em perfis bem drenados, o número de UTOs foi

estatisticamente maior no horizonte Bh1 do que nos outros horizontes; já em perfis com drenagem intermediária e mal drenados, o maior número de UTOs foi observado em horizontes de transição BE e AE, respectivamente, comparado aos outros horizontes estudados. Por outro lado, a riqueza de UTOs não apresentou diferença significativa em função do regime de drenagem (Figura 4.8, Tabela Suplementar S3).

Figura 4.8—Riqueza de UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais) observadas em amostras dos horizontes A, AE, EB, BE e Bh1 de Espodossolos em diferentes regimes de drenagem bem drenados, drenagem intermediária e mal drenados. Letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A alfa diversidade da comunidade bacteriana nos diferentes horizontes nos três regimes de drenagem está mostrada na Figura 4.9. A riqueza de UTOs foi estatisticamente maior nos horizontes de transição BE em perfis bem drenados e com drenagem intermediária, enquanto perfis mal drenados apresentaram uma riqueza de UTOs maior no horizonte A (Figura 4.9A). Com relação a diversidade filogenética, nos horizontes de transição BE e AE as mesmas foram estatisticamente maiores nos perfis com drenagem intermediária e mal drenados, respectivamente,

do que nos demais horizontes ($p < 0,05$). Já, em perfis bem drenados, o horizonte Bh1 apresentou maior diversidade filogenética do que os demais horizontes ($p < 0,05$) (Figura 4.9B).

Os horizontes de transição (EB e BE) são locais onde já ocorreu a decomposição da maior parte das moléculas orgânicas de fácil degradação nos Espodossolos, e é onde os compostos mais recalcitrantes se acumulam e são posteriormente degradados, por esse motivo, é justificável que se encontre uma riqueza de espécies e diversidade filogenética maiores em horizontes de transição.

Figura 4.9 - Estimativa da riqueza de UTOs bacterianas (Chao1) (A) e diversidade filogenética (P.D. whole tree) (B) em amostras dos horizontes A, AE, EB, BE e Bh1 de diferentes regimes de drenagem bem drenados, drenagem intermediária e mal drenados. Letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Quanto à composição taxonômica da comunidade bacteriana, nos diferentes horizontes, observou-se uma elevada abundância relativa de sequências afiliadas a Acidobacteria em horizontes mais profundos e com maior quantidade de matéria orgânica, como EB, BE e Bh1, independentemente do regime de drenagem (horizontes bem drenados: EB – 45,50% , BE – 36,70% e Bh1 – 44,7%; drenagem intermediária: EB- 48% , BE – 42,8% e Bh1 – 62,4%; mal drenados: EB – 33,8% , BE – 51,2% e Bh1 – 51,4%) (Figura 4.10A, Tabela Suplementar S7). Por outro lado,

sequências afiliadas a Actinobacteria foram mais abundantes em horizontes superficiais tanto em solos bem drenados (30,5%) quanto em solos com drenagem intermediária (27,6%) ou mal drenados (22,5%). Essa abundância diminuiu com o aumento da profundidade, sendo que as menores abundâncias relativas foram observadas no horizonte Bh (Figura 4.10A, Tabela Suplementar S7). Já a abundância de sequências afiliadas ao filo Proteobacteria foi maior no horizonte A, AE e BE em perfis bem drenados (A – 25,4%; AE – 28,1%; BE – 28,1%), horizontes A, AE, EB e BE com drenagem intermediária (A – 34,5%; AE – 33,5%; EB – 31,9% e BE – 31,9%) e horizonte AE (32%) em perfis com má drenagem (Figura 4.10B, Tabela Suplementar S7).

Figura 4.10- Afiliação taxonômica das sequências da região V4 do gene rRNA 16S. **(A)** Composição da comunidade microbiana em amostras dos horizontes A, AE, EB, BE e Bh1 de Espodossolos sob diferentes regimes de drenagem bem drenados, drenagem intermediária e mal drenados **(B)** Abundância relativa de sequências afiliadas às classes do filo *Proteobacteria* em amostras coletadas nos horizontes A, AE, EB, BE e Bh1 em diferentes regimes de drenagem: bem drenados, drenagem intermediária e mal drenados.

Acidobacteria são consideradas cosmopolitas, sendo encontradas em diversos ambientes incluindo solos e sedimentos (BARNES et al., 1999; JANSSEN, 2006), fontes de águas termais (BARNES et al., 1999; HUGENHOLTZ, et al., 1998) turfeiras (LIN et al., 2012; AUSEC et al., 2011), lagos ácidos de mineração (KIELAK et al., 2009), solos do Ártico (CHU et al., 2010) e cavernas (MEISINGER et al., 2007). Abundantes no solo, alguns grupos de Acidobacteria são bem adaptadas a ambientes ácidos e com pouca disponibilidade de nutrientes e compõem em média, 20% do total de bactérias comumente encontradas no solo (JANSSEN, 2006; NAETHER et al., 2012). A grande diversidade filogenética e abundância de Acidobacteria principalmente em solos, sugere um importante papel desse grupo em processos biogeoquímicos e uma extensa versatilidade metabólica, porém seu papel ecológico ainda é pouco entendido devido a ocorrência de poucos representantes cultiváveis (EICHROST; BREZNAK; SCHMIDT, 2007; WARD et al. 2009; NAETHER et al., 2012). Tem sido demonstrado que 1/3 dos genes que codificam lacases (uma fenol oxidase) em turfas são de Acidobacteria, demonstrando que essas bactérias tem potencial para degradação de compostos aromáticos (AUSEC et al., 2011), e que poderiam estar envolvidas na degradação seletiva da MO durante a formação das manchas brancas em Espodossolos, e nos horizontes mais profundos, já que foi encontrada uma grande quantidade de representantes desse grupo nas manchas e em regiões adjacentes a elas.

Embora alguns estudos mostrem que o filo Proteobacteria é o filo mais abundante nos solos em geral (HANDELSMAN, 2004; JANSSEN, 2006), esse grupo de bactérias foi o segundo mais frequente nesse estudo. Micro-organismos do filo Proteobacteria são muito comuns em solos de florestas tropicais e estão envolvidos em vários processos, inclusive a fixação biológica do nitrogênio (DIXON; KHAN, 2004; FAORO, et al., 2010). Já foram encontradas também em solos contaminados com metais pesados e de pH elevado, Espodossolos tropicais, além de serem encontrados em ambientes marinhos (NOLD et al., 2000; SANDAA et al., 2001; SILVA; VIDAL-TORRADO; LAMBAIS, 2014). Um estudo com amostras de solo na América do Norte, relacionando propriedades dos solos com abundância relativa de filos bacterianos distintos, mostrou que em ambientes com predomínio de carbono disponível havia maior abundância de Proteobacteria, por outro lado, predomínio de carbono não disponível, a maior abundância era de Acidobacteria (FIERER; BRADFORD; JACKSON, 2007). Nesse contexto, é esperado que se encontre

predominância de sequências afiliadas ao filo Proteobacteria em horizontes mais superficiais como A, AE, BE onde geralmente há maior taxa de carbono disponível.

O filo Proteobacteria está subdividido em seis classes: Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria e Zetaproteobacteria (JANSSEN, 2006; EMERSON et al., 2007). Sequências afiliadas à classe das Alphaproteobacteria foram as mais abundantes nos Espodossolos sob os três diferentes regimes de drenagem estudados, variando de 9,1 a 17,30% em perfis bem drenados, 14,4 a 27,4% nos perfis com drenagem intermediária, e 7,6 a 19,5% em perfis mal drenados. Betaproteobacteria variou 0,6 a 6,1% nos horizontes em perfis bem drenados, 0,2 a 2,8% nos horizontes dos perfis com drenagem intermediária e 3,2 a 5,5% nos horizontes de perfis mal drenados. Deltaproteobacteria variou de 3,0 a 5,5% em perfis bem drenados, 4,1 a 11,7% nos perfis com drenagem intermediária e 3,2 a 5,9% em perfis mal drenados. Gammaproteobacteria variou de 2,6 a 4,5% nos horizontes em perfis bem drenados, 1,9 a 2,7% nos horizontes dos perfis com drenagem intermediária e 1,0 a 7,3% de horizontes em perfis mal drenados (Tabela suplementar S8). Foram também observados representantes dessas quatro classes de Proteobacteria em manchas e regiões adjacentes, sendo Alphaproteobacteria o grupo mais representativo nas manchas e adjacências nos solos sob os três diferentes regimes de drenagem (18,1% nas manchas e 13,3% no solo adjacente em perfis bem drenados; 15,2% nas manchas e 14,9% no solo adjacente em perfis com drenagem intermediária e 15,3% nas manchas e 11,9% no solo adjacente em perfis mal drenados) (Tabela suplementar S8).

Além de possuírem representantes envolvidos com os processos da ciclagem do nitrogênio no solo (DIXON; KHAN, 2004), Alphaproteobacteria possuem também a capacidade de assimilar moléculas orgânicas como frutose, acetato e vários compostos aromáticos tais como benzoato, álcool benzílico e fenol (JONES; HEDRICH; JOHNSON, 2013; RADAJEWSKI et al., 2000). Já foi relatado que Alphaproteobacteria possuem diversas proteínas capazes de transportar compostos derivados de lignina através da membrana celular (MICHALSKA et al., 2012) evidenciando, assim, a alta versatilidade metabólica desse grupo. É possível que a grande diversidade de moléculas orgânicas encontradas em Espodossolos (BUURMAN et al., 2007; BUURMAN; VIDAL-TORRADO; LOPES, 2013;

GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2012) favoreça o crescimento de Acidobacteria e Proteobacteria em detrimento de outros grupos.

Sabe-se que o estado nutricional do solo pode afetar a diversidade e estrutura das comunidades microbianas (LAMBAIS et al., 2005). Smit e colaboradores (2001), estudando a comunidade microbiana do sob cultivo de trigo em uma fazenda na Holanda, observaram que bactérias do filo Proteobacteria podem predominar em solos com altas concentrações de nutrientes disponíveis, enquanto que em solos com baixa disponibilidade de nutrientes o filo predominante é Acidobacteria, sendo a razão entre a abundância do primeiro grupo em relação ao segundo um possível indicativo do estado trófico do solo. Além disso, estudos moleculares observaram que a abundância de Acidobacteria é influenciada pelo pH, ou seja, grande abundância de acidobactérias seriam encontradas em ambientes com pH baixo (FIERER et al., 2007; SPAIN et al., 2009). Assim, os dados deste estudo sugerem que a disponibilidade de nutrientes nos Espodossolos avaliados seja baixa, e o meio ácido favoreça acidobactérias.

4.3.4 Atributos químicos do solos que podem determinar a estrutura das comunidades bacterianas de Espodossolos

Para determinar os atributos químicos do solo que possivelmente estão envolvidos na estruturação das comunidades bacterianas em Espodossolos, a estrutura das comunidades de bactérias, com base nas sequências do gene rRNA 16S, nas amostras de manchas brancas e regiões adjacentes, nas amostras dos diferentes horizontes, foram correlacionadas às propriedades químicas e físicas do solo através da análise de correlação de Spearman.

Anteriormente, análises de redundância (RDA) foram realizadas para determinar a correlação entre a estrutura da comunidade e os atributos químicos e físicos do solo (dados não mostrados). Através do teste de permutação de Monte Carlo e Seleção *Forward* (FS), não foi possível verificar nenhuma variável química do solo que influenciasse significativamente a comunidade microbiana. Por isso foi utilizada a análise de correlação de Spearman, a qual permitiu correlacionar separadamente cada filo bacteriano com cada atributo químico do solo.

Considerando-se as comunidades bacterianas dos horizontes do solo,

Actinobacteria e Acidobacteria correlacionaram-se de maneira oposta em relação a Mg, K, Al trocável, Al total e m% (saturação por alumínio) (Tabela suplementar S4). Acidobacteria apresentou abundância relativa crescente com o aumento da profundidade, enquanto Actinobacteria mostrou uma abundância relativa decrescente (Figura 4.10). Acidobacteria correlacionou-se negativamente com Mg e K ($r_s = -0,41$, $p < 0,05$ e $r_s = -0,401$, $p < 0,05$, respectivamente), e positivamente com Al trocável, Al total e m% ($r_s = 0,548$, $p < 0,001$, $r_s = 0,598$, $p < 0,001$, $r_s = 0,554$, $p < 0,001$, respectivamente). Já Actinobacteria mostra correlação positiva com Mg e K ($r_s = 0,543$, $p < 0,001$ e $r_s = 0,575$, $p < 0,001$, respectivamente) e também com N e C ($r_s = 0,375$, $p < 0,05$ e $r_s = 0,362$, $p < 0,05$, respectivamente) e correlação negativa com Al trocável, Al total e m% ($r_s = -0,4$, $p < 0,05$, $r_s = -0,445$, $p < 0,05$, $r_s = -0,415$, $p < 0,05$, respectivamente).

Em Espodossolos, as quantidades de Al, C_{org}, MO e Fe tenderiam a ser maiores em Bh do que em horizontes de transição, proporcionando, assim, condições favoráveis para a ocorrência de grupos bacterianos como Acidobacteria, o qual apresentou correlação positiva com esses atributos do solo, em detrimento de grupos como Actinobacteria, que correlacionam-se negativamente.

Sabendo que as comunidades bacterianas dos horizontes superficiais diferem dos horizontes mais profundos (Figura 4.3), os grupos bacterianos do horizonte A foram comparados aos do horizonte B através do software STAMP. A distribuição diferencial dos grupos Acidobacteria e Actinobacteria nos horizontes superficiais (A) e nos mais profundos (Bh1) também pode ser observada através da análise feita pelo STAMP. Essa análise mostrou que a abundância desses grupos foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) nesses horizontes, sendo Acidobacteria mais abundante no horizonte mais profundo (Bh1) e Actinobacteria mais abundante nos horizontes mais superficiais (Figura 4.11), corroborando os resultados mostrados anteriormente. Embora encontrados em menores proporções, sequências afiliadas a Gemmatimonadetes, Elusimicrobia e ao filo candidato TM6 foram significativamente mais abundantes em Bh1, se comparado ao horizonte A. Já, Verrucomicrobia, Planctomycetes, Firmicutes e o filo candidato WPS-2 foram significativamente mais abundantes no horizonte A do que nos demais horizontes (Figura 4.11A).

A ordem mais abundante dentro do filo Actinobacteria foi Actinomycetales (classe Actinobacteria) e do filo Acidobacteria, a ordem predominante foi Ellin6513

(classe DA052) (Tabela Suplementar S9 e S10, Figura Suplementar S2). Outras ordens que merecem destaque são Phedosphaerales (classe Pedosphaerae, filo Verrucomicrobia) e Gemmatales (classe Planctomycetia, filo Planctomycetes) que, embora encontradas em menores proporções, foram significativamente mais abundantes no horizonte A do que nos demais horizontes (Figura Suplementar S2A). No horizonte Bh1, as ordens Acidobacteriales (classe Acidobacteriia, filo Acidobacteria) e Solibacterales (classe Solibacteres, filo Acidobacteria) predominaram.

Comparando-se os principais fillos microbianos encontrados nas manchas brancas e nas regiões adjacentes, verifica-se uma abundância significativamente maior ($p < 0,05$) de bactérias não identificadas (*Unassigned*) nas manchas quando comparado as regiões adjacentes. Outros grupos de abundância significativamente maior nas manchas, com relação ao solo adjacente, foram Planctomycetes, Chlamydiae e os fillos candidatos TM6 e WPS-2. Por outro lado, grupos como Cyanobacteria, Verrucomicrobia, Gemmatimonadetes e grupo candidato NC10 foram significativamente mais abundantes nas regiões adjacentes às manchas do que nas manchas brancas (Figura 4.11B). Gemmatales (classe Planctomycetia, filo Planctomycetes) e Acidobacteriales (classe Acidobacteriia, filo Acidobacteria) foram as ordens mais abundantes nas manchas em relação as outras ordens. Já, as ordens como MLE1-12 (classe 4C0d-2, filo Cyanobacteria), JH-MHS47 (classe 12-24, filo candidato NC10), WD2101 (classe Phycisphaerae, filo Planctomycetes) e Pedosphaerales (classe Pedosphaerae, filo Verrucomicrobia) foram mais abundantes nas regiões adjacentes do que nas manchas brancas (Tabela Suplementar S11; Figura Suplementar S2B).

Figura 4.11 - Análise dos perfis taxonômicos ao nível de Filo realizada pelo STAMP em Espodossolos sob três diferentes regimes de drenagem (bem drenados, com drenagem intermediária e mal drenados). (A) Comparação das amostras coletadas em horizontes superficiais (A) e horizontes mais profundos (Bh1) Grupos bacterianos superrepresentados no horizonte A (branco) correspondem a diferenças positivas entre as proporções. Grupos superrepresentados no horizonte Bh1 correspondem a diferenças negativas entre as proporções. *P-values* corrigidos (q-values) foram calculados usando Benjamini-Hochberg FDR ($p < 0,05$). (B) Comparação das amostras coletadas em manchas (M) e regiões adjacentes (S) Grupos bacterianos superrepresentados nas manchas brancas correspondem a diferenças positivas entre as proporções. Grupos superrepresentados nas regiões adjacentes às manchas (S) correspondem a diferenças negativas entre as proporções. *P-values* corrigidos (q-values) foram calculados usando Benjamini-Hochberg FDR ($p < 0,05$)

A abundância relativa de Alphaproteobacteria apresentou correlação positiva com Mg, Na, MO e C_{org} ($r_s = 0,33$, $p < 0,05$; $r_s = 0,329$, $p < 0,05$; $r_s = 0,353$, $p < 0,05$; $r_s = 0,351$, $p < 0,05$, respectivamente) e correlação negativa com pH e P ($r_s = -0,436$, $p < 0,05$; $r_s = -0,328$, $p < 0,05$), enquanto Betaproteobacteria apresentou correlações negativas com K, MO, C_{org}, N e C ($r_s = -0,49$, $p < 0,05$; $r_s = -0,429$, $p < 0,05$; $r_s = -0,5$, $p < 0,05$; $r_s = -0,41$, $p < 0,05$; $r_s = -0,409$, $p < 0,05$, respectivamente). Por outro lado, Deltaproteobacteria apresentou correlação positiva com Al trocável, Fe e Al total ($r_s = 0,33$, $p < 0,05$; $r_s = 0,336$, $p < 0,05$; $r_s = 0,434$, $p < 0,05$, respectivamente) e correlação

negativa com pH ($r_s = -0,493$, $p < 0,05$). Gammaproteobacteria apresentou correlação negativa com pH ($r_s = -0,348$, $p < 0,05$). O tipo de correlação dos grupos microbianos com os diferentes atributos químicos do solo explica de certa forma a distribuição desses organismos ao longo do perfil de Espodossolos. Alphaproteobacteria foi mais abundante em horizontes mais superficiais (A e AE) e mais profundo (Bh) devido provavelmente a maior concentração de MO e C_{org}, enquanto Betaproteobacteria foi menos abundante nesses horizontes devido a correlação negativa desse grupo com esses atributos químicos (Tabela suplementar S4; Tabela suplementar S6). As maiores concentrações de compostos derivados da pirólise da lignina no horizonte A também poderia explicar a maior abundância de Alphaproteobacteria, já que essas bactérias possuem vários transportadores de lignina, o que facilitaria sua utilização como substrato (MICHALSKA et al., 2012).

Como mencionado anteriormente, foram feitas apenas análises de Na (sódio), K (potássio), Al³⁺ (alumínio trocável), C (carbono) e N (nitrogênio) nas amostras de manchas e regiões adjacentes às manchas devido a pequena quantidade de solo disponíveis. Quando correlacionados esses parâmetros químicos com a abundância relativa dos diferentes grupos bacterianos das manchas e regiões adjacentes (Tabela Suplementar S5, S6), poucos grupos apresentaram correlação significativa com os parâmetros considerados. Nas manchas, grupos como Armatimonadetes, Bacterioidetes, candidato AD3, Elusimicrobia e Planctomycetes apresentaram correlações negativas com os parâmetros químicos avaliados. Nas regiões adjacentes às manchas, Actinobacteria apresentou correlação positiva com Na e K ($r_s = 0,435$, $p < 0,05$; $r_s = 0,439$, $p < 0,05$, respectivamente); Chloroflexi apresentou correlação negativa com pH e positiva com N ($r_s = -0,503$, $p < 0,05$; $r_s = 0,482$, $p < 0,05$, respectivamente) enquanto Cyanobacteria correlacionou-se positivamente com pH ($r_s = 0,455$, $p < 0,05$), Elusimicrobia correlacionou-se positivamente com N ($r_s = 0,42$, $p < 0,05$), Firmicutes positivamente com K ($r_s = 0,558$, $p < 0,05$) e Nitrospira correlacionou-se Na e K ($r_s = -0,652$, $p < 0,05$; $r_s = -0,591$, $p < 0,05$), embora a abundância relativa desses grupos tenha sido menor nessas amostras em comparação com Acidobacteria, Actinobacteria e Proteobacteria (Tabela Suplementar S7).

4.3.5 Compostos orgânicos do solo que podem determinar a estrutura das comunidades bacterianas de Espodossolos

Os resultados da análise de pirólise foram utilizados para identificação dos fatores que determinam a estruturação das comunidades de bactérias nos diferentes perfis de Espodossolos estudados. A correlação entre a estrutura da comunidade bacteriana e os compostos orgânicos identificados em cada amostra de solo foi feita através de análises de redundância (RDA), apresentadas nas Figuras 4.12 e 4.13.

Pela RDA realizada com as amostras dos horizontes A, AE, EB, BE, Bh1 sob os três diferentes regimes de drenagem (Figura 4.12A), os dois primeiros componentes explicam 100% da variabilidade dos dados, sendo 66,5% explicados pelo primeiro eixo e 33,5% pelo segundo. Apenas o composto metil éster ou éster metílico de ácidos graxos (mest) ($F = 7,70$; $p = 0,001$) e compostos da pirólise da lignina (lignins) ($F = 10,75$; $p = 0,001$) mostraram correlação positiva com a estrutura da comunidade bacteriana, em geral.

Pela RDA realizada com as amostras de manchas e regiões adjacentes sob os três diferentes regimes de drenagem (Figura 4.12B). Os dois primeiros componentes explicam 97,1% da variabilidade dos dados, sendo 82,4% explicados pelo primeiro eixo e 14,7% pelo segundo. Compostos nitrogenados (N-comp) ($F = 3,75$; $p = 0,029$), outros alifáticos (não n-alcanos ou n-alquenos) (other aliph) ($F = 4,17$; $p = 0,02$) e n-alquenos de cadeia longa (n-alke C26-35) ($F = 3,81$; $p = 0,035$) mostraram correlação positiva com a estrutura da comunidade bacteriana em geral.

Por último, a análise de RDA realizada com todas as amostras (horizontes, manchas brancas e regiões adjacentes as manchas sob os três diferentes regimes de drenagem) foi feita para verificar se os compostos orgânicos influenciam de forma distinta a estrutura da comunidade bacteriana quando as amostras dos diferentes locais são avaliadas conjuntamente (Figura 4.13). Os dois primeiros componentes explicam 96,3% da variabilidade dos dados, sendo 81,9% explicados pelo primeiro eixo e 14,4% pelo segundo. Os parâmetros esteróis ($F = 12,38$; $p = 0,001$), pristenos ($F = 7,0$; $p = 0,003$), ésteres metílicos ($F = 4,87$; $p = 0,015$), outros alifáticos ($F = 6,45$; $p = 0,005$), ligninas ($F = 3,39$; $p = 0,038$), n-alcanos de cadeia curta ($F = 4,22$; $p = 0,013$) e fenóis ($F = 3,88$; $p = 0,028$) mostraram correlação positiva com a estrutura da comunidade bacteriana em geral, embora tenham influenciado de

maneira distinta os diferentes grupos de amostras. Esteróis, ésteres metílicos, n-alcanos de cadeia curta, pristenos e ligninas influenciaram mais a estrutura da comunidade bacteriana dos horizontes mais superficiais (A e AE), independente do regime de drenagem. Por outro lado, fenóis e outros alifáticos influenciaram tanto a estrutura da comunidade bacteriana dos horizontes mais profundos (EB, BE e Bh1) quanto das manchas e solo adjacente.

Analisando-se os efeitos dos compostos orgânicos dos Espodossolos sobre a comunidade bacteriana dos horizontes, manchas e solo adjacente conjuntamente, observou-se maior influência de compostos ésteres metílicos de ácidos graxos na comunidade bacteriana dos horizontes mais superficiais (A e AE) de perfis mal drenados, enquanto a comunidade dos horizontes superficiais de perfis com drenagem intermediária foram influenciadas pelos compostos derivados da pirólise de ligninas (Figura 4.13). Buurman e colaboradores (2013) estudando Espodossolos tropicais no litoral norte do Estado de São Paulo (Itaguapé), também verificaram uma maior abundância de ésteres e compostos derivados da pirólise da lignina em horizontes mais superficiais. Ésteres são raramente encontrados em extratos de matéria orgânica do solo porque suas ligações são facilmente degradadas por micro-organismos durante o processo de decomposição da matéria orgânica (BUURMAN; ROSCOE, 2011). Portanto, a detecção desses compostos pode indicar a presença de material vegetal ainda não degradados nesses locais (BUURMAN; VIDAL-TORRADO; LOPES, 2013).

Ésteres metílicos de ácidos graxos são geralmente encontrados em plantas, como constituintes das ceras que protegem as folhas (KILLOPS & KILLOPS, 2005) bem como em micro-organismos (FRITZE; PIETIKAENEN; PENNANEN, 2000). Esses compostos podem ser utilizados como biomarcadores de grupos microbianos e serem usados para estudos de comunidades microbianas (EHRHARDT et al., 2010; KUNITSKY et al., 2005). Em horizontes mais superficiais dos perfis de Espodossolos mal drenados (horizontes A e AE) ésteres metílicos presentes na matéria orgânica do solo tiveram maior influência na composição da comunidade bacteriana nesses locais, embora tenham sido detectados em baixas proporções (Fig 4.12A).

Os compostos derivados da pirólise da lignina mais comuns encontrados nos Espodossolos estudados foram: *guaiacol*, *4-vinylphenol*, *4-vinylguaiacol* e *4-acetylguaiacol*. Siringol foram escassos em todas as amostras, provavelmente

devido ao fato da degradação preferencial desses compostos ocorrer em sistemas estritamente aeróbios e o siringol ser menos estável do que o guaiacol, ocorrendo assim, um relativo acúmulo de fragmentos de guaiacol em detrimento de siringol (BUURMAN et al, 2007a; BUURMAN; ROSCOE, 2011; MEHRABANIAN, 2013). A presença de compostos vinil contendo fenol (*4-vinylphenol*) é um indicativo da presença de lignina (material fresco) (ABELEND et al., 2011; MEHRABANIAN, 2013).

A lignina é o segundo biopolímero mais abundante na natureza, depois da celulose (MEHRABANIAN, 2013). É encontrada em paredes celulares de plantas, intimamente associada a hemiceluloses, e compõe cerca de 30% da biomassa das plantas (KILLOPS; KILLOPS, 2005, BROWN; CHANG, 2014). Em nosso estudo, compostos derivados da pirólise da lignina foram mais abundantes em horizontes superficiais (A) do que em horizontes mais profundos (Bh), devido à maior abundância de restos vegetais na superfície do solo e ao fato da degradação da lignina ocorrer em condições estritamente aeróbias (DE BOER et al., 2005).

Compostos derivados da pirólise da lignina tiveram maior influência na composição da comunidade bacteriana de horizontes mais superficiais sob regime de drenagem intermediária. Dentre os três perfis com drenagem intermediária, dois estavam localizados no interior da mata (trincheiras) com maior deposição de liteira, explicando a maior influência dos compostos da pirólise da lignina na estrutura da comunidade bacteriana nesses horizontes.

Poucos estudos relatam bactérias envolvidas na degradação da lignina, embora já se saiba que muitas bactérias do solo, principalmente as do filo Actinobacteria, reagem com a lignina tanto para solubilizar quanto para produzir metabólitos de alto peso molecular chamados APPL (*acid-precipitable polymeric lignin*) (CRAWFORD, 1978; BROWN; CHANG, 2014). A maioria dos trabalhos relacionados a esse tema, relata fungos basidiomicetos como os principais agentes degradadores da lignina por combustão oxidativa, utilizando uma gama de enzimas oxidativas como lacases (fenol oxidases dependentes de cobre), ligninas peroxidases (LiP's) e metaloenzimas como manganês peroxidases (MnP's) nesse processo (AUSEC et al., 2011, KERSTEN; CULLEN, 2007, BROWN; CHANG, 2014). Estudos já revelaram que algumas heme peroxidases bacterianas (também responsáveis pela oxidação da lignina) apresentavam menor poder oxidativo do que

as peroxidases presentes em fungos, sugerindo que essas enzimas não são as mais lignolíticas do sistema bacteriano (BROWN; CHANG, 2014). Curiosamente, muitas bactérias podem interagir de forma diferente com a lignina, utilizando-a como uma fonte de carbono aromático, ao invés de degradá-la rapidamente para acessar substratos de celulose e hemicelulose, como acredita-se ser o caso de muitos sistemas fúngicos (BROWN; CHANG, 2014).

Um recente estudo realizado com bactérias cultiváveis isoladas a partir de sedimentos e madeira submersa, recolhidas do fundo do mar, revelou a existência de um número considerável de bactérias, anteriormente não identificadas, capazes de metabolizar compostos aromáticos relacionados à lignina (OHTA et al., 2012). Nesse estudo, dentre 510 isolados, 208 foram capazes de metabolizar completamente ou parcialmente esses compostos. Esses isolados foram classificados nos filos Firmicutes (gênero *Bacillus* e *Paenibacillus*), Actinobacteria (gêneros *Cellulomonas*, *Rhodococcus* e *Microbacterium*), Bacteroidetes (gêneros *Algoriphagus* e *Leeuwenhoekiella*) e Proteobacteria (classes Alphaproteobacteria - gênero *Sulfitobacter* e *Novosphingobium* e Gammaproteobacteria - gênero *Pseudomonas* e *Shewanella*). Ao analisarem os metabólitos produzidos por esses isolados, observaram uma alta frequência de compostos provenientes do metabolismo oxidativo da lignina, além de detectarem isolados capazes também de produzir monômeros vinílicos aromáticos a partir do metabolismo não oxidativo da lignina (OHTA et al., 2012).

É bem documentado que os restos vegetais selecionam diferentes comunidades de micro-organismos, devido às diferenças nos componentes químicos, uma vez que a permanência de uma população no ecossistema fica condicionada à sua habilidade de adaptação e de resposta às características ambientais (GRAYSTON; PRESCOTT, 2005). Nesse contexto, alguns autores já consideram que a seletividade das espécies microbianas está relacionada com as diferenças na estrutura da lignina (BROWN; CHANG, 2014).

Nos Espodossolos estudados foram detectadas sequências afiliadas a Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes, embora os dois últimos em menores proporções (Tabelas Suplementares S7 e S8). Organismos desses filos podem estar intimamente associados a degradação da lignina nesses horizontes como sugeriu OHTA e colaboradores (2012), principalmente nos perfis de drenagem intermediária onde os compostos da pirólise da lignina influenciaram a comunidade

microbiana.

Muitas espécies de actinobactérias são capazes de degradar ligninas, principalmente ligninas de gramíneas (TUOMELA et al., 2000) sugerindo que esse grupo bacteriano pode estar envolvido na degradação da lignina nos horizontes superficiais de Espodossolos e podem ter importante papel na formação desses solos.

Rhodoplanes são também conhecidas como bactérias não púrpuras do enxofre. Essas bactérias possuem diversos modos de crescimento e são capazes de crescer sob condições fotoheterotróficas, fotoautotróficas ou quimioheterotróficas (ODA et al., 2002). Esta versatilidade metabólica confere uma ampla distribuição em ambientes naturais. Bactérias desse gênero já foram isolados de sedimentos superficiais aquáticos, lodo ativado, bem como de rios e lagos de água doce (HIRAISHI; UEDA, 1994), e agora foram encontradas sequências afiliadas a esse grupo em Espodossolos. Apesar de sua ampla ocorrência, a diversidade filogenética, genotípica e funcional desse grupo ainda é mal compreendido (ODA et al., 2002). Oda e colaboradores (2002) avaliando bactérias não púrpuras do enxofre em sedimentos aquáticos na Holanda através de pirosequenciamento, observaram sequências afiliadas a *Rhodomicrobium* *Rhodoplanes* capazes de degradar compostos aromáticos, como o benzoato. Táxons de *Rhodomicrobium* são capazes de associar os processos de redução de ferro e desnitrificação ao processo da fotossíntese e o seu papel na decomposição da lignina em regiões profundas do solo provavelmente envolve sua capacidade de fixar nitrogênio (DEANGELIS et al., 2011, de BOER et al., 2005). Sabendo da capacidade desse grupo de bactérias em degradar compostos aromáticos e lignina, e da alta ocorrência em Espodossolos, podemos sugerir a participação dessas bactérias na degradação desses compostos, contribuindo para a formação dos solos estudados.

Na RDA realizada com as amostras das manchas brancas e regiões adjacentes, observou-se maior influência de compostos nitrogenados, outros alifáticos e n-alquenos de cadeia longa, sendo as comunidades bacterianas das manchas e suas regiões adjacentes de perfis bem drenados mais influenciadas por compostos nitrogenados, enquanto outros alifáticos influenciaram mais as comunidades bacterianas das manchas de perfis bem drenados e n-alquenos de

cadeia longa influenciaram mais as comunidades de manchas e regiões adjacentes as manchas de perfis mal drenados (Figura 4.12B).

Acredita-se que grande parte dos compostos nitrogenados da matéria orgânica do solo sejam de origem microbiana, particularmente de aminoácidos e aminoaçúcares, embora alguns sejam de origem vegetal (MEHRABANIAN, 2013; KILLOPS; KILLOPS, 2005). A combinação de compostos aromáticos e compostos nitrogenados indica acúmulo de produtos de origem microbiana (BUURMAN; PETERSE; ALMENDROS, 2007; SCHELLEKENS; BUURMAN; PONTEVEDRA POMBAL, 2009). Dentre os compostos nitrogenados encontrados, os mais abundantes foram as piridinas (N3, N5, N8 e N10) e pirrois (N4, N6, N7, N9 e N15). Compostos nitrogenados heterocíclicos como piridinas e pirrois são componentes importantes da matéria orgânica do solo ((SCHULTEN; SCHNITZER, 1998). 4-Etil-2-metilpirrol (N9) foi o composto nitrogenado mais abundante em todas as amostras enquanto imidazóis (N1 e N12) foram os menos abundantes dos produtos de pirólise, que podem ser derivados da histidina (um aminoácido essencial para desenvolvimento de tecidos) (SCHULTEN; SCHNITZER, 1998). Buurman e colaboradores (2007) consideram piridinas de origem microbiana enquanto indóis são predominantemente de origem vegetal. Em contrapartida, pirrois podem ser tanto de origem vegetal como microbiana. Piridinas podem ser derivadas de alanina e polipeptídeos, bem como geradas a partir da decomposição microbiana de ligninas vegetais e outros compostos fenólicos na presença de NH_3 (BUURMAN et al., 2007). Por outro lado, pirrol pode ser derivado tanto da degradação de prolina e hidroxiprolina, como também da pirólise da porfirina, um componente essencial da molécula da clorofila de terrestres (SCHULTEN e SCHNITZER, 1998; MEHRABANIAN, 2013). Pesquisas anteriores (BUURMAN; PETERSE; ALMENDROS, 2007) indicam que em solos onde a matéria orgânica encontra-se fortemente decomposta, a maioria dos compostos nitrogenados é de origem microbiana.

Compostos considerados “outros alifáticos” são compostos alifáticos que não são derivados de ligninas ou fenóis. Dentre esses compostos, há tanto indicadores de material fresco quanto de material decomposto (BUURMAN; VIDAL-TORRADO; LOPES, 2013). Os n-alquenos de cadeia longa também influenciaram a comunidade microbiana tanto dentro quanto fora das manchas nos três regimes de drenagem avaliados. Buurman e colaboradores (2007) observaram que biopolímeros alifáticos

(n-alcanos de cadeia curta e cadeia longa) tendem a desaparecer nas manchas brancas, enquanto outros alifáticos e alquenos se acumulam em Espodossolos na Holanda, Bélgica e Alemanha. O mesmo pode ser observado nos Espodossolos deste estudo, onde n-alquenos e outros alifáticos influenciaram a comunidade bacteriana das manchas brancas e nas regiões adjacentes as manchas brancas em perfis mal drenados (Figura 4.12).

Um recente estudo demonstrou que espécies pertencentes à classe Betaproteobacteria (*Aquicola tertiaricarbonis*, *Methylibium petroleiphilum* e *Methylibium* sp.) são capazes de produzir alquenos enquanto degradam combustíveis (SCHÄFER et al, 2011). Coleman e colaboradores (2011) sequenciaram o genoma da actinobactéria *Nocardioides* sp. e observaram que esse gênero possui genes responsáveis pela oxidação de alquenos. Proteobacteria e Actinobacteria foram grupos frequentemente observados tanto em horizontes quanto em manchas brancas e solo adjacente às manchas. O potencial de produção e oxidação de alquenos sugere que Proteobacteria e Actinobacteria podem também contribuir para que esses compostos influenciem de maneira significativa a comunidade microbiana das manchas e regiões adjacentes a elas.

Por último, a RDA realizada com todas as amostras (horizontes, manchas e regiões adjacentes as manchas) revelou maior influência de esteróis, ésteres metílicos, n-alcanos de cadeia curta, pritenos e ligninas na estrutura bacteriana de amostras coletadas nos horizontes mais superficiais (A e AE) independente do regime de drenagem, enquanto fenóis e outros alifáticos influenciaram tanto a estrutura da comunidade bacteriana dos horizontes mais profundos (EB, BE e Bh1), quanto das manchas brancas e solo adjacente às manchas. Em turfeiras, as condições aeróbias favorecem o acúmulo de alcanos como produtos de pirólise (BUURMAN et al., 2006), o que pode explicar a maior influência de n-alcanos na comunidade bacteriana de horizontes mais superficiais (A e AE).

Fenóis podem ser produtos da pirólise de proteínas, lipídios ou ligninas (NIEROP; BUURMAN, 1999). Buurman e colaboradores (2007) estudando as manchas brancas de Espodossolos de regiões temperadas, observou perda de compostos fenólicos no interior das manchas. Nos Espodossolos desse estudo, os resultados não demonstraram decréscimo na concentração de fenólicos nas manchas brancas, em relação ao solo adjacente. Fenol (Ph1) foi o composto mais

abundante tanto nos horizontes quanto nas manchas brancas e adjacências.

Calvelo Pereira e colaboradores (2011) afirmam que fenóis podem se originar, em grande parte, da lignina, com uma pequena contribuição de fenóis derivados de carboidratos. Em manchas brancas e regiões adjacentes sob os três regimes de drenagens estudados não foram detectados produtos provenientes de polissacarídeos, sugerindo que, nesses locais, esses fenóis são originados da lignina. Em contrapartida, não podemos concluir o mesmo para os demais horizontes pois há produtos de polissacarídeos, podendo ser esses compostos fenólicos provenientes tanto da lignina quanto de carboidratos.

Lin e colaboradores (2014) utilizando metagenômica e ressonância magnética nuclear (RMN) para investigar o potencial metabólico microbiano para a decomposição da matéria orgânica e aquisição de nitrogênio (N) e fósforo (P) em solos de turfeira em Minnesota, nos Estados Unidos, observaram que genes que codificam lacases e oxigenases, envolvidas na degradação de compostos aromáticos, diminuíram em abundância relativa com a profundidade, enquanto a abundância relativa dos genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo de açúcares aminados aumentaram. Além disso, observaram que cerca de 65% dos genes que codificam lacase do tipo 3 (lcc3) foram atribuídos a quatro classes de Proteobacteria, e 12% foram associados a Acidobacteria. Nesse contexto, Proteobacteria pode desempenhar um papel mais importante na geração de fenol oxidases e degradação de aromáticos por lcc3 se comparado a Acidobacteria. Porém, Acidobacteria teve maior representação (50%) no conjunto de dados de sequência de genes que codificam lacases do tipo 4 (lcc4) do que Proteobacteria (37%). No entanto, pouco se sabe do papel ecológico das lcc4 oxidases comparado lcc3 oxidase. Nos Espodossolos desse estudo, sequências afiliadas a Acidobacteria e Proteobacteria foram abundantes em todas as amostras coletadas, inclusive em manchas e horizontes mais profundos, sugerindo uma participação efetiva desses grupos na degradação de compostos fenólicos nessas regiões.

Abundância de alcanos de cadeia longa como produtos de pirólise geralmente é indicativo de material vegetal (TEGELAAR et al., 1995). Compostos de cadeias medianas podem ser produtos de pirólise de biopolímeros vegetais como cutinas e suberinas, enquanto compostos de cadeia curta são frequentemente relacionados com a degradação de compostos de cadeias longas e adição de produtos microbianos (BUURMAN; PETERSE; ALMENDROS, 2007). Uma pequena

quantidade de n-alcanos de cadeia curta pode indicar uma rápida decomposição de compostos orgânicos (BUURMAN; ROSCOE, 2011). Nos Espodossolos estudados foram detectados (Tabela Suplementar S2) baixas quantidades de n-alcanos de cadeia curta em horizontes mais profundos (BE, EB, Bh1), dentro das manchas e nas regiões adjacentes às manchas em perfis bem drenados e mal drenados. Esses dados indicam que houve uma rápida decomposição de compostos orgânicos nesses horizontes e nas manchas. Valores mais altos desses compostos foram observados em horizontes dos perfis com drenagem intermediária bem como nas manchas e regiões adjacentes a elas. Como mencionado anteriormente, dois dos três perfis com drenagem intermediária, foram amostrados em trincheiras sob mata. Provavelmente nesses locais a decomposição de compostos orgânicos não ocorreu de maneira tão rápida a ponto de diminuir a quantidade de n-alcanos de cadeia curta. O mesmo pode ser observado em horizontes mais superficiais (A e AE) em perfis bem drenados e mal drenados (Tabela Suplementar S2).

Esteróis ou compostos fitoesteróis são constituintes de membranas lipídicas de plantas e ceras (OROS; SIMONEIT, 2001). Esteróis são importantes constituintes de plantas e são bem preservados em condições aeróbias em turfeiras, indicando que uma grande abundância de esteróis, indica a ocorrência de metabolismo aeróbio no local (SCHELLEKENS et al., 2009). Nos Espodossolos estudados, esteróis influenciaram a comunidade bacteriana em horizontes superficiais (A e AE) em todos os regimes de drenagem considerados, provavelmente devido a maior influência de plantas e raízes nesses locais. Pristenos (Al) também são compostos derivados de material vegetal e, por isso, são indicativos de material vegetal fresco no ambiente quando são encontrados em maior abundância (SCHELLEKENS et al., 2009; KILLOPS; KILLOPS, 2005) Pristenos influenciaram a comunidade microbiana em horizontes mais superficiais (A e AE), o que pode ser associado a maior abundância de material de origem vegetal nesses locais.

Figura 4.12 -Biplot de RDA da comunidade bacteriana nas amostras de solo e variáveis ambientais significativas (produtos da pirólise da matéria orgânica do solo das diferentes amostras), segundo o teste de permutação de Monte Carlo ($p < 0,05$). **(A)** RDA das amostras dos horizontes (A, AE, EB, BE, Bh1) dos Espodosolos sob os três regimes de drenagem estudados: WD - bem drenados (preto), ID - drenagem intermediária (azul) e PD - mal drenados (verde). Compostos mest = ésteres metílicos de ácidos graxos, lignins = compostos derivados da degradação de lignina **(B)** RDA das amostras das manchas (M) e regiões adjacentes (S) dos três regimes de drenagem estudados: WD - bem drenados (preto), ID - drenagem intermediária (azul) e PD - mal drenados (verde). Compostos N-comp = compostos nitrogenados, other aliph = outros alifáticos que não pertencem a n-alcanos nem a n-alquenos, n-alke C26-35 = n-alquenos de cadeia curta.

Figura 4.13 - Biplot de RDA da comunidade bacteriana nas amostras de solo e variáveis ambientais significativas (produtos da pirólise da matéria orgânica do solo das diferentes amostras), segundo o teste de permutação de Monte Carlo ($p < 0,05$). RDA das amostras coletadas nos horizontes (A, AE, EB, BE, Bh1), nas manchas (M) e regiões adjacentes as manchas (S) dos três regimes de drenagem estudados: WD - bem drenados (preto), ID - drenagem intermediária (azul) e PD - mal drenados (verde).

Referências

ABELENDA, M.S.; BUURMAN, P.; CAMPS ARBESTAIN, M.; KAAL, J.; MARTINEZ-CORTIZAS, A.; GARTZIA-BENGOETXEA, N.; MACÍAS, F. Comparing NaOH-extractable organic matter of acid forest soils that differ in their pedogenic trends: a pyrolysis-GC/MS study. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 62, p. 834-848, 2011.

ARONESTY, E. Comparison of sequencing utility programs. **The Open Bioinformatics Journal**, Sharjah, v.7, p. 1–8, 2013.

AUSEC, L.; VAN ELSAS, J.D.; MANDIC-MULEC, I. Two- and three-domain bacterial laccase-like genes are present in drained peat soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 43, p. 975–983, 2011.

BARNES, S.M.; TAKALA, S.L.; KUSKE, C.R. Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom Acidobacterium in the environment. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 1731–1737, 1999.

BAMFORTH, S.M.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, London, v. 80, n. 7, p. 723–736, 2005.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society, Series B**, London, v. 57, p. 289–300, 1995.

BORNEMAN, J.; SKROCH, P.W.; O'SULLIVAN, K.M.; PALUS, J.A.; RUMJANEK, N.G.; JANSEN, J.L.; NIENHUIS J.; TRIPLETT, E.W. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 62, n. 6, p. 1935–1945, 1996.

BROWN, M.E.; CHANG, M.C. Exploring bacterial lignin degradation. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v.19, p. 1–7, 2014.

BUURMAN, P.; PETERSE, F.; ALMENDROS MARTIN, G. Soil organic matter chemistry in allophanic soils: A pyrolysis-GC/MS study of a Costa Rican Andosol catena. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 58, p. 1330–1347, 2007.

BUURMAN, P.; ROSCOE, R. Different chemistry of free light and occluded light and extractable SOM fractions in soils of Cerrado, tilled and untilled fields, Minas Gerais, Brazil – a pyrolysis-GC/MS study. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 62, p. 253–266, 2011.

BUURMAN, P.; VIDAL-TORRADO, P.; LOPES, J. M. The podzol hydrosequence of Itaguaré, São Paulo, Brazil. 2. Soil organic matter chemistry by Pyrolysis-GC/MS. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 77, n. 4, p. 1307–1318, 2013.

BUURMAN, P.; NIEROP, K.G.J.; PONTEVEDRA POMBAL, X.; MARTINEZ CORTIZAS, A. Molecular chemistry by pyrolysis-GC/MS of selected samples of the Penido Vello peat deposit, Galicia, NW Spain. In: MARTINI, P.; MARTINEZ CORTIZAS, A.; CHESWORTH, W. (Ed.) **Peatlands**. Amsterdam: Elsevier, 2006. p. 217–240.

BUURMAN, P.; SCHELLEKENS, J.; FRITZE, H.; NIEROP, K.G.J. Selective depletion organic matter in mottled podzol horizons. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 607–621, 2007.

CALVELO PEREIRA, R.; KAAL, J.; CAMPS ARBESTAIN, M.; PARDO LORENZO, R.; AITKENHEAD, W.; HEDLEY, M.; MACIAS, F.; HINDMARSH, J.; MACIA-AGULLO, J.A. Contribution to characterisation of biochar to estimate the labile fraction of carbon. **Organic Geochemistry**, Oxford, v. 42, p.1331-1342, 2011.

CAPORASO, J.G.; LAUBER, C.L.; WALTERS, W.A.; BERG-LYONS, D.; HUNTLEY, J.; FIERER, N.; OWENS, S.M.; BETLEY, J.; FRASER, L.; BAUER, M.; GORMLEY, N.; GILBERT, J.A.; SMITH, G.; KNIGHT, R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME Journal**, New York, v. 6, p. 1621–1624, 2012.

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; COSTELLO, E.K.; FIERER, N.; PEÑA, A.G.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J.I.; HUTTLEY, G.A.; KELLEY, S.T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J.E.; LEY, R.E.; LOZUPONE, C.A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B.D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.R.; TURNBAUGH, P.J.; WALTERS, W.A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, New York, v.7, p. 335–336, 2010.

CARVALHAIS, L.C.; DENNIS, P.G.; TYSON, G.W.; SHENK, P. Applying metatranscriptomics to soil environments. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 91, n. 2, p. 246-251, 2012.

CHU, H.; FIERER, N.; LAUBER, C.L.; CAPORASO, J.G.; KNIGHT, R.; GROGAN, P. Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.12, p. 2998–3006, 2010.

COLEMAN, N.V.; WILSON, N.L.; BARRY, K.; BRETTIN, T.S.; BRUCE, D.C.; COPELAND, A.; DALIN, E.; DETTER, J.C.; DEL RIO, T.G.; GOODWIN, L.A.; HAMMON, N.M.; HAN, S.; HAUSER, L.J.; ISRANI, S.; KIM, E.; KYRPIDES, N.; LAND, M.L.; LAPIDUS, A.; LARIMER, F.W.; LUCAS, S.; PITLUCK, S.; RICHARDSON, P.; SCHMUTZ, J.; TAPIA, R.; THOMPSON, S.; TICE, H.N.; SPAIN, J.C.; GOSSETT, J.G.; MATTES, T.E. Genome sequence of the ethene- and vinyl chloride-oxidizing *Actinomyces* *Nocardioide* sp. Strain JS614. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 193, p. 3399-3400, 2011.

CRAWFORD, D.L. Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 35, p. 1041-1045, 1978.

DEANGELIS, K.M.; ALLGAIER, M.; CHAVARRIA, Y.; FORTNEY, J.L.; HUGENHOLTZ, P.; SIMMONS, B.; SUBLETTE, K.; SILVER, W.L.; HAZEN, T.C. Characterization of trapped lignin-degrading microbes in tropical forest soil. **PLoS ONE**, Cambridge, v. 6, e19306, 2011.

DE BOER, W.; FOLMAN, L.B.; SUMMERBELL, R.C.; BODDY, L. Living in a fungal world: Impact of fungi on soil bacterial niche development. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, p. 795–811, 2005.

- DIXON, R.; KHAN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature**, London, v. 2, p. 621-631, 2004
- DOWD, S.E.; ZARAGOZA, J.; RODRIGUEZ, J.R.; OLIVER, M.J.; PAYTON, P. R. WindowsNET network distributed basic local alignment search toolkit (W.ND-BLAST). **BMC Bioinformatics**, London, v. 6, p. 93, 2005.
- EDGAR, R.C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon sequences. **Nature Methods**, New York, v.10, p. 1–3, 2013.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solos**. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa de Solos – CNPS. 1997. 212 p. (EMBRAPA-CNPS. Documentos, 1).
- EMERSON, D.; RENTZ, J.A.; LILBURN, T.G.; DAVIS, R.E.; ALDRICH, H.; CHAN, C.; MOYER, C.L. A novel lineage of proteobacteria involved in formation of marine Fe-oxidizing microbial mat communities. **PLoS ONE**, Cambridge, v. 2, p. 667, 2007.
- EHRHARDT, C.J., CHU, V., BROWN, T., SIMMONS, T.L., SWAN, B.K., BANNAN, J., ROBERTSON, J.M. Use of fatty acid methyl ester profiles for discrimination of *Bacillus cereus* T-strain spores grown on different media. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, p. 1902–1912, 2010.
- EICHORST, S.A.; BREZNAK, J.A.; SCHMIDT, T.M. Isolation and characterization of soil bacteria that define terriglobus gen. nov., in the Phylum *Acidobacteria*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 8, p. 2708–2717, 2007.
- FAORO, H.; ALVES, A.C.; SOUZA, E.M.; RIGO, L.U.; CRUZ, L.M.; AL-JANABI, S.M.; MONTEIRO, R.A.; BAURA, V.A.; PEDROSA, F.O. Influence of soil characteristics on the diversity of bacteria in the Southern Brazilian Atlantic Forest. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, p. 4744–4749, 2010.
- FIERER, N.; BRADFORD, M.; JACKSON, R. Toward an ecological classification of soil bacteria. **Ecology**, Ithaca, v.88, p. 1354–1364, 2007.
- FRITZE, H.; PIETIKÄINEN, J.; PENNANEN, T. Distribution of microbial biomass and phospholipid fatty acids in Podzol profiles under coniferous forest. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 51, n. 4, p. 565-573, 2000.
- FISHER, W.D. On grouping for maximum homogeneity. **Journal of the American Statistical Association**, Boston, v. 53, p. 789-798, 1958.
- GERARDI, L.H.O.; MENDES, I.A. **Teoria, técnicas, espaços e atividades: temas de geografia contemporânea**. Rio Claro: UNESP, Programa de Pós-Graduação em Geografia; Associação de Geografia Teórica AGETEO, 2001. 432 p.
- GONZÁLEZ PÉREZ, M.; BUURMAN, P.; VIDAL-TORRADO, P.; MARTIN-NETO, L. Pyrolysis-gas chromatography/ mass spectrometry characterization of humic acids in Spodosols under Atlantic forest in Southeastern Brazil. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 76, p. 961–971, 2012.

GRAYSTON, S.J.; PRESCOTT, C.E. Microbial communities in forest floors under four tree species in coastal British Columbia. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 1157-1167, 2005.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 68, p. 669–685, 2004.

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 Bacteriology**, London, v. 44, p.665–673, 1994.

HUGENHOLTZ, P.; PITULLE, C.; HERSHBERGER, K.L.; PACE, N.R. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.180, p. 366-376, 1998.

INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS. **Compartimentação estrutural e evolução tectônica do estado de São Paulo**. São Paulo, 1989. 288 p.

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

JONES, R.M.; HEDRICH, S.; JOHNSON, D.B. Acidocella aromatica sp. nov.: an acidophilic heterotrophic alphaproteobacterium with unusual phenotypic traits. **Extremophiles**, Tokyo, v. 17, p. 841–850, 2013.

KAKIRDE, K.S.; PARSLEY, L.C.; LILES, M.R. Size does matter: application-driven approaches for soil metagenomics. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 1911-1923, 2010.

KERSTEN, P.; CULLEN D. Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Fungal Genetics and Biology**, Wisconsin, v. 44, n. 2, p. 77-87, 2007.

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

KILLOPS, S.; KILLOPS, V. **Introduction to organic geochemistry**. Malden: Blackwell, 2005. 393 p.

KUNITSKY, C.; OSTERHOUT, G.; SASSER, M. Identification of microorganisms using fatty acid methyl ester (FAME) analysis and the MIDI Sherlock® Microbial Identification System. In: MILLER, M.J. (Ed.). **Encyclopedia of rapid microbiological methods**. River Grove: Davis Healthcare International Publ., 2005. v. 3, p. 1-17.

LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.; BULL, R.C. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. In: VIDAL TORRADO, P.;

ALLEONI, L.R.R.; COOPER, M.; SILVA, A.P.; CARDOSO, E.J. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. v. 4, p. 43-84.

LEINWEBER, P.; SCHULTEN, H.R. Advances in analytical pyrolysis of soil organic matter. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, Amsterdam, v. 49, p. 359-383, 1999.

LIN, X.; GREEN, S.; TFAILY, M.M.; PRAKASH, O.; KONSTANTINIDIS, K.T.; PRAKASH, O.; KONSTANTINIDIS, K.T.; CORBETT, J.E.; CHANTON, J.P.; COOPER, W.T.; KOSTKA, J.E. Microbial community structure and activity linked to contrasting biogeochemical gradients in bog and fen environments of the Glacial Lake Agassiz Peatland. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.78, p. 7023–7031, 2012.

LIN, X.; TFAILY, M. M.; GREEN, S. J.; STEINWEG, J. M.; CHANTON, P.; IMVITTAYA, A.; CHANTON, J. P.; COOPER, W.; SCHADT, C.; KOSTKA, J. E. Microbial Metabolic Potential for Carbon Degradation and Nutrient (Nitrogen and Phosphorus) Acquisition in an Ombrotrophic Peatland. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 80, n.11, p. 3531-3540, 2014.

MEHRABANIAN, M. Molecular geochemistry of soil organic matter by pyrolysis gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) technique: a review. **Journal of Soil Science and Environmental Management**, Lagos, v. 4, p. 11-16, 2013.

MENDES, L.W.; KURAMAE, E.E.; NAVARRETE, A.A.; VAN VEEN, J.A.; TSAI, S.M. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. **ISME Journal**, New York, v. 8, p. 1577–1587, 2014.

MEISINGER, D.B.; ZIMMERMANN, J.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H.; WANNER, G.; SCHMID, M.; BENNETT, P.C.; ENGEL, A.S.; LEE, N.M. *In situ* detection of novel *Acidobacteria* in microbial mats from a chemolithoautotrophically based cave ecosystem (Lower Kane Cave, WY, USA). **Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 9, p.1523-1534, 2007.

MICHALSKA, K.; CHANG, C.; MACK, J.C.; ZERBS, S.; JOACHIMIAK, A.; COLLART, F.R. Characterization of transport proteins for aromatic compounds derived from lignin: benzoate derivative binding proteins. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 423, p. 555–575, 2012.

MUELLER, R.C.; PAULA, F.S.; MIRZA, B.S.; RODRIGUES, J.L.M.; NUSSLEIN, K.; BOHANNAN, B.J.M. Links between plant and fungal communities across a deforestation chronosequence in the Amazon rainforest. **The ISME Journal**, New York, v. 8, p.1548-1550, 2014.

NAETHER, A.; FOESEL, B.U.; NAEGELE, V.; WÜST, P.K.; WEINERT, J.; BONKOWSKI, M.; ALT, F.; OELMANN, Y.; POLLE, A.; LOHAUS, G.; GOCKEL, S.; HEMP, A.; KALKO, E.K.V.; LINSENMAIR, K.E.; PFEIFFER, S.; RENNER, S.; SCHÖNING, I.; WEISSER, W.W.; WELLS, K.; FISCHER, M.; OVERMANN, J.; FRIEDRICH, M.W. Environmental factors affect acidobacterial communities below

the subgroup level in grassland and forest soils. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, p.7398–7406, 2012.

NIEROP, K.G.J.; BUURMAN, P. Water-soluble organic matter in incipient podzols: accumulation in B horizons or in fibers? **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 50, p. 701-711, 1999.

NOLD, S.C.; ZHOU, J.; DEVOL, A.H.; TIEDJE, J.M. Pacific Northwest marine sediments contain ammonia-oxidizing bacteria in the subdivision of the Proteobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4532–4535, 2000.

ODA, Y.; WANDERS, W.; HUISMAN, L.A.; MEIJER, W.G.; GOTTSCHAL, J.C.; FORNEY, L.J. Genotypic and phenotypic diversity within species of purple nonsulfur bacteria isolated from aquatic sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 3467–3477, 2002.

OHTA, Y.; NISHI, S.; HAGA, T.; TSUBOUCHI, T.; HASEGAWA, R.; KONISHI, M.; NAGANO, Y.; TSURUWAKA, Y.; SHIMANE, Y.; MORI, K.; USUI, K.; SUDA, E.; TSUTSUI, K.; NISHIMOTO, A.; FUJIWARA, Y.; MARUYAMA, T.; HATADA, Y. Screening and phylogenetic analysis of deep-sea bacteria capable of metabolizing lignin- derived Aromatic compounds. **Open Journal Marine Science**, San Antonio, v. 2, p.177-187, 2012.

OROS, D.R.; SIMONEIT, B.R.T. Identification and emission factors of molecular tracers in organic aerosols from biomass burning. Part 1. Temperate climate conifers. **Applied Geochemistry**, Mainz, v.16, p. 1513–1544, 2001.

PARKS, D.H.; BEIKO, R.G. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, p. 715-721, 2010.

PYLRO, V.S.; ROESCH, L.F.W.; ORTEGA, J.M.; AMARAL, A.M.; TÓTOLA, M.R.; HIRSCH, P.R.; ROSADO, A.S.; GÓES-NETO, A.; SILVA, A.; ROSA, C.A.; MORAIS, D.K.; ANDREOTE, F.D.; DUARTE, G.F.; MELO, I.S.; SELDIN, L.; LAMBAIS, M.R.; HUNGRIA, M.; PEIXOTO, R.S.; KRUGER, R.H.; TSAI, S.M.; AZEVEDO, V. Brazilian Microbiome Project: revealing the unexplored microbial diversity challenges and prospects. **Microbial Ecology**, New York, v. 67, p. 237-241, 2014.

QUAIL, M.; SMITH, M.E.; COUPLAND, P.; OTTO, T.D.; HARRIS, S.R.; CONNOR, T.R.; BERTONI, A.; SWERDLOW, H.P.; GU, Y. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion torrent, pacific biosciences and illumine MiSeq sequencers. **BMC Genomics**, London, v. 13, p. 341, 2012.

RADAJEWSKI, S.; INESON, P.; PAREKH, N.R.; MURRELL, J.C. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. **Letters to Nature**, London, v. 403, p. 646-649, 2000.

ROSS, J.L.S.; MOROZ, I.C. **Mapa geomorfológico do estado de São Paulo**. São Paulo: IPT; FAPESP, 1997. 64 p.

SANDAA, R-A.; TORVISK, V.; ENGER, Ø. Influence of long-term heavy-metal contamination on microbial communities in soil. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 287-295, 2001.

SCHÄFER, F.; MUZICA, L.; SCHUSTER, J.; TREUTER, N.; ROSELL, M.; HARMS, H.; MÜLLER, R.H.; ROHWERDER, T. Formation of alkenes via degradation of tert-alkyl ethers and alcohols by *Aquicola tertiaricarbonis* L108 and *Methylibium* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, p.5981-5987, 2011.

SCHELLEKENS, J.; BUURMAN, P.; PONTEVEDRA POMBAL, X. Selecting parameters for environmental interpretation of peat molecular chemistry: a pyrolysis-GC/MS study. **Organic Geochemistry**, Oxford, v. 40, p. 678–691, 2009.

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 and Environmental Microbiology**, Washington, v.75,p.7537–7541, 2009.

SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. The chemistry of soil organic nitrogen: a review. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 26, n. 1, p. 1-15, 1997.

SILVA, K.J.; VIDAL-TORRADO, P.; LAMBAIS, M.R. Bacterial and archaeal communities in bleached mottles of tropical podzols. **Microbial Ecology**, New York, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25219446>> Acesso: 01 nov. 2014.

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GOMMANS, S.; VAN DEN BROEK, J.; VAN MIL, S.; WERNARS, K. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 5, p. 2284–2291, 2001.

SPAIN, A.M.; KRUMHOLZ, L.R.; ELSHAHED, M.S. Abundance, composition, diversity and novelty of soil proteobacteria. **ISME Journal**, New York,v. 3, p. 992–1000, 2009.

TEGELAAR, E.W.; HOLLMAN, G.; VANDERVEGT, P.; LEEUW, J.W.; HOLLOWAY, P.J. Chemical characterization of the periderm tissue of some angiosperm species: Recognition of an insoluble, nonhydrolyzable, aliphatic biomacromolecule (suberan). **Organic Geochemistry**, Oxford, v. 23, p. 239-251, 1995.

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

TROPPEMAIR, H. **Sistemas, geossistemas, geossistemas paulistas, ecologia da paisagem**.Rio Claro: [s.n], 2004. 130 p.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITÄVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 72, p. 169–183, 2000.

van BREEMEN, N.; BUURMAN, P. **Soil formation**. 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic, 2002. 404p.

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

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos Espodossolos estudados, as comunidades bacterianas nos horizontes e manchas brancas não foram influenciadas pelos regimes de drenagem considerados, nem aos atributos químicos e físicos avaliados. No geral, as estruturas das comunidades bacterianas foram afetadas pela composição molecular da matéria orgânica presente nos diferentes ambientes.

A estrutura da comunidade de bactérias dos horizontes mais superficiais (A e AE) são distintas da dos horizontes mais profundos (EB, BE e Bh) estando intimamente associada aos compostos da pirólise da ligninas, alcanos de cadeia curta, ésteres metílicos e esteróis em horizontes superficiais e compostos fenólicos e alifáticos nos horizontes mais profundos. Por outro lado, a comunidade bacteriana de dentro das manchas e suas regiões adjacentes são mais similares, porém essas populações específicas provavelmente estão atuando de forma diferenciada na degradação seletiva da MO nas manchas.

A diversidade da comunidade bacteriana apresentou variações ao longo do perfil de Espodossolos independente do regime de drenagem. Acidobacteria, Actinobacteria e Proteobacteria foram os grupos predominantes tanto nos horizontes quanto nas manchas brancas e solo adjacente às manchas. Actinobacteria e Alphaproteobacteria mostraram associação positiva com derivados da pirólise da lignina, os quais foram mais abundantes em horizontes superficiais (A e AE) enquanto Acidobacteria mostrou associação positiva com compostos mais recalcitrantes encontrados em horizontes mais profundos como o Bh, sugerindo um papel específico e diferenciado de cada grupo bacteriano na degradação de compostos orgânicos específicos.

O fato do solo adjacente às manchas ter comunidades bacterianas mais similares às manchas do que ao horizonte onde as manchas se desenvolvem, sugere que o solo adjacente pode estar sendo transformado em mancha, ou seja, o processo de degradação seletiva da MO já começou, muito embora visualmente não se perceba.

Nesse contexto, os grupos bacterianos observados podem estar associados ao processo de formação do horizonte E, pois podem participar da degradação de compostos orgânicos específicos observados nos horizontes Bh dos Espodossolos desse estudo.

ANEXOS

Tabela S1 - Atributos químicos dos Espodossolos estudados, de acordo com os 3 regimes de drenagem nos locais de amostragem (bem drenados; drenagem intermediária e mal-drenados)

Atributos Químicos	Perfis bem drenados							Perfis com drenagem Intermediária							Perfis mal drenados						
	Horizontes							Horizontes							Horizontes						
	A	AE	EB	BE	Bh1	M ¹	S ²	A	AE	EB	BE	Bh1	M ¹	S ²	A	AE	EB	BE	Bh1	M ¹	S ¹
pH (H2O)	4.61	4.70	4.58	4.52	4.38	ND*	ND	4.20	4.42	4.25	4.32	4.10	ND	ND	4.95	5.14	4.90	4.81	4.68	ND	ND
pH (CaCl2)	3.29	3.66	3.62	3.68	3.63	ND	ND	3.22	3.55	3.36	3.29	3.36	ND	ND	3.54	3.7	3.87	3.65	3.72	ND	ND
Ca ⁺² (cmolc/kg)	0.16	0.12	0.14	0.11	0.14	ND	ND	0.56	0.18	0.14	0.14	0.15	ND	ND	0.21	0.13	0.16	0.14	0.18	ND	ND
Mg ⁺² (cmolc/kg)	0.22	0.11	0.09	0.09	0.08	ND	ND	0.27	0.09	0.08	0.09	0.09	ND	ND	0.16	0.08	0.08	0.07	0.1	ND	ND
Na ⁺ (cmolc/kg)	0.46	0.81	0.25	0.28	0.36	0.03	0.04	1.33	0.17	0.24	0.13	0.42	0.64	1.17	0.55	0.09	0.12	0.23	0.17	0.06	0.06
K ⁺ (cmolc/kg)	0.28	0.16	0.1	0.1	0.12	0.02	0.02	0.33	0.08	0.1	0.08	0.12	0.03	0.04	0.28	0.1	0.07	0.08	0.08	0.02	0.52
Al ⁺³ (cmolc/kg)	0.41	0.14	0.29	0.56	0.97	0.60	0.79	0.51	0.15	0.29	0.38	1.32	0.70	1.04	0.19	0.07	0.13	0.38	0.94	0.51	8.54
H+Al (cmolc/kg)	2.29	1.29	2.09	5.49	4.73	ND	ND	3.75	4.04	1.85	0.96	2.79	ND	ND	1.99	2.64	3.02	2.39	2.9	ND	ND
MO (g/kg)	28.52	3.37	1.81	5.9	11.67	ND	ND	61.25	9.03	5.42	3.25	13.6	ND	ND	10.59	1.08	1.08	6.02	13.54	ND	ND
C_org (g/kg)	16.58	1.96	1.05	3.43	6.79	ND	ND	35.61	5.25	3.15	1.89	7.91	ND	ND	6.16	0.63	0.63	3.5	7.87	ND	ND
Fe _t (g/kg)	0.02	0.02	0.04	0.06	0.05	ND	ND	0.02	0.01	0.02	0.04	0.04	ND	ND	0.02	0.01	0	0.01	0.05	ND	ND
Al _t (g/kg)	0.17	0.15	0.24	0.43	0.7	ND	ND	0.14	0.09	0.21	0.23	0.58	ND	ND	0.08	0.06	0.08	0.25	0.86	ND	ND
SB (cmolc/kg)	0.66	0.39	0.33	0.3	0.34	ND	ND	1.16	0.35	0.32	0.31	0.36	ND	ND	0.64	0.31	0.31	0.29	0.36	ND	ND
T (cmolc/kg)	2.95	1.68	2.42	5.8	5.07	ND	ND	4.91	4.39	2.17	1.27	3.16	ND	ND	2.63	2.95	3.33	2.68	3.26	ND	ND
V (%)	36.56	23.68	13.99	5.61	8.47	ND	ND	26.11	7.95	14.85	24.31	15.76	ND	ND	24.36	10.55	14.23	11.64	15.11	ND	ND
M (%)	25.85	8.39	11.98	11.09	23.74	ND	ND	10.55	3.4	12.48	29.96	62.61	ND	ND	7.37	2.37	4.54	14.56	46.45	ND	ND
N_total (%)	0.21	0.08	0.06	0.05	0.07	0.05	0.06	0.25	0.07	0.05	0.06	0.09	0.05	0.06	0.11	0.08	0.05	0.05	0.08	0.06	0.07
C_total (%)	5.33	1.06	0.23	0.35	0.61	0.30	0.42	7.34	0.67	0.37	0.35	1.31	0.33	0.42	1.41	0.34	0.29	0.35	0.81	0.55	0.99
Relação C/N	24.87	13.2	4.01	7.24	8.62	6.33	6.94	29.44	9.22	7.41	6.43	15.02	6.98	7.07	13.16	4.54	6.07	7.78	10.67	9.06	13.99

Valores são médias *ND = Não determinado; ¹M = amostras das manchas; ²S = amostras do solo adjacente às manchas; Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺, Al³⁺ = cálcio, magnésio, sódio, potássio e alumínio trocáveis; H+Al= acidez potencial; MO= matéria orgânica; C_org= carbono orgânico; Fe_t = ferro total; Al_t = alumínio total; SB = soma de bases (Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺ e Na⁺); T= Capacidade de troca de cátions efetiva; V= porcentagem de saturação por bases; m = saturação da T efetiva por Al³⁺; N_total = nitrogênio total; C_total = carbono total

Tabela S2–Abundância relativa (%) dos compostos orgânicos identificados através da análise de pirólise da matéria orgânica do solo em cada horizonte (A, AE, EB, BE, Bh1), manchas (M) e regiões adjacentes as manchas (S) nos três regimes de drenagem estudados (WD – bem drenados, ID – drenagem intermediária, PD – mal drenados)

Atributos Químicos	Perfis bem drenados							Perfis com drenagem Intermediária							Perfis mal drenados						
	Horizontes							Horizontes							Horizontes						
	A	AE	EB	BE	Bh1	M ¹	S ²	A	AE	EB	BE	Bh1	M ¹	S ²	A	AE	EB	BE	Bh1	M ¹	S ¹
n-alka C7-25	7,45	8,00	2,16	2,93	ND	3,09	2,97	9,21	10,9	10,47	10,47	10,62	4,24	5,12	6,32	9,08	2,40	2,87	3,08	2,24	2,18
n-alka C26-35	1,38	1,64	14,92	0,51	ND	1,21	0,88	2,35	4,53	1,46	1,46	2,49	1,18	1,33	1,03	4,05	2,41	0,82	0,39	0,89	0,93
n-alke C7-25	4,82	5,57	1,69	2,40	ND	2,60	2,06	6,56	15,2	6,50	6,50	9,40	4,98	4,26	4,30	8,79	2,76	2,38	2,55	1,68	1,37
n-alke C26-35	0,86	1,27	3,54	0,35	ND	0,37	0,22	1,43	3,53	0,92	0,92	1,79	0,53	0,79	0,76	2,81	0,68	0,24	0,21	0,11	0,15
other aliph	0,03	0,04	0,00	0,01	ND	0,11	0,09	0,04	0,14	0,09	0,09	0,11	0,07	0,09	0,02	0,05	0,00	0,00	0,00	0,04	0,08
arom	19,62	25,33	21,33	36,87	ND	18,9	19,9	21,10	16,2	34,01	34,01	28,08	19,5	23,06	25,35	17,79	37,60	36,58	32,79	24,7	20,97
alkylb	1,61	1,63	0,90	1,45	ND	0,00	0,00	1,57	1,25	2,09	2,09	1,81	0,00	0,00	1,83	1,58	1,25	1,31	1,58	0,00	0,00
benzof	0,91	0,92	0,82	1,85	ND	1,18	1,52	0,84	0,58	1,05	1,05	0,90	1,68	1,65	0,98	0,71	1,63	1,44	2,24	2,05	2,46
Fatty acids	0,07	0,10	0,06	0,04	ND	0,67	0,70	0,32	0,21	0,24	0,24	0,23	0,52	0,71	0,49	0,04	0,06	0,07	0,06	0,42	0,62
mket	0,37	0,61	0,19	0,19	ND	0,26	0,20	0,64	1,05	0,67	0,67	0,79	0,14	0,21	0,49	1,00	0,12	0,21	0,20	0,29	0,08
lignins	9,94	4,43	0,67	1,18	ND	3,30	4,47	9,49	7,99	2,23	2,23	4,15	7,95	6,65	5,07	2,70	0,56	0,49	0,77	3,96	6,09
mest	0,38	0,50	0,03	0,03	ND	0,42	0,32	0,52	0,38	0,05	0,05	0,16	0,16	0,17	0,52	0,30	0,05	0,03	0,01	0,07	0,11
N-comp	11,41	12,33	8,96	18,36	ND	18,6	17,0	9,37	6,13	9,33	9,33	8,26	13,8	13,13	14,02	12,76	17,80	14,99	18,54	13,6	14,6
polyar	5,40	5,40	3,29	5,67	ND	4,39	4,90	5,10	3,46	6,76	6,76	5,66	4,82	6,02	5,58	4,01	5,36	5,44	6,76	6,22	6,12
phenols	22,02	19,50	10,23	20,38	ND	13,0	15,8	16,66	9,97	16,39	16,39	14,25	14,1	15,37	17,79	18,09	14,29	14,53	20,97	20,8	21,00
Al	0,20	0,49	0,03	0,05	ND	0,00	0,00	0,68	7,00	1,19	1,19	3,12	0,00	0,00	0,19	0,96	0,04	0,04	0,02	0,00	0,00
polysac	13,30	11,77	31,14	7,66	ND	0,00	0,00	13,60	9,52	6,21	6,21	7,31	0,00	0,00	14,92	13,89	12,94	18,48	9,80	0,00	0,00
sterols	0,23	0,46	0,03	0,07	ND	0,00	0,00	0,49	1,93	0,35	0,35	0,88	0,00	0,00	0,34	1,38	0,06	0,06	0,03	0,00	0,00

Valores são médias.

n-alka C7-25 = n-alcanos de cadeia curta; n-alka C26-35 = n-alcanos de cadeia longa; n-alke C7-25 = n-alquenos de cadeia curta; n-alke C26-35 = n-alquenos de cadeia longa; other aliph = outros alifáticos; arom = aromáticos; alkylb = alquilbenzenos; benzof = benzofuranos; fatty acids = ácidos graxos; mket = metilcetonas; lignins = ligninas; mest = ésteres metílicos de ácidos graxos; N-comp = componentes nitrogenados; phenols = fenóis; polyar = poliaromáticos; Al = pristeno; polysac = polissacarídeos; sterols = esteróis

Tabela S3–Número de UTOs, diversidade filogenética, estimativa de riqueza (Chao1), índices de diversidade (Shannon e Recíproca de Simpson) e cobertura de amostragem calculados a partir da análise de sequências da região V4 do rRNA 16S de Bacteria de amostras de Espodossolos nos diferentes regimes de drenagem (WD – bem drenados, ID – drenagem intermediária, PD – mal drenados, nos horizontes A, AE, EB, BE e Bh1 e nas manchas (M) e nas regiões adjacentes as manchas (S)

	Numero de UTOs	Diversidade Filogenética	Chao1	Shannon	Recíproca de Simpson	Cobertura
WDA	1629	95.777	3070.125 (2995.750; 3161.658)	8.031	80.977	0.994
WDAE	1973	114.199	3932.906 (3851.02; 4034.02)	8.412	79.011	0.994
WDEB	1823	110.735	3943.157 (3858.709; 4045.841)	8.378	54.110	0.995
WDBE	2040	116.578	4677.001 (4601.126; 4769.079)	7.813	93.150	0.997
WDBh1	2022	120.179	3163.262 (3070.167; 3280.556)	7.809	60.634	0.977
WDM	2621	128.429	4198.515 (3915.94; 4481.09)	8.454	52.722	0.992
WDS	2532	122.88	4097.289 (4346.156; 3848.422)	8.228	34.797	0.993
IDA	1534	90.708	3562.170 (3473.950; 3669.862)	7.957	65.490	0.994
IDAE	1823	104.518	4049.753 (3981.465; 4136.145)	8.057	57.511	0.999
IDEB	1643	97.509	2942.934 (2859.440; 3046.057)	8.003	106.330	0.994
IDBE	2108	120.088	2909.832 (2836.641; 3000.977)	8.463	85.133	0.989
IDBh1	1557	93.654	3675.631 (3594.976; 3775.123)	8.081	91.488	0.997
IDM	2624	132.205	4161.215 (3887.029; 4435.401)	8.889	71.841	0.983
IDS	2642	134.48	4305.373 (4077.917; 4532,829)	8.934	77.124	0.987
PDA	1594	95.019	2667.649 (2588.756; 2765.944)	7.322	40.758	0.995
PDAE	1609	99.257	2777.371 (2691.023; 2884.145)	6.841	22.719	0.995
PDEB	1377	92.621	2939.683 (2869.438; 3028.897)	6.725	41.950	0.998
PDBE	1236	81.325	2941.011(2868.641; 3032.116)	7.254	23.375	0.998
PDBh1	1414	94.677	2299.628 (2229.232; 2390.577)	6.065	14.766	0.995
PDM	2830	127.155	4029.188 (3842.869;4215.507)	8.338	47.629	0.988
PDS	2845	128.295	4043.723 (3777,282;4310.164)	8.389	42.899	0.988

Figura S1 - Curvas de rarefação indicando o número estimado de UTOs nos horizontes (A) e nas manchas e regiões adjacentes as manchas (B) nos três diferentes regimes de drenagem (WD – bem drenados, ID – drenagem intermediária, PD – mal drenados) em função do esforço de sequenciamento

Tabela S4- Correlação de Spearman entre os grupos filogenéticos encontrados nas amostras de horizontes (A, AE, EB, BE, Bh1) dos diferentes perfis de Espodossolos e os parâmetros químicos do solo: pH, Ca (cálcio), Mg (magnésio), Na (sódio), K (potássio), P (fósforo), Al³⁺ (alumínio trocável), H+Al (acidez potencial), MO (matéria orgânica), C_org (carbono orgânico), Fet (ferro total), Alt (alumínio total), m (saturação por alumínio), N (nitrogênio), C (carbono)

(continua)

Grupos Filogenéticos		Atributos Químicos														
		pH	Ca	Mg	Na	K	P	Al ³⁺	H+Al	MO	Corg	Fet	Alt	m	N	C
Unassigned	R	0.344	-0.222	0.0673	0.0675	-0.028	0.0731	0.0508	-0.0127	-0.0857	-0.0844	-0.0395	0.289	0.142	-0.09	-0.076
	p-value	0.0371	0.185	0.69	0.689	0.868	0.666	0.764	0.939	0.611	0.617	0.816	0.0826	0.399	0.594	0.652
AD3	R	0.261	-0.254	-0.156	-0.291	-0.0394	-0.27	<u>-0.455</u>	-0.312	<u>-0.472</u>	<u>-0.458</u>	-0.124	-0.185	-0.183	<u>-0.394</u>	<u>-0.411</u>
	p-value	0.118	0.128	0.353	0.0803	0.816	0.106	<u>0.00485</u>	0.0596	<u>0.00335</u>	<u>0.00458</u>	0.463	0.27	0.276	<u>0.0161</u>	<u>0.0118</u>
Acidobacteria	R	-0.159	-0.241	<u>-0.41</u>	-0.237	<u>-0.401</u>	0.17	<u>0.548</u>	0.0609	-0.0805	-0.0945	0.289	<u>0.598</u>	<u>0.554</u>	-0.259	-0.252
	p-value	0.344	0.15	<u>0.012</u>	0.157	<u>0.0142</u>	0.312	<u>0.00049</u>	0.718	0.634	0.575	0.0821	<u>0.000101</u>	<u>0.000415</u>	0.12	0.131
Actinobacteria	R	-0.0438	0.255	<u>0.543</u>	0.393	<u>0.575</u>	-0.153	<u>-0.4</u>	-0.0968	0.146	0.152	-0.0268	<u>-0.445</u>	<u>-0.415</u>	<u>0.375</u>	<u>0.362</u>
	p-value	0.795	0.127	<u>0.00056</u>	0.0164	<u>0.000218</u>	0.365	<u>0.0146</u>	0.567	0.388	0.367	0.874	<u>0.00595</u>	<u>0.0109</u>	<u>0.0224</u>	<u>0.0278</u>
Armatimonadetes	R	0.0112	0.224	<u>0.565</u>	<u>0.475</u>	<u>0.672</u>	-0.067	-0.134	0.163	<u>0.439</u>	<u>0.445</u>	-0.0567	<u>-0.342</u>	-0.261	<u>0.619</u>	<u>0.586</u>
	p-value	0.947	0.182	<u>0.00029</u>	<u>0.00316</u>	<u>0.000003</u>	0.692	0.425	0.334	<u>0.00685</u>	<u>0.00598</u>	0.737	<u>0.0383</u>	0.119	<u>0.000046</u>	<u>0.00015</u>
Bacteroidetes	R	0.072	0.0556	0.00554	-0.067	-0.148	-0.131	-0.14	0.123	-0.143	-0.133	-0.313	0.0364	-0.132	-0.171	-0.0528
	p-value	0.67	0.743	0.974	0.692	0.379	0.439	0.405	0.466	0.396	0.429	0.0594	0.83	0.435	0.31	0.754
Chlamydiae	R	-0.304	-0.251	-0.0503	0.0722	-0.0569	<u>-0.449</u>	0.267	0.312	0.00787	0.0154	0.177	<u>0.516</u>	0.224	-0.253	-0.177
	p-value	0.0674	0.133	0.766	0.669	0.736	<u>0.00555</u>	0.11	0.0604	0.963	0.927	0.292	<u>0.00115</u>	0.18	0.13	0.291
Chlorobi	R	0.187	0.172	-0.0314	-0.11	-0.275	<u>0.339</u>	0.0937	0.102	0.00781	0.00781	-0.0781	0.203	0.0626	-0.0312	0.0312
	p-value	0.265	0.306	0.853	0.515	0.0983	<u>0.04</u>	0.579	0.548	0.963	0.963	0.643	0.227	0.711	0.853	0.853
Chloroflexi	R	<u>0.529</u>	-0.295	-0.219	-0.184	-0.115	-0.0201	-0.181	0.24	<u>-0.418</u>	<u>-0.411</u>	0.18	-0.0594	-0.207	<u>-0.35</u>	<u>-0.474</u>
	p-value	<u>0.00084</u>	0.0756	0.191	0.274	0.494	0.905	0.282	0.152	<u>0.0103</u>	<u>0.0117</u>	0.284	0.726	0.218	<u>0.0338</u>	<u>0.0032</u>
Cyanobacteria	R	-0.285	-0.302	-0.173	-0.103	-0.0587	<u>-0.481</u>	-0.216	-0.243	-0.226	-0.233	-0.117	-0.0958	0.0227	-0.179	-0.197
	p-value	0.0869	0.0692	0.304	0.543	0.729	<u>0.0027</u>	0.198	0.146	0.178	0.163	0.488	0.571	0.893	0.287	0.241
Elusimicrobia	R	-0.145	-0.309	<u>-0.369</u>	-0.232	-0.255	0.0114	0.293	0.000248	-0.27	-0.273	0.165	<u>0.376</u>	<u>0.364</u>	-0.255	<u>-0.345</u>
	p-value	0.391	0.0627	<u>0.0249</u>	0.166	0.126	0.946	0.0783	0.998	0.105	0.102	0.327	<u>0.0221</u>	<u>0.0271</u>	0.127	<u>0.0367</u>

Dados sublinhados tracejados – correlação positiva; Dados sublinhados – correlação negativa (p<0,05)

Tabela S4- Correlação de Spearman entre os grupos filogenéticos encontrados nas amostras de horizontes (A, AE, EB, BE, Bh1) dos diferentes perfis de Espodossolos e os parâmetros químicos do solo: pH, Ca (cálcio), Mg (magnésio), Na (sódio), K (potássio), P (fósforo), Al³⁺ (alumínio trocável), H+Al (acidez potencial), MO (matéria orgânica), C_org (carbono orgânico), Fet (ferro total), Alt (alumínio total), m (saturação por alumínio), N (nitrogênio), C (carbono)

(continuação)

Grupos Filogenéticos		Atributos Químicos														
		pH	Ca	Mg	Na	K	P	Al ³⁺	H+Al	MO	Corg	Fet	Alt	m	N	C
FCPU426	R	-0.0596	-0.0381	0.161	0.22	<u>0.374</u>	-0.0166	-0.165	0.0376	0.0889	0.0889	0.127	-0.188	-0.181	0.151	0.181
	p-value	0.725	0.821	0.338	0.189	<u>0.0229</u>	0.921	0.328	0.823	0.599	0.599	0.453	0.264	0.281	0.37	0.28
Firmicutes	R	0.243	-0.13	-0.0931	0.00317	0.0702	-0.132	<u>-0.582</u>	0.116	-0.261	-0.244	<u>-0.421</u>	<u>-0.519</u>	<u>-0.606</u>	-0.271	-0.287
	p-value	0.147	0.442	0.581	0.985	0.678	0.434	<u>0.00018</u>	0.493	0.119	0.144	<u>0.00967</u>	<u>0.0011</u>	<u>0.000076</u>	0.104	0.0847
Firmicutes <i>Clostridia</i>	R	-0.0725	0.019	-0.108	-0.075	-0.171	-0.29	-0.127	0.191	-0.0807	-0.0725	<u>-0.387</u>	-0.0455	-0.154	-0.185	-0.137
	p-value	0.668	0.91	0.522	0.657	0.309	0.0808	0.452	0.256	0.633	0.668	<u>0.0183</u>	0.787	0.362	0.272	0.416
Fusobacteria	R	0.0318	0.127	-0.0798	-0.189	-0.252	-0.155	-0.0409	0.144	-0.103	-0.107	-0.0245	0.0289	-0.0734	-0.198	-0.0774
	p-value	0.851	0.452	0.636	0.26	0.132	0.358	0.809	0.392	0.541	0.525	0.885	0.864	0.663	0.238	0.646
GAL15	R	<u>0.354</u>	<u>-0.358</u>	<u>-0.523</u>	<u>-0.466</u>	<u>-0.557</u>	0.262	-0.0978	0.0181	<u>-0.483</u>	<u>-0.476</u>	-0.272	0.0666	0.0143	<u>-0.573</u>	<u>-0.612</u>
	p-value	<u>0.0319</u>	<u>0.0298</u>	<u>0.00098</u>	<u>0.00383</u>	<u>0.000374</u>	0.116	0.563	0.915	<u>0.00259</u>	<u>0.0031</u>	0.102	0.693	0.933	<u>0.000233</u>	<u>0.00006</u>
Gemmatimonadetes	R	0.0378	-0.14	<u>-0.334</u>	-0.203	<u>-0.374</u>	0.00849	-0.0662	-0.0751	<u>-0.567</u>	<u>-0.558</u>	0.0741	0.239	0.0448	<u>-0.58</u>	<u>-0.596</u>
	p-value	0.823	0.408	<u>0.0437</u>	0.226	<u>0.0227</u>	0.959	0.695	0.656	<u>0.00028</u>	<u>0.00036</u>	0.66	0.154	0.791	<u>0.000186</u>	<u>0.00011</u>
NC10	R	-0.104	-0.247	-0.217	-0.0702	-0.0758	0.0586	0.206	0.118	0.0628	0.0628	-0.193	0.0661	0.127	0.205	0.0977
	p-value	0.538	0.139	0.196	0.678	0.653	0.729	0.22	0.484	0.71	0.71	0.25	0.695	0.453	0.222	0.563
Nitrospirae	R	0.184	<u>-0.373</u>	<u>-0.479</u>	<u>-0.394</u>	<u>-0.547</u>	0.169	0.184	0.162	-0.313	-0.312	-0.0934	<u>0.329</u>	0.22	<u>-0.496</u>	<u>-0.486</u>
	p-value	0.273	<u>0.0233</u>	<u>0.00285</u>	<u>0.0162</u>	<u>0.000506</u>	0.315	0.272	0.335	0.0592	0.06	0.58	<u>0.0471</u>	0.19	<u>0.00193</u>	<u>0.00246</u>
Planctomycetes	R	0.0499	0.176	0.275	0.155	0.262	-0.236	-0.281	0.241	0.202	0.2	-0.213	<u>-0.376</u>	<u>-0.402</u>	0.213	0.201
	p-value	0.768	0.296	0.0983	0.358	0.116	0.159	0.0913	0.149	0.229	0.234	0.205	<u>0.022</u>	<u>0.0139</u>	0.204	0.231
Proteobacteria	R	<u>-0.465</u>	0.208	0.255	0.222	0.0555	-0.294	0.0238	0.107	0.198	0.189	-0.0734	0.0783	-0.0203	0.05	0.183
	p-value	<u>0.00393</u>	0.215	0.127	0.184	0.743	0.0775	0.888	0.527	0.238	0.26	0.663	0.643	0.905	0.767	0.277
Proteobacteria <i>Alphaproteobacteria</i>	R	<u>-0.436</u>	0.182	0.305	<u>0.33</u>	<u>0.329</u>	<u>-0.328</u>	0.0206	0.0834	<u>0.353</u>	<u>0.351</u>	-0.0724	-0.0797	-0.0505	0.209	0.305
	p-value	<u>0.00716</u>	0.28	0.0665	<u>0.0464</u>	<u>0.0467</u>	<u>0.0477</u>	0.903	0.621	<u>0.0321</u>	<u>0.0333</u>	0.669	0.637	0.765	0.214	0.0665

Dados sublinhados tracejados – correlação positiva; Dados sublinhados – correlação negativa (p<0,05)

Tabela S4- Correlação de Spearman entre os grupos filogenéticos encontrados nas amostras de horizontes (A, AE, EB, BE, Bh1) dos diferentes perfis de Espodosolos e os parâmetros químicos do solo: pH, Ca (cálcio), Mg (magnésio), Na (sódio), K (potássio), P (fósforo), Al³⁺ (alumínio trocável), H+Al (acidez potencial), MO (matéria orgânica), C_org (carbono orgânico), Fet (ferro total), Alt (alumínio total), m (saturação por alumínio), N (nitrogênio), C (carbono)

		(conclusão)														
Grupos Filogenéticos		Atributos Químicos														
		pH	Ca	Mg	Na	K	P	Al ³⁺	H+Al	MO	Corg	Fet	Alt	m	N	C
Proteobacteria																
Betaproteobacteria	R	0.244	-0.253	-0.27	-0.278	<u>-0.49</u>	-0.0286	-0.142	0.11	<u>-0.492</u>	<u>-0.5</u>	-0.0498	0.135	-0.0804	<u>-0.41</u>	<u>-0.409</u>
	p-value	0.145	0.13	0.105	0.0953	<u>0.00224</u>	0.865	0.399	0.516	<u>0.0021</u>	<u>0.00173</u>	0.768	0.422	0.634	<u>0.012</u>	<u>0.0121</u>
Proteobacteria																
Deltaproteobacteria	R	<u>-0.493</u>	0.00773	-0.181	0.0222	-0.312	-0.146	<u>0.333</u>	0.198	0.00967	-0.0109	<u>0.336</u>	<u>0.434</u>	0.281	-0.169	-0.0949
	p-value	<u>0.00207</u>	0.963	0.282	0.895	0.0602	0.385	<u>0.044</u>	0.238	0.954	0.948	<u>0.0424</u>	<u>0.00751</u>	0.0916	0.316	0.574
Proteobacteria																
Gammaproteobacteria	R	<u>-0.348</u>	-0.0402	0.257	0.378	0.287	-0.391	0.0644	0.0661	0.112	0.115	-0.0134	0.163	0.0646	0.153	0.226
	p-value	<u>0.0349</u>	0.811	0.125	0.0214	0.085	0.0169	0.704	0.695	0.507	0.495	0.936	0.335	0.703	0.363	0.177
SBR1093	R	<u>-0.0944</u>	<u>-0.484</u>	<u>-0.539</u>	<u>-0.377</u>	<u>-0.47</u>	<u>-0.343</u>	0.0912	-0.139	<u>-0.438</u>	<u>-0.447</u>	-0.0811	0.264	0.29	<u>-0.435</u>	<u>-0.5</u>
	p-value	<u>0.576</u>	<u>0.00257</u>	<u>0.00063</u>	<u>0.0218</u>	<u>0.0035</u>	<u>0.038</u>	0.589	0.411	<u>0.00695</u>	<u>0.00569</u>	0.631	0.113	0.0808	<u>0.00733</u>	<u>0.00175</u>
Spirochaetes	R	<u>-0.375</u>	0.0563	0.249	0.174	0.217	-0.221	0.317	-0.0142	<u>0.329</u>	<u>0.329</u>	0.00306	0.324	<u>0.406</u>	<u>0.338</u>	<u>0.398</u>
	p-value	<u>0.0226</u>	0.738	0.136	0.301	0.197	0.187	0.056	0.933	<u>0.0469</u>	<u>0.0469</u>	0.985	0.0507	<u>0.013</u>	<u>0.0409</u>	<u>0.015</u>
Synergistetes	R	0.0468	0.0235	-0.228	-0.11	-0.134	-0.0998	-0.219	-0.125	-0.25	-0.234	-0.258	-0.25	-0.141	-0.281	-0.25
	p-value	0.781	0.889	0.174	0.515	0.428	0.554	0.192	0.459	0.135	0.162	0.123	0.135	0.403	0.0916	0.135
TM6	R	-0.185	<u>-0.444</u>	-0.322	-0.275	<u>-0.408</u>	<u>-0.472</u>	0.0878	0.197	-0.233	-0.236	0.00609	0.324	0.168	<u>-0.495</u>	<u>-0.456</u>
	p-value	0.27	<u>0.0061</u>	0.0516	0.0983	<u>0.0125</u>	<u>0.00337</u>	0.603	0.24	0.164	0.159	0.97	0.0505	0.319	<u>0.00194</u>	<u>0.00473</u>
TM7	R	-0.219	0.0235	0.267	0.133	0.244	0.269	0.156	-0.281	0.25	0.25	-0.18	-0.0156	0.25	0.281	0.281
	p-value	0.192	0.889	0.11	0.429	0.145	0.106	0.354	0.0913	0.135	0.135	0.285	0.926	0.134	0.0916	0.0916
Tenericutes	R	0.203	0.157	0.22	0.133	0.22	-0.0998	0.0156	0.0781	0.211	0.211	0.00781	-0.0468	-0.0782	0.172	0.187
	p-value	0.227	0.353	0.19	0.429	0.189	0.554	0.926	0.643	0.209	0.209	0.963	0.781	0.643	0.308	0.265
Verrucomicrobia	R	0.127	0.187	<u>0.358</u>	0.271	<u>0.48</u>	-0.126	<u>-0.388</u>	0.154	-0.0913	-0.0824	0.00232	<u>-0.325</u>	<u>-0.577</u>	0.169	0.0418
	p-value	0.453	0.266	<u>0.0297</u>	0.104	<u>0.00278</u>	0.456	<u>0.0179</u>	0.359	0.589	0.626	0.988	<u>0.0493</u>	<u>0.000204</u>	0.314	0.805
WPS-2	R	0.233	-0.0695	-0.00459	0.0908	0.286	-0.273	<u>-0.566</u>	-0.181	-0.3	-0.287	-0.0887	<u>-0.642</u>	<u>-0.442</u>	-0.106	-0.178
	p-value	0.164	0.681	0.978	0.591	0.0861	0.101	<u>0.00029</u>	0.28	0.0708	0.0839	0.6	<u>0.000017</u>	<u>0.00637</u>	0.529	0.291

Dados sublinhados tracejados – correlação positiva; Dados sublinhados – correlação negativa (p<0,05)

Tabela S5- Correlação de Spearman entre os grupos filogenéticos encontrados nas amostras de manchas(M) dos diferentes perfis de Espodossolos e os parâmetros químicos do solo: Na (sódio), K (potássio), N (nitrogênio), C (carbono), Al³⁺ (alumínio trocável)

(continua)

Grupos Filogenéticos		Atributos Químicos				
		Na	K	N	C	Al ³⁺
Unassigned	R	-0.26	-0.165	0.0333	-0.0402	0.00124
	p-value	0.228	0.447	0.876	0.851	0.995
AD3	R	-0.18	-0.144	-0.369	<u>-0.454</u>	<u>-0.591</u>
	p-value	0.407	0.507	0.0823	<u>0.0297</u>	<u>0.00308</u>
Acidobacteria	R	-0.0599	-0.151	0.0711	0.272	0.0674
	p-value	0.781	0.486	0.743	0.206	0.757
Actinobacteria	R	0.207	0.307	0.0525	-0.129	0.0427
	p-value	0.34	0.153	0.809	0.551	0.844
Armatimonadetes	R	<u>-0.437</u>	-0.35	-0.164	-0.328	<u>-0.629</u>
	p-value	<u>0.037</u>	0.0992	0.45	0.124	<u>0.00134</u>
BHI80-139	R	-0.308	-0.0656	0.129	0.0643	-0.0161
	p-value	0.15	0.764	0.554	0.767	0.941
Bacteroidetes	R	-0.0248	-0.198	-0.281	-0.289	-0.276
	p-value	0.908	0.359	0.19	0.179	0.2
Chlamydiae	R	-0.141	-0.244	0.23	-0.115	-0.043
	p-value	0.518	0.258	0.289	0.598	0.844
Chloroflexi	R	-0.1	0.0319	0.0842	0.21	0.212
	p-value	0.646	0.883	0.699	0.333	0.326
Cyanobacteria	R	0.134	-0.0395	0.0774	-0.137	0.0946
	p-value	-0.26	-0.165	0.0333	-0.0402	0.00124

Dados sublinhados tracejados – correlação positiva; Dados sublinhados – correlação negativa (p<0,05)

Tabela S5- Correlação de Spearman entre os grupos filogenéticos encontrados nas amostras de manchas(M) dos diferentes perfis de Espodossolos e os parâmetros químicos do solo: Na (sódio), K (potássio), N (nitrogênio), C (carbono), Al³⁺ (alumínio trocável)

		(continuação)				
Grupos Filogenéticos		Atributos Químicos				
		Na	K	N	C	Al ³⁺
<i>Elusimicrobia</i>	R	-0.356	<u>-0.435</u>	-0.181	-0.174	-0.0662
	p-value	0.0943	<u>0.0379</u>	0.404	0.423	0.76
<i>Firmicutes</i>	R	0.227	0.137	-0.244	-0.473	-0.397
	p-value	0.293	0.53	0.258	0.0226	0.0598
<i>Firmicutes</i> <i>Clostridia</i>	R	0.107	-0.0144	-0.189	-0.304	-0.384
	p-value	0.62	0.944	0.384	0.155	0.0692
<i>Fusobacteria</i>	R	0.0786	-0.139	-0.175	-0.409	-0.371
	p-value	0.716	0.521	0.42	0.0521	0.0806
<i>GAL15</i>	R	-0.196	-0.0348	-0.419	0.0959	0.0303
	p-value	0.364	0.873	0.0462	0.659	0.887
<i>Gemmatimonadetes</i>	R	0.0156	0.144	0.106	0.128	0.119
	p-value	0.941	0.507	0.627	0.557	0.582
<i>Lentisphaerae</i>	R	-0.0649	-0.263	-0.0964	-0.354	-0.338
	p-value	0.764	0.222	0.656	0.0962	0.112
<i>NC10</i>	R	-0.223	0.0712	-0.163	-0.116	-0.408
	p-value	0.301	0.743	0.452	0.592	0.0527
<i>Nitrospirae</i>	R	-0.23	-0.103	-0.201	0.287	0.182
	p-value	0.289	0.636	0.354	0.18	0.402
<i>Planctomycetes</i>	R	-0.37	<u>-0.455</u>	-0.0668	-0.0289	-0.0625
	p-value	0.0815	<u>0.0289</u>	0.757	0.894	0.774
<i>Proteobacteria</i>	R	0.0204	-0.0348	-0.0623	-0.186	0.00694
	p-value	0.923	0.873	0.774	0.391	0.973
<i>Proteobacteria</i> <i>Alphaproteobacteria</i>	R	0.0504	-0.0527	0.0524	-0.329	-0.155
	p-value	0.816	0.809	0.809	0.123	0.475

Dados sublinhados tracejados – correlação positiva; Dados sublinhados – correlação negativa (p<0,05)

Tabela S5- Correlação de Spearman entre os grupos filogenéticos encontrados nas amostras de manchas(M) dos diferentes perfis de Espodossolos e os parâmetros químicos do solo: Na (sódio), K (potássio), N (nitrogênio), C (carbono), Al³⁺ (alumínio trocável)

Grupos Filogenéticos		Atributos Químicos				
		Na	K	N	C	Al ³⁺
<i>Proteobacteria</i>						
<i>Betaproteobacteria</i>	R	-0.0521	0.0853	-0.131	0.338	0.32
	p-value	0.809	0.696	0.545	0.113	0.134
<i>Proteobacteria</i>						
<i>Deltaproteobacteria</i>	R	0.41	0.278	0.143	-0.0733	0.204
	p-value	0.0514	0.196	0.512	0.736	0.347
<i>Proteobacteria</i>						
<i>Gammaproteobacteria</i>	R	0.117	-0.0383	0.311	0.0462	0.0943
	p-value	0.592	0.858	0.147	0.83	0.666
<i>SBR1093</i>	R	0.0542	0.151	-0.094	-0.121	0.155
	p-value	0.802	0.486	0.666	0.579	0.475
<i>Spirochaetes</i>	R	-0.277	-0.231	0.0303	-0.196	-0.246
	p-value	0.196	0.284	0.887	0.366	0.254
<i>Synergistetes</i>	R	-0.0649	-0.263	-0.0964	-0.354	-0.338
	p-value	0.764	0.222	0.656	0.0962	0.112
<i>TM6</i>	R	0.0282	-0.0708	0.0938	-0.07	-0.0963
	p-value	0.894	0.743	0.666	0.747	0.659
<i>Tenericutes</i>	R	-0.0649	-0.263	-0.0964	-0.354	-0.338
	p-value	0.764	0.222	0.656	0.0962	0.112
<i>Verrucomicrobia</i>	R	-0.0641	0.0975	-0.191	0.066	0.154
	p-value	0.767	0.653	0.376	0.76	0.478
<i>WPS-2</i>	R	0.08	0.108	-0.135	0.0221	0.292
	p-value	0.713	0.62	0.536	0.919	0.174
<i>WWE1</i>	R	-0.0649	-0.263	-0.0964	-0.354	-0.338
	p-value	0.764	0.222	0.656	0.0962	0.112
Dados sublinhados tracejados – correlação positiva; Dados sublinhados – correlação negativa (p<0,05)						

Tabela S6- Correlação de Spearman entre os grupos filogenéticos encontrados nas amostras de solos adjacentes as manchas(S) dos diferentes perfis de Espodossolos e os parâmetros químicos do solo: Na (sódio), K (potássio), N (nitrogênio), C (carbono), Al³⁺ (alumínio trocável)

		(continua)				
Grupos Filogenéticos		Atributos Químicos				
		Na	K	N	C	Al ³⁺
Unassigned	R	-0.103	-0.178	-0.337	-0.148	-0.256
	p-value	0.636	0.412	0.114	0.495	0.235
AD3	R	-0.0007	0.129	0.0137	0.102	0.174
	p-value	0.995	0.551	0.948	0.64	0.423
Acidobacteria	R	-0.208	0.0569	0.258	0.0539	0.0364
	p-value	0.338	0.792	0.231	0.802	0.866
Actinobacteria	R	<u>0.435</u>	<u>0.439</u>	-0.0584	0.0594	0.338
	p-value	<u>0.0379</u>	<u>0.0356</u>	0.788	0.785	0.113
Armatimonadetes	R	0.0588	0.14	0.117	-0.107	0
	p-value	0.785	0.518	0.592	0.623	0.998
Bacteroidetes	R	0.214	0.349	-0.223	-0.205	-0.187
	p-value	0.321	0.101	0.301	0.345	0.386
Chlamidiae	R	0.0307	0.0531	-0.226	-0.24	-0.274
	p-value	0.887	0.806	0.295	0.266	0.203
Chloroflexi	R	<u>-0.503</u>	-0.296	<u>0.482</u>	0.203	0.1
	p-value	<u>0.0144</u>	0.167	<u>0.0199</u>	0.349	0.646
Cyanobacteria	R	<u>0.455</u>	0.246	-0.247	-0.0242	0.101
	p-value	<u>0.0293</u>	0.254	0.254	0.912	0.643
Elusimicrobia	R	-0.251	-0.0594	<u>0.42</u>	0.327	0.107
	p-value	0.244	0.785	<u>0.0456</u>	0.126	0.623

Dados sublinhados tracejados – correlação positiva; Dados sublinhados – correlação negativa (p<0,05)

Tabela S6- Correlação de Spearman entre os grupos filogenéticos encontrados nas amostras de solos adjacentes as manchas(S) dos diferentes perfis de Espodossolos e os parâmetros químicos do solo: Na (sódio), K (potássio), N (nitrogênio), C (carbono), Al³⁺ (alumínio trocável)

(continuação)

Grupos Filogenéticos		Atributos Químicos				
		Na	K	N	C	Al ³⁺
Firmicutes	R	0.236	<u>0.558</u>	-0.00913	-0.145	-0.0446
	p-value	0.276	<u>0.00588</u>	0.966	0.504	0.837
Firmicutes <i>Clostridia</i>	R	-0.135	0.161	-0.149	-0.105	-0.149
	p-value	0.533	0.458	0.492	0.63	0.492
Fusobacteria	R	0.199	0.311	-0.0233	-0.0698	-0.0466
	p-value	0.357	0.146	0.912	0.747	0.83
GAL15	R	-0.0905	-0.0277	0.191	0.181	-0.0604
	p-value	0.676	0.898	0.379	0.404	0.781
Gemmatimonadetes	R	0.048	0.04	-0.00898	-0.258	-0.18
	p-value	0.823	0.855	0.966	0.229	0.407
NC10	R	-0.152	0.012	0.116	0.0233	-0.0698
	p-value	0.483	0.955	0.592	0.912	0.747
Nitrospirae	R	<u>-0.652</u>	<u>-0.591</u>	0.293	-0.0226	-0.202
	p-value	<u>0.00073</u>	<u>0.00308</u>	0.171	0.916	0.349
Planctomycetes	R	0.133	0.126	0.0743	0.201	0.189
	p-value	0.542	0.561	0.733	0.354	0.384
Proteobacteria	R	0.289	0.0147	-0.193	-0.0297	0.0529
	p-value	0.179	0.944	0.374	0.89	0.806
Proteobacteria <i>Alphaproteobacteria</i>	R	0.246	0.0137	-0.366	-0.312	-0.208
	p-value	0.254	0.948	0.085	0.145	0.335

Dados em azul – correlação positiva; Dados em vermelho – correlação negativa (p<0,05)

Tabela S6- Correlação de Spearman entre os grupos filogenéticos encontrados nas amostras de solos adjacentes as manchas(S) dos diferentes perfis de Espodossolos e os parâmetros químicos do solo: Na (sódio), K (potássio), N (nitrogênio), C (carbono), Al³⁺ (alumínio trocável).

		(conclusão)				
Grupos Filogenéticos		Atributos Químicos				
		Na	K	N	C	Al ³⁺
Proteobacteria						
Betaproteobacteria	R	-0.21	-0.35	0.268	0.246	0.102
	p-value	0.331	0.1	0.212	0.254	0.64
Proteobacteria						
Deltaproteobacteria	R	<u>0.5</u>	0.311	<u>-0.482</u>	-0.207	-0.0307
	p-value	<u>0.0153</u>	0.146	<u>0.0199</u>	0.338	0.887
Proteobacteria						
Gammaproteobacteria	R	0.343	0.337	-0.295	-0.326	-0.176
	p-value	0.108	0.114	0.168	0.127	0.417
SBR1093	R	-0.0329	-0.145	-0.246	-0.161	-0.237
	p-value	0.88	0.504	0.254	0.458	0.272
Spirochaetes	R	0.129	0.155	0.0233	0.14	0.116
	p-value	0.554	0.475	0.912	0.521	0.592
TM6	R	0.209	0.188	-0.315	0.0921	0.133
	p-value	0.333	0.386	0.141	0.672	0.539
Verrucomicrobia	R	0.0604	0.13	0.00802	-0.0617	-0.135
	p-value	0.781	0.551	0.969	0.778	0.536
WPS-2	R	<u>0.456</u>	0.372	-0.217	-0.149	-0.047
	p-value	<u>0.0285</u>	0.0789	0.315	0.492	0.827

Dados em azul – correlação positiva; Dados em vermelho – correlação negativa

Tabela S7 - Afiliação taxonômica e frequência dos principais grupos encontrados nas amostras coletadas nos horizontes (A, AE, EB, BE, Bh1) e nas manchas (M) e regiões adjacentes as manchas (S)

Grupos Filogenéticos	(continuação)													
	Horizonte A		Horizonte AE		Horizonte EB		Horizonte BE		Horizonte Bh1		Manchas (M)		Solo Adjacente as manchas (S)	
	NT*	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%
Pefis bem drenados														
<i>Unassigned</i>	3763	1.00%	10154	1.20%	14488	1.90%	16192	1.50%	20982	3.70%	82272	2.40%	89393	2.50%
<i>AD3</i>	376	0.10%	1692	0.20%	1525	0.20%	3238	0.30%	567	0.10%	3428	0.10%	3576	0.10%
<i>Acidobacteria</i>	120806	32.10%	229312	27.10%	346955	45.50%	396168	36.70%	253487	44.70%	1542600	45.00%	1737800	48.60%
<i>Actinobacteria</i>	114785	30.50%	217466	25.70%	51853	6.80%	146809	13.60%	28921	5.10%	188540	5.50%	168059	4.70%
<i>Armatimonadetes</i>	753	0.20%	1692	0.20%	ND	ND	1079	0.10%	567	0.10%	3428	0.10%	ND	ND
<i>Bacteroidetes</i>	1129	0.30%	5077	0.60%	3050	0.40%	3238	0.30%	3970	0.70%	51420	1.50%	7151	0.20%
<i>Chlamydiae</i>	1129	0.30%	5077	0.60%	9913	1.30%	11874	1.10%	4537	0.80%	58276	1.70%	25030	0.70%
<i>Chloroflexi</i>	2634	0.70%	11000	1.30%	32027	4.20%	38861	3.60%	43665	7.70%	106268	3.10%	135877	3.80%
<i>Cyanobacteria</i>	1129	0.30%	5077	0.60%	1525	0.20%	4318	0.40%	1134	0.20%	10284	0.30%	7151	0.20%
<i>Elusimicrobia</i>	ND	ND	846	0.10%	2288	0.30%	1079	0.10%	567	0.10%	6856	0.20%	3576	0.10%
<i>FCPU426</i>	376	0.10%	2539	0.30%	ND	ND	1079	0.10%	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Firmicutes</i>	4516	1.20%	11846	1.40%	7625	1.00%	12954	1.20%	4537	0.80%	51420	1.50%	10727	0.30%
<i>Fusobacteria</i>	ND	ND	846	0.10%	763	0.10%	ND	ND	567	0.10%	3428	0.10%	ND	ND
<i>GAL15</i>	753	0.20%	6769	0.80%	41940	5.50%	33464	3.10%	28354	5.00%	92556	2.70%	153756	4.30%
<i>Gemmatimonadetes</i>	376	0.10%	2539	0.30%	8388	1.10%	4318	0.40%	1701	0.30%	34280	1.00%	32181	0.90%
<i>NC10</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Nitrospirae</i>	ND	ND	1692	0.20%	23639	3.10%	5397	0.50%	7372	1.30%	34280	1.00%	71514	2.00%
<i>Planctomycetes</i>	6774	1.80%	26231	3.10%	13726	1.80%	25907	2.40%	8506	1.50%	65132	1.90%	53636	1.50%
<i>Proteobacteria Total</i>	95591	25.40%	237774	28.10%	167759	22.00%	303333	28.10%	134399	23.70%	997548	29.10%	958293	26.80%
<i>SBR1093</i>	ND	ND	ND	ND	1525	0.20%	1079	0.10%	567	0.10%	3428	0.10%	7151	0.20%
<i>Spirochaetes</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	567	0.10%	3428	0.10%	ND	ND

*NT – Número Total de Reads
ND – Não detectado

Tabela S7 - Afiliação taxonômica e frequência dos principais grupos encontrados nas amostras coletadas nos horizontes (A, AE, EB, BE, Bh1) e nas manchas (M) e regiões adjacentes as manchas (S)

(continuação)

<i>Grupos Filogenéticos</i>	Horizonte A		Horizonte AE		Horizonte EB		Horizonte BE		Horizonte Bh1		Manchas (M)		Solo Adjacente as manchas (S)	
	NT*	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%
Pefis bem drenados														
<i>TM6</i>	376	0.10%	2539	0.30%	3050	0.40%	5397	0.50%	2268	0.40%	17140	0.50%	7151	0.20%
<i>Verrucomicrobia</i>	12419	3.30%	28770	3.40%	19826	2.60%	33464	3.10%	7939	1.40%	54848	1.60%	57212	1.60%
WPS-2	9032	2.40%	37231	4.40%	11438	1.50%	28066	2.60%	10208	1.80%	17140	0.50%	42909	1.20%
TOTAL	376344		846170		762539		1079478		567084		3427999		3575721	
<i>Grupos Filogenéticos</i>	Horizonte A		Horizonte AE		Horizonte EB		Horizonte BE		Horizonte Bh1		Manchas (M)		Solo Adjacente as manchas (S)	
	NT*	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%
Pefis com drenagem intermediária														
<i>Unassigned</i>	1418	0.30%	6236	0.60%	2190	1.10%	1075	1.50%	8187	0.90%	8414	1.80%	13762	1.90%
<i>AD3</i>	ND	ND	1039	0.10%	398	0.20%	215	0.30%	1819	0.20%	467	0.10%	724	0.10%
<i>Acidobacteria</i>	126651	26.80%	286876	27.60%	95585	48.00%	30669	42.80%	567662	62.40%	222025	47.50%	338267	46.70%
<i>Actinobacteria</i>	130432	27.60%	201644	19.40%	14736	7.40%	7166	10.00%	44576	4.90%	45340	9.70%	59396	8.20%
<i>Armatimonadetes</i>	1890	0.40%	1039	0.10%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Bacteroidetes</i>	945	0.20%	3118	0.30%	797	0.40%	287	0.40%	2729	0.30%	467	0.10%	724	0.10%
<i>Chlamydiae</i>	1418	0.30%	5197	0.50%	597	0.30%	287	0.40%	4549	0.50%	1402	0.30%	2897	0.40%
<i>Chloroflexi</i>	945	0.20%	6236	0.60%	2390	1.20%	1433	2.00%	6368	0.70%	8881	1.90%	12314	1.70%
<i>Cyanobacteria</i>	1418	0.30%	4158	0.40%	1394	0.70%	645	0.90%	3639	0.40%	1870	0.40%	2173	0.30%
<i>Elusimicrobia</i>	ND	ND	ND	ND	199	0.10%	143	0.20%	1819	0.20%	467	0.10%	724	0.10%
<i>FCPU426</i>	473	0.10%	1039	0.10%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Firmicutes</i>	1890	0.40%	69640	6.70%	1792	0.90%	645	0.90%	2729	0.30%	1402	0.30%	2173	0.30%
<i>Fusobacteria</i>	473	0.10%	1039	0.10%	199	0.10%	72	0.10%	910	0.10%	ND	ND	ND	ND
*NT – Número Total de Reads ND – Não detectado														

Tabela S7 - Afiliação taxonômica e frequência dos principais grupos encontrados nas amostras coletadas nos horizontes (A, AE, EB, BE, Bh1) e nas manchas (M) e regiões adjacentes as manchas (S)

(continuação)

<i>Grupos Filogenéticos</i>	Horizonte A		Horizonte AE		Horizonte EB		Horizonte BE		Horizonte Bh1		Manchas (M)		Solo Adjacente as manchas (S)	
	NT*	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%
Pefis com drenagem intermediária														
<i>GAL15</i>	945	0.20%	9355	0.90%	1991	1.00%	932	1.30%	3639	0.40%	15425	3.30%	28974	4.00%
<i>Gemmatimonadetes</i>	473	0.10%	2079	0.20%	797	0.40%	573	0.80%	3639	0.40%	4674	1.00%	6519	0.90%
<i>NC10</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Nitrospirae</i>	ND	ND	2079	0.20%	199	0.10%	287	0.40%	910	0.10%	4207	0.90%	5795	0.80%
<i>Planctomycetes</i>	9452	2.00%	45734	4.40%	3983	2.00%	1003	1.40%	10917	1.20%	7011	1.50%	11589	1.60%
<i>Proteobacteria Total</i>	163039	34.50%	348200	33.50%	63524	31.90%	22858	31.90%	221061	24.30%	128541	27.50%	205713	28.40%
<i>SBR1093</i>	ND	ND	ND	ND	597	0.30%	72	0.10%	1819	0.20%	467	0.10%	724	0.10%
<i>Spirochaetes</i>	473	0.10%	ND	ND	ND	ND	72	0.10%	910	0.10%	ND	ND	ND	ND
<i>TM6</i>	473	0.10%	4158	0.40%	797	0.40%	358	0.50%	1819	0.20%	935	0.20%	1449	0.20%
<i>Verrucomicrobia</i>	16540	3.50%	18709	1.80%	2589	1.30%	932	1.30%	10007	1.10%	8414	1.80%	17384	2.40%
WPS-2	11814	2.50%	21827	2.10%	4182	2.10%	2006	2.80%	10917	1.20%	6076	1.30%	10141	1.40%
TOTAL	472578		1039404		199136		71656		909715		467420		724340	
<i>Grupos Filogenéticos</i>	Horizonte A		Horizonte AE		Horizonte EB		Horizonte BE		Horizonte Bh1		Manchas (M)		Solo Adjacente as manchas (S)	
	NT*	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%
Pefis mal drenados														
<i>Unassigned</i>	10558	3.20%	844	0.70%	7544	1.10%	14219	1.70%	9486	3.40%	12099	2.10%	15578	2.40%
<i>AD3</i>	660	0.20%	482	0.40%	10973	1.60%	1673	0.20%	279	0.10%	576	0.10%	649	0.10%
<i>Acidobacteria</i>	74233	22.50%	25320	21.00%	231804	33.80%	428241	51.20%	143406	51.40%	268483	46.60%	303121	46.70%
<i>Actinobacteria</i>	74233	22.50%	19894	16.50%	69267	10.10%	31784	3.80%	9207	3.30%	31688	5.50%	34401	5.30%
<i>Armatimonadetes</i>	660	0.20%	241	0.20%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	576	0.10%	ND	ND
<i>Bacteroidetes</i>	660	0.20%	723	0.60%	6172	0.90%	3346	0.40%	1395	0.50%	576	0.10%	649	0.10%

Tabela S7 - Afiliação taxonômica e frequência dos principais grupos encontrados nas amostras coletadas nos horizontes (A, AE, EB, BE, Bh1) e nas manchas (M) e regiões adjacentes as manchas (S)

Grupos Filogenéticos	(conclusão)													
	Horizonte A		Horizonte AE		Horizonte EB		Horizonte BE		Horizonte Bh1		Manchas (M)		Solo Adjacente as manchas (S)	
	NT*	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%
Pefis mal drenados														
<i>Chlamydiae</i>	660	0.20%	362	0.30%	2057	0.30%	2509	0.30%	4185	1.50%	4033	0.70%	2596	0.40%
<i>Chloroflexi</i>	31343	9.50%	15071	12.50%	13716	2.00%	20074	2.40%	3069	1.10%	10371	1.80%	14929	2.30%
<i>Cyanobacteria</i>	990	0.30%	362	0.30%	2057	0.30%	2509	0.30%	837	0.30%	1152	0.20%	1298	0.20%
<i>Elusimicrobia</i>	ND	ND	121	0.10%	1372	0.20%	1673	0.20%	837	0.30%	1152	0.20%	1298	0.20%
<i>FCPU426</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Firmicutes</i>	5939	1.80%	4099	3.40%	15774	2.30%	10037	1.20%	1674	0.60%	1728	0.30%	1947	0.30%
<i>Fusobacteria</i>	ND	ND	241	0.20%	2057	0.30%	836	0.10%	558	0.20%	ND	ND	ND	ND
<i>GAL15</i>	1650	0.50%	965	0.80%	75439	11.00%	89496	10.70%	10602	3.80%	42058	7.30%	66206	10.20%
<i>Gemmatimonadetes</i>	990	0.30%	241	0.20%	6172	0.90%	5855	0.70%	1116	0.40%	8642	1.50%	8438	1.30%
<i>NC10</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	279	0.10%	ND	ND	649	0.10%
<i>Nitrospirae</i>	ND	ND	121	0.10%	13030	1.90%	10037	1.20%	3348	1.20%	6914	1.20%	12333	1.90%
<i>Planctomycetes</i>	9238	2.80%	3858	3.20%	12345	1.80%	15055	1.80%	5580	2.00%	6914	1.20%	8438	1.30%
<i>Proteobacteria Total</i>	86441	26.20%	38582	32.00%	176939	25.80%	155572	18.60%	75330	27.00%	163625	28.40%	160972	24.80%
<i>SBR1093</i>	ND	ND	ND	ND	686	0.10%	1673	0.20%	558	0.20%	576	0.10%	649	0.10%
<i>Spirochaetes</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	279	0.10%	576	0.10%	ND	ND
<i>TM6</i>	330	0.10%	362	0.30%	1372	0.20%	2509	0.30%	2232	0.80%	1152	0.20%	649	0.10%
<i>Verrucomicrobia</i>	11217	3.40%	3497	2.90%	13030	1.90%	11710	1.40%	3348	1.20%	8642	1.50%	10385	1.60%
WPS-2	19136	5.80%	5185	4.30%	22632	3.30%	29274	3.50%	1395	0.50%	5761	1.00%	5193	0.80%
TOTAL	329926		120570		685812		836409		279000		576143		649081	

*NT – Número Total de Reads
ND – Não detectado

Tabela S8 - Afiliação taxonômica e frequência das classes pertencentes ao filo *Proteobacteria* encontradas nas amostras coletadas nos horizontes (A, AE, EB, BE, Bh1) e nas manchas (M) e regiões adjacentes as manchas (S)

Grupos Filogenéticos	Horizonte A		Horizonte AE		Horizonte EB		Horizonte BE		Horizonte Bh1		Manchas (M)		Solo Adjacente as manchas (S)	
	NT*	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%
Pefis bem drenados														
<i>Alphaproteobacteria</i>	67366	17.90%	162465	19.20%	69391	9.10%	183511	17.00%	66916	11.80%	620468	18.10%	475571	13.30%
<i>Betaproteobacteria</i>	2258	0.60%	10154	1.20%	46515	6.10%	29146	2.70%	14177	2.50%	130264	3.80%	239573	6.70%
<i>Deltaproteobacteria</i>	11290	3.00%	27077	3.20%	32789	4.30%	59371	5.50%	27787	4.90%	147404	4.30%	171635	4.80%
<i>Gammaproteobacteria</i>	14677	3.90%	38078	4.50%	19826	2.60%	31305	2.90%	25519	4.50%	102840	3.00%	71514	2.00%
Grupos Filogenéticos	Horizonte A		Horizonte AE		Horizonte EB		Horizonte BE		Horizonte Bh1		Manchas (M)		Solo Adjacente as manchas (S)	
	NT*	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%
Pefis com drenagem intermediária														
<i>Alphaproteobacteria</i>	129486	27.40%	261930	25.20%	29273	14.70%	12468	17.40%	130999	14.40%	71048	15.20%	107927	14.90%
<i>Betaproteobacteria</i>	945	0.20%	6236	0.60%	5576	2.80%	1003	1.40%	5458	0.60%	17295	3.70%	32595	4.50%
<i>Deltaproteobacteria</i>	19376	4.10%	60285	5.80%	23299	11.70%	7667	10.70%	66409	7.30%	32252	6.90%	50704	7.00%
<i>Gammaproteobacteria</i>	12760	2.70%	261930	1.90%	5377	2.70%	1648	2.30%	18194	2.00%	7946	1.70%	14487	2.00%
Grupos Filogenéticos	Horizonte A		Horizonte AE		Horizonte EB		Horizonte BE		Horizonte Bh1		Manchas (M)		Solo Adjacente as manchas (S)	
	NT*	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%	NT	%
Pefis mal drenados														
<i>Alphaproteobacteria</i>	64336	19.50%	21100	17.50%	95328	13.90%	63567	7.60%	45477	16.30%	77241	15.30%	88150	11.90%
<i>Betaproteobacteria</i>	4289	1.30%	2050	1.70%	40463	5.90%	34293	4.10%	5859	2.10%	41541	6.50%	37449	6.40%
<i>Deltaproteobacteria</i>	10558	3.20%	6631	5.50%	24003	3.50%	49348	5.90%	15066	5.40%	31805	5.10%	29383	4.90%
<i>Gammaproteobacteria</i>	7258	2.20%	8802	7.30%	17831	2.60%	8364	1.00%	8928	3.20%	9736	1.50%	8642	1.50%

*NT – Número Total de Reads

Tabela S9– Afiliação taxonômica e número de OTUs mais significativas encontradas nas amostras coletadas nos horizontes (A, AE, EB, BE, Bh1) nos diferentes regimes de drenagem: WD – bem drenados e ID – com drenagem intermediária

(continua)

OTU ID	Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	WDA	WDAE	WDEB	WDBE	WDBh1	IDA	IDAE	IDEB	IDBE	IDBh1
19060	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteria-5	ND	ND	ND	4	129	150	149	168	7	34	38	26	299
4417	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Gemmatales	Isosphaeraceae	ND	57	36	28	21	14	98	97	5	0	1
18817	Bacteria	Gemmatimonadetes	Gemm-1	ND	ND	ND	66	630	1200	1019	576	52	1384	274	105	1178
13146	Bacteria	Acidobacteria	Solibacteres	Solibacterales	ND	ND	247	166	1	277	22	332	67	12	2	7
18947	Bacteria	Acidobacteria	DA052	Ellin6513	ND	ND	873	3357	7622	8479	7822	991	1817	1689	527	15070
18782	Bacteria	Acidobacteria	EC1113	ND	ND	ND	7	278	853	1567	502	28	911	152	32	999
18750	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	ND	19	171	2239	3640	850	35	236	572	106	991
18862	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	643	843	701	582	127	1267	1297	27	8	62
18392	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Koribacteraceae	ND	ND	0	14	188	1073	965	0	18	639	402	802
6170	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophobacteraceae	ND	438	767	5	42	15	349	69	22	3	9
13167	Bacteria	WPS-2	ND	ND	ND (p_WPS-2)	ND	62	316	55	308	32	139	584	8	16	15
19417	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Pirellulales	Pirellulaceae	ND	69	70	5	21	0	85	63	0	0	11
18746	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Gemmatales	Isosphaeraceae	ND	1125	2181	325	1559	390	1310	7380	317	35	1396
18998	Bacteria	Elusimicrobia	Elusimicrobia	FAC88	ND	ND	3	89	544	166	113	14	54	26	10	320
18680	Bacteria	Verrucomicrobia	Pedosphaerae	Pedosphaerales	ND	ND	3765	5694	190	2573	778	4341	2399	73	26	567
13839	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	ND	Candidatus Koribacter	4	45	94	101	39	0	5	26	7	110
10911	Bacteria	WPS-2	ND	ND	ND	ND	284	334	0	63	0	397	31	1	0	0
20432	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales	ND	ND	596	1167	364	418	190	542	1346	226	15	161

ND – Não determinado

Tabela S9– Afiliação taxonômica e número de OTUs mais significativas encontradas nas amostras coletadas nos horizontes (A, AE, EB, BE, Bh1) nos diferentes regimes de drenagem: WD – bem drenados e ID – com drenagem intermediária

(continuação)

OTU ID	Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	WDA	WDAE	WDEB	WDBE	WDBh1	IDA	IDAE	IDEB	IDBE	IDBh1
20604	Bacteria	Acidobacteria	TM1	ND	ND	ND	0	15	290	195	66	3	17	64	9	313
13118	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteria-5	ND	ND	ND	1	44	26	35	46	0	22	1	1	40
12704	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	34	35	5	19	1	13	35	4	0	4
18688	Bacteria	Acidobacteria	Solibacteres	Solibacterales	Solibacteraceae	Candidatus Solibacter	412	1362	3149	3331	1235	153	804	623	83	2569
20002	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus	33	46	11	20	1	25	64	0	0	0
18632	Bacteria	Acidobacteria	DA052	Ellin6513	ND	ND	161	1496	23038	19308	6961	155	1142	1045	418	24610
13951	Bacteria	Acidobacteria	DA052	Ellin6513	ND	ND	20	207	757	1198	352	47	97	187	144	1430
19072	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Gemmatales	Gemmataceae	ND	112	57	9	31	10	150	86	1	3	26
18945	Bacteria	Acidobacteria	EC1113	ND	ND	ND	2	42	457	702	101	0	3	14	16	369
18630	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	26572	85046	9736	40163	6381	21930	58908	4121	1307	8841
18647	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	6391	5796	890	1547	266	9316	5189	113	111	1721
25	Bacteria	Acidobacteria	DA052	Ellin6513	ND	ND	6	38	66	110	76	18	32	5	3	131
6538	Bacteria	Acidobacteria	DA052	Ellin6513	ND	ND	18	140	593	409	341	38	92	61	37	530
21076	Bacteria	Acidobacteria	DA052	Ellin6513	ND	ND	16	174	1234	2507	1967	14	382	1418	215	2116
19435	Bacteria	Acidobacteria	Solibacteres	Solibacterales	Solibacteraceae	Candidatus Solibacter	91	197	56	24	10	146	80	0	0	25
18813	Bacteria	Actinobacteria	Thermoleophilia	Gaiellales	Gaiellaceae	ND	411	1054	649	1712	137	523	928	222	100	463
18702	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteriia	Rhodospirillales	Acidobacteriaceae	ND	1178	1077	41	321	75	3147	565	3	9	123
10907	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	ND	140	314	56	428	180	253	211	104	61	283
16654	Bacteria	Actinobacteria	Thermoleophilia	Solirubrobacterales	ND	ND	333	247	117	407	6	542	236	20	3	11

ND – Não determinado

Tabela S9– Afiliação taxonômica e número de OTUs mais significativas encontradas nas amostras coletadas nos horizontes (A, AE, EB, BE, Bh1) nos diferentes regimes de drenagem: WD – bem drenados e ID – com drenagem intermediária

(conclusão)

OTU ID	Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	WDA	WDAE	WDEB	WDBE	WDBh1	IDA	IDAE	IDEB	IDBE	IDBh1
18642	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Koribacteraceae	ND	159	1713	6285	7388	4715	137	2500	4361	1540	21656
6941	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Phenylobacterium	Phenylobacterium	47	137	19	123	0	82	64	6	3	7
17151	Bacteria	Unassigned	Unassigned	Unassigned	Unassigned	ND	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12836	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophobacteraceae	ND	12	329	2669	3573	1103	15	215	1400	237	2511
13036	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Gemmatales	Gemmataceae	ND	0	12	497	318	122	0	16	7	5	140
18870	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Brevibacillus	41	116	36	106	1	67	2631	14	3	7
18850	Bacteria	TM6	SJA-4	ND	ND	ND	20	205	128	295	122	6	680	120	125	395
18726	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophobacteraceae	ND	602	625	32	47	41	1024	108	18	9	40

ND – Não determinado

Tabela S10—Afiliação taxonômica e número de OTUs mais significativas encontradas nas amostras coletadas nos horizontes (A, AE, EB, BE, Bh1) em horizontes mal drenados (PD).

(continua)

OTU ID	Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	PDA	PDAE	PDEB	PDBE	PDBh1
19060	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteria-5	ND	ND	ND	10	21	233	132	64
4417	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Gemmatales	Isosphaeraceae	ND	41	0	1	1	0
18817	Bacteria	Gemmatimonadetes	Gemm-1	ND	ND	ND	50	24	1191	333	192
13146	Bacteria	Acidobacteria	Solibacteres	Solibacterales	ND	ND	172	0	1	0	0
18947	Bacteria	Acidobacteria	DA052	Ellin6513	ND	ND	1326	322	3534	5708	4611
18782	Bacteria	Acidobacteria	EC1113	ND	ND	ND	1	8	637	1311	394
18750	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	ND	4	5	503	1811	397
18862	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	283	118	64	25	46
18392	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Koribacteraceae	ND	ND	1	0	29	45	6
6170	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophobacteraceae	ND	126	0	5	9	1
13167	Bacteria	WPS-2	ND	ND	ND	ND	63	11	1	4	9
19417	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Pirellulales	Pirellulaceae	ND	20	0	0	2	0
18746	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Gemmatales	Isosphaeraceae	ND	458	100	446	392	90
18998	Bacteria	Elusimicrobia	Elusimicrobia	FAC88	ND	ND	3	12	74	47	30
18680	Bacteria	Verrucomicrobia	Pedosphaerae	Pedosphaerales	ND	ND	1590	25	148	182	70
13839	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	ND	Candidatus Koribacter	1	6	37	18	4
10911	Bacteria	WPS-2	ND	ND	ND	ND	158	0	3	0	0
20432	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales	ND	ND	594	233	49	68	34

ND – Não determinado

Tabela S10– Afiliação taxonômica e número de OTUs mais significativas encontradas nas amostras coletadas nos horizontes (A, AE, EB, BE, Bh1) em horizontes mal drenados (PD)

(continuação)

OTU ID	Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	PDA	PDAE	PDEB	PDBE	PDBh1
20604	Bacteria	Acidobacteria	TM1	ND	ND	ND	0	0	174	150	50
13118	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteria-5	ND	ND	ND	1	2	130	22	8
12704	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	24	6	3	4	2
18688	Bacteria	Acidobacteria	Solibacteres	Solibacterales	Solibacteraceae	Candidatus Solibacter	123	518	2271	1755	929
20002	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus	10	15	4	11	2
18632	Bacteria	Acidobacteria	DA052	Ellin6513	ND	ND	37	105	3835	2677	7882
13951	Bacteria	Acidobacteria	DA052	Ellin6513	ND	ND	38	37	906	869	218
19072	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Gemmatales	Gemmataceae	ND	78	11	0	0	0
18945	Bacteria	Acidobacteria	EC1113	ND	ND	ND	0	0	178	266	32
18630	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	17578	4712	4963	4296	4384
18647	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	2544	111	206	125	77
25	Bacteria	Acidobacteria	DA052	Ellin6513	ND	ND	18	12	40	61	15
6538	Bacteria	Acidobacteria	DA052	Ellin6513	ND	ND	9	4	216	634	529
21076	Bacteria	Acidobacteria	DA052	Ellin6513	ND	ND	2	0	1670	6928	695
19435	Bacteria	Acidobacteria	Solibacteres	Solibacterales	Solibacteraceae	Candidatus Solibacter	21	1	21	50	4
18813	Bacteria	Actinobacteria	Thermoleophilia	Gaiellales	Gaiellaceae	ND	413	109	1265	822	185
18702	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteriia	Rhodospirillales	Acidobacteriaceae	ND	688	6	10	4	17
10907	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	ND	6	0	5	1	0

ND – Não determinado

Tabela S10– Afiliação taxonômica e número de OTUs mais significativas encontradas nas amostras coletadas nos horizontes (A, AE, EB, BE, Bh1) em horizontes mal drenados (PD)

(conclusão)											
OTU ID	Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	PDA	PDAE	PDEB	PDBE	PDBh1
18642	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Koribacteraceae	ND	24	269	13863	11599	4072
6941	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Phenylobacterium	Phenylobacterium	39	1	3	0	0
17151	Bacteria	Unassigned	Unassigned	Unassigned	Unassigned	ND	0	0	9	3	0
12836	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophobacteraceae	ND	5	0	1056	2374	442
13036	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Gemmatales	Gemmataceae	ND	4	3	38	79	37
18870	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Brevibacillus	69	121	52	36	25
18850	Bacteria	TM6	SJA-4	ND	ND	ND	10	79	273	403	34
18726	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophobacteraceae	ND	484	1	7	25	5

ND – Não determinado

Tabela S11– Afiliação taxonômica e número de OTUs mais significativas encontradas nas amostras coletadas nas manchas (M) e regiões adjacentes as manchas (S) nos diferentes regimes de drenagem: WD – bem drenados e ID – com drenagem intermediária

(continua)

OTU ID	Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	WDM	WDS	IDM	IDS	PDM	PDS
3568	Bacteria	Acidobacteria	DA052	Ellin6513	ND	ND	5	28	0	15	5	2
23171	Bacteria	Cyanobacteria	4C0d-2	MLE1-12	ND	ND	25	58	5	14	1	37
4579	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	ND	15	33	1	12	5	17
9384	Bacteria	AD3	ABS-6	ND	ND	ND	0	0	0	0	3	0
16615	Bacteria	GAL15	ND	ND	ND	ND	54	119	15	49	16	53
2760	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Koribacteraceae	ND	17	36	4	8	5	18
2044	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus	9	12	0	11	1	3
21314	Bacteria	NC10	(12-24)	JH-WHS47	ND	ND	81	486	19	41	31	148
18617	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacteriales	Syntrophobacteraceae	ND	28	9	13	5	10	5
20546	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	ND	42	30	21	9	13	7
19772	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Koribacteraceae	ND	28	25	14	8	21	7
2893	Bacteria	Acidobacteria	DA052	Ellin6513	ND	ND	77	107	7	19	9	25
20750	Bacteria	GAL15	ND	ND	ND	ND	3049	7738	660	1131	770	1468
3122	Bacteria	Unassigned	Unassigned	Unassigned	Unassigned	ND	15	9	10	3	12	3
16428	Bacteria	Gemmatimonadetes	Gemm-1	ND	ND	ND	1	22	0	4	1	5
228	Bacteria	Verrucomicrobia	Pedosphaerae	Pedosphaerales	ND	ND	1	29	0	4	2	3
5633	Bacteria	TM6	SJA-4	ND	ND	ND	0	2	0	0	1	1
22014	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Legionellales	Coxiellaceae	ND	47	4	2	1	5	1
18372	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	ND	2	33	2	6	0	7

ND – Não determinado

Tabela S11—Afiliação taxonômica e número de OTUs mais significativas encontradas nas amostras coletadas nas manchas (M) e regiões adjacentes as manchas (S) nos diferentes regimes de drenagem: WD – bem drenados e ID – com drenagem intermediária

(continuação)

OTU ID	Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	WDM	WDS	IDM	IDS	PDM	PDS
18914	Bacteria	Unassigned	Unassigned	Unassigned	Unassigned	ND	0	5	0	2	0	1
13912	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Rhodoplanes	9	1	0	0	2	0
15502	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Legionellales	ND	ND	0	10	0	11	0	0
23892	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Gemmatales	Gemmataceae	ND	107	23	4	2	6	4
18717	Bacteria	Acidobacteria	EC1113	ND	ND	ND	1	12	0	3	0	3
2302	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	ND	30	52	15	11	16	11
12196	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	ND	3	4	0	0	0	4
15307	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Gemmatales	Gemmataceae	ND	13	20	1	16	1	1
21870	Bacteria	TM6	SJA-4	ND	ND	ND	159	70	13	2	13	4
24797	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	ND	72	102	28	22	39	16
10691	Bacteria	Acidobacteria	DA052	Ellin6513	ND	ND	11	9	3	0	3	0
1202	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophobacteraceae	ND	24	54	5	31	6	10
7099	Bacteria	Proteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	ND	ND	75	75	33	19	30	13
12897	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteria-6	iii1-15	ND	ND	0	6	0	0	0	4
15588	Bacteria	Verrucomicrobia	Spartobacteria	Chthoniobacterales	Chthoniobacteraceae	heteroC45_4W	4	4	0	2	0	6
12158	Bacteria	Proteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	ND	ND	4	17	0	2	0	4
23427	Bacteria	Planctomycetes	Phycisphaerae	WD2101	ND	ND	0	20	0	1	0	13
24395	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophobacteraceae	ND	123	235	16	71	19	38
11741	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Rhodoplanes	15	33	2	10	60	4

ND – Não determinado

Tabela S11– Afiliação taxonômica e número de OTUs mais significativas encontradas nas amostras coletadas nas manchas (M) e regiões adjacentes as manchas (S) nos diferentes regimes de drenagem: WD – bem drenados e ID – com drenagem intermediária.

							(conclusão)					
OTU ID	Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	WDM	WDS	IDM	IDS	PDM	PDS
22721	Bacteria	Unassigned	Unassigned	Unassigned	Unassigned	ND	21	6	2	0	1	0
9326	Bacteria	Acidobacteria	EC1113	ND	ND	ND	0	8	0	0	0	1
19025	Bacteria	Acidobacteria	DA052	Ellin6513	ND	ND	5	0	4	1	3	0
3573	Bacteria	Nitrospira	Nitrospira	Nitrospirales	ND	ND	512	1055	52	105	87	222
2188	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophobacteraceae	ND	15	36	0	5	2	12
24614	Bacteria	Acidobacteria	DA052	Ellin6513	ND	ND	3	8	0	4	0	1
19365	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Thermoactinomycetaceae	ND	6	0	3	0	0	0
23299	Bacteria	Chlamydiae	Chlamydiai	Chlamydiales	ND	ND	27	11	2	0	1	0
9319	Bacteria	WPS-2	ND (p_WPS-2)	ND	ND	ND	5	7	1	0	3	0
18944	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	ND	ND	4	3	2	1	4	0
24609	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Gemmatales	Gemmataceae	ND	43	16	18	7	8	5
13782	Bacteria	Acidobacteria	DA052	Ellin6513	ND	ND	1	10	0	0	0	2

ND – Não determinado

Figura S2 - Análise dos perfis taxonômicos ao nível de Filo realizada pelo STAMP. (A) Comparação das amostras coletadas em horizontes superficiais (A) e horizontes mais profundos (Bh1) dos três regimes de drenagem estudados: bem drenados, drenagem intermediária e mal drenados. Grupos bacterianos superrepresentados no horizonte A (branco) correspondem a diferenças positivas entre as proporções. Grupos superrepresentados no horizonte Bh1 corresponde a diferenças negativas entre as proporções. *P-values* corrigidos (q-values) foram calculados usando Benjamini-Hochberg FDR ($p < 0,05$). (B) Comparação das amostras coletadas em manchas (M) e regiões adjacentes às manchas (S) dos três regimes de drenagem estudados: bem drenados, drenagem intermediária e mal drenados. Grupos bacterianos superrepresentados nas manchas (branco) correspondem a diferenças positivas entre as proporções. Grupos superrepresentados nas regiões adjacentes às manchas (S) correspondem a diferenças negativas entre as proporções. *P-values* corrigidos (q-values) foram calculados usando Benjamini-Hochberg FDR ($p < 0,05$)

Figura S3 - Perfil 30 – Perfil bem drenado. (A) Visão geral do perfil P30. (B) Localização dos horizontes no perfil. (C) Manchas brancas no topo do horizontes Bh1 e horizontes de transição EB e BE. (D) Mancha branca concêntrica no horizonte Bh2

Figura S4 - Perfis P31, P32 e P33. Seção de cerca de 10 m de comprimento, localizado em um penhasco no lado sul da Ilha Comprida. – Perfis bem drenados. (A) Visão geral da localização dos perfis. (B) Localização dos horizontes no perfil 31. (C) Porção inferior do perfil onde há fluxo lateral. Observe a forma ondulada do horizonte Bh (seta) e pequenas ilhas no horizonte Bh no meio do horizonte de transição (seta tracejada). (D) Mancha branco horizontes Bh2. (E) Localização dos horizontes no perfil 32. (F) Manchas brancas no horizonte CE. (G) Muitas manchas brancas irregulares nos horizontes Bh1 e BE

Figura S5 - Perfis P34 e P35. Seção de aproximadamente 15 m de comprimento, localizado em um penhasco no lado sul da Ilha Comprida. – Perfis bem drenados. (A) Visão geral da localização dos perfis. (B) Localização dos horizontes no perfil 34. (C) Horizonte Bh irregular e ondulado com línguas locais (seta). (D) Detalhes dos horizontes BE e Bh1 com pequenas manchas brancas na transição entre esses horizontes (seta). (E) Localização dos horizontes no perfil 35. (F) Manchas brancas em grandes áreas de depleção de Fe (seta) e concentrações de pequenas manchas vermelhas (seta tracejada), que são canais com raízes finas. (G) Concentrações de Fe no horizonte Bh1, amarelo-avermelhado, fortemente cimentado

Figura S6 - Perfil 11 – Perfil com drenagem intermediária. (A) Visão geral do perfil P11. (B) Localização dos horizontes no perfil. (C) Transição irregular entre horizontes EB e Bh1 com muitas manchas brancas no horizonte EB e no topo do horizonte Bh1 (D) Estratificação no horizonte Bh3 com muitas raízes (seta)

Figura S7 - Perfil 38 – Perfil com drenagem intermediária (trincheira). (A) Localização dos horizontes no perfil. (B) Grande concentração de manchas brancas no horizonte de transição BE (setas) e alguns canais de decomposição de raízes (seta tracejada). (C) Grande concentração de manchas brancas concêntricas no horizonte Bh2 (D) Vegetação local (E) Detalhe de manchas escuras e manchas brancas concêntricas (seta)

Figura S8 - Perfil 37 – Perfil com drenagem intermediária (trincheira). (A) Visão geral do perfil P37. (B) Localização dos horizontes no perfil. (C) Vegetação local (praticamente a mesma encontrada no perfil 38) (D) Acumulação de matéria orgânica no topo do horizonte Bh e algumas línguas no horizonte E (seta); manchas brancas (seta tracejada)

Figura S9 - Perfil 02 – Perfil mal drenado (A) Visão geral do perfil P02. (B) Localização dos horizontes no perfil. (C) Decomposição no horizonte Bh (formação de línguas) (D) Manchas brancas concêntricas (seta)

Figura S10 - Perfil 04 – Perfil mal drenado (A) Visão geral do perfil P04. (B) Localização dos horizontes no perfil. (C) Manchas concêntricas no horizonte Bhm2 (D) Manchas brancas no horizonte Bhm1

Figura S11 - Perfil 40 – Perfil mal drenado (trincheira) (A) Visão geral do perfil P40. (B) Localização dos horizontes no perfil. (C) Manchas brancas (seta) e bandas de acúmulo de material orgânico (seta tracejada) (D) Detalhe das manchas brancas