# Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

# Diversidade e abundância de fixadores de nitrogênio de vida livre e micro-organismos amônio-oxidantes em solos de Mata Atlântica do Estado de São Paulo

# Emiliana Manesco Romagnoli

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

Piracicaba 2011 Emiliana Manesco Romagnoli Licenciada em Ciências Biológicas

# Diversidade e abundância de fixadores de nitrogênio de vida livre e microorganismos amônio oxidantes em solos de Mata Atlântica do Estado de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. FERNANDO DINI ANDREOTE

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

Piracicaba 2011

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

Romagnoli, Emiliana Manesco Diversidade e abundância de fixadores de nitrogênio de vida livre e micro-organismos amônio-oxidantes em solos de Mata Atlântica do Estado de São Paulo / Emiliana Manesco Romagnoli. - - Piracicaba, 2011.

76 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Amônio 2. Bactérias 3. Biodiversidade 4. Fixação de nitrogênio 5. Genes 6. Mata Atlântica - São Paulo 7. Microbiologia do solo 8. Nitrificação 9. Oxidação I. Título

> CDD 631.847 R756d

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

# OFEREÇO

A minha mãe, Neide

A meu pai, Francisco (in memoriam)

Minha irmã Daniana

A meu namorado Weliton

DEDICO

# AGRADECIMENTOS

A DEUS pela saúde, força e por tantas graças e benções derramadas em minha vida.

A Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ-USP e a Coordenação do PPG Microbiologia por me conceder a oportunidade para realizar o Curso.

Ao Prof. Dr. FERNANDO DINI ANDREOTE, pela orientação, confiança e apoio ao longo do Curso.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo e a FAPESP, pelo financeiro para o desenvolvimento do Projeto.

Aos meus pais NEIDE e FRANCISCO (in memoriam) e minha irmã DANIANA, pelos exemplos de valores e sacrifício, pela força moral.

A meu namorado WELITON pelo apoio, estimulo e alegria.

Aos meus professores, pelos ensinamentos.

A meus amigos, WENY ROMAGNOLI, BRUNO XAVIER, CAMILA BARBIERE, GABRIEL MASCARIN, NILCE KOBORI, REJANE LUVIZOTTO, MARIANA NOVELLO, LUIS MIGUEL.

Aos técnicos dos laboratórios de Microbiologia do solo, DENISE e FERNANDO, pela amizade.

Aos meus colegas de trabalho em especial, ARMANDO, ADEMIR, JÚLIA, MARYEIMY e FRANCISCO pela ajuda e execução do Trabalho.

Aos meus amigos que fiz durante o mestrado e que vou levar pra vida toda, JÚLIA LIMA, JULIANA PEREIRA, THIAGO, ADEMIR, ARMANDO, DIOGO COSTA, JOSH HALSEY, PEDRO, MARYEIMY, ELISA, ALICE, VÍVIAN, ANA, MARCELO, DANIEL BINI, MARINA, SILVIA.

À ELIANA MARIA GARCIA E SILVIA MARIA ZINSLY pela normalização e editoração deste trabalho.

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
1 INTRODUÇÃO	17
2 DESENVOLVIMENTO	19
2.1 Revisão bibliográfica	19
2.1.1 Bioma Mata Atlântica	19
2.1.2 Comunidade microbiana do solo	20
2.1.3 Ciclo do nitrogênio	21
2.1.3.1 Fixação biológica do nitrogênio	21
2.1.3.2 Nitrificação e desnitrificação	22
2.1.3.3 Oxidação anaeróbica do nitrogênio (Anammox)	23
2.1.4 Domínio Archaea	24
2.1.5 Arquéias e bactérias amônio oxidantes	25
2.2 Material e métodos	27
2.2.1 Coleta das amostras de solo	27
2.2.2 Análise física e química do solo	29
2.2.3 Quantificação do nitrogênio mineral do solo	30
2.2.4 Contabilização e identificação de espécies arbóreas presentes nas áreas	30
2.2.5 Extração de DNA das amostras de solo	30
2.2.6 Análise em PCR em tempo real (qPCR)	31
2.2.7 Análise em gel de eletroforese em gradiente desnaturante (PCR-DGGE)	31
2.2.8 Análise estatística	35
2.2.9 Sequenciamento parcial do gene 16S DNAr por pirosequenciamento	36
2.2.10 Análise das sequências obtidas por pirosequenciamento	39
2.3 Resultados e discussão	39
2.3.1 Análise física e química do solo	39
2.3.2 Abundância de AOA, AOB e BFNVL	42
2.3.3 Estrutura das comunidades de AOA, AOB e BFNVL	45
2.3.4 Análise de redundância (RDA) da estrutura das comunidades de AOA, AC	ве
BFNVL	50

# SUMÁRIO

2.3.5	Análise	taxonômica	das	comunidades	microbianas	por	meio	de
pirosec	quenciame	ento						. 55
2.3.6 A	nálise da	s comunidade	s micro	obianas do solo l	baseada em U⁻	ΓOs		. 56
2.3.7 🤆	Grupos de	Bactéria que	ocorre	m nos solos de l	Vata Atlântica d	do Est	ado de	São
Paulo								. 60
3 CON	CLUSÕE	S						. 63
REFEF	RÊNCIAS							. 65

#### RESUMO

# Diversidade e abundância de fixadores de nitrogênio de vida livre e microorganismos amônio oxidantes em solos de Mata Atlântica do Estado de São Paulo

A estrutura das comunidades de arquéias e bactérias amônio oxidantes (AOA e AOB, respectivamente) e de bactéria fixadoras de nitrogênio de vida livre (BFNVL) foi avaliada em amostras de solo coletadas em três áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo (Santa Virgínia, Picinguaba e Restinga) por meio de metodologias independentes de cultivo. Após a extração do DNA do solo, o perfil das comunidades de AOA, AOB e BFNVL foi acessado por PCR-DGGE e seus respectivos genes, amoA, 16S DNAr e nifH, guantificados por meio de gPCR. Além disso, foi realizado o pirosequenciamento do gene 16S DNAr da região V3 em arquéias e da região V4 de bactérias. Os dados foram submetidos às análises de redundância (RDA) e similaridade (ANOSIM) e ao teste de Mantel. Foram observadas diferencas significativas na estrutura das comunidades de AOA. AOB e BFNVL, sugerindo que a cobertura vegetal, assim como os atributos físico-químicos do solo, influencia a atividade destes micro-organismos nas três áreas. Santa Virgínia e Picinguaba apresentaram maior abundância de AOA e AOB, sendo AOA proporcionalmente mais abundante do que AOB em todas as áreas. Já as comunidades de BFNVL foram mais abundantes em Santa Virgínia e Restinga. A diversidade das comunidades de Crenarchaeota foi similar entre as áreas, porém, Picinguaba revelou maior diversidade de unidades taxonômicas operacionais (UTOs). Este trabalho possibilitou uma primeira exploração da diversidade e abundância das comunidades de AOA, AOB e BFNVL nos solos de Mata Atlântica do Estado de São Paulo, sendo que as informações obtidas poderão auxiliar futuros estudos sobre o entendimento do papel destas comunidades no ciclo global do nitrogênio na Terra.

Palavras-chave: *amo*A; *nif*H; 16S DNAr; qPCR; DGGE; Pirosequenciamento

#### ABSTRACT

# Diversity and abundance of the free-living nitrogen-fixing bacteria and ammonia-oxidizing microorganisms in Atlantic Forest soils of the São Paulo State

The community structure of ammonia-oxidizing archaea and bacteria (AOA and AOB, respectively) and free-living nitrogen-fixing bacteria was evaluated in soil samples collected in three areas of Atlantic forest of São Paulo (Santa Virgínia, Picinguaba and Restinga) using culture-independent molecular techniques. After DNA extraction from the soil samples, AOA, AOB and BFNVL profiles were accessed by PCR-DGGE, and their respective genes (amoA, nifH and 16S rDNA) were quantified by gPCR. In addition, it was performed the pyrosequencing of the 16S rDNA variable V3 and V4 regions of archaea and bacteria, respectively. The data were subjected to redundancy analysis (RDA); analysis of similarity (ANOSIM); and the Mantel test. There were significant differences in the AOA, AOB and BFNVL community structure, suggesting that the vegetation cover and the physical and chemical attributes of soil influences the activity of these micro-organisms from the three areas. AOA and AOB were more abundant in Santa Virginia and Picinguaba, and AOA was more abundant than AOB in all areas. On the other hand, BFNVL communities were more abundant in Santa Virginia and Restinga. The diversity of Crenarchaeota communities was similar among the three areas, however, Picinguaba revealed greater diversity of operational taxonomic units (OTUs). This study allowed the first evaluation of the diversity and abundance of AOA, AOB and free-living nitrogen-fixing bacteria communities in the soils of the Atlantic Forest of the São Paulo State, Brazil. The information obtained here will support future studies focused on the role of these communities in the global nitrogen cycle on Earth.

Keywords: *amo*A; *nif*H; 16S DNAr; qPCR; DGGE; Pyrosequencing

#### LISTA DE FIGURAS

- Figura 5 Logarítimo do número de cópias (média ± erro padrão) do gene *nif*H de BFNVL encontrado por grama de solo de três áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo. Barras do histograma com a mesma letra não diferem estatisitcamente entre si (Tukey, α = 5%)......45

- Figura 8 Análise de redundância canônica (RDA) comparando os atributos químicos (pH, matéria orgânica, teores de amônio e nitrato) do solo que determinam a composição da comunidade de AOA, AOB e BFNVL em solos de três áreas de Mata Atlântica. Foi utilizado o teste de Monte Carlo

- Figura 12 Diagrama de Venn representando o número de UTOs compartilhadas entre as amostras de solo de três áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo. Santa Virgínia (SV), Picinguaba (PC) e Restinga (RE) ....... 59

#### LISTA DE TABELAS

- Tabela 5 Resultado da análise química dos solos coletados em de três áreas deMata Atlântica do Estado de São Paulo ......41
- Tabela 6 Concentração (µg/g de solo) (média ± erro padrão) de amônio e nitrato em três áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo ......42
- Tabela 7 Índice de similaridade (ANOSIM) entre três áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo quanto à estrutura de comunidades de BFNVL (gene *nif*H) e de AOA e AOB (gene 16S DNAr) presentes no solo .......49

- Tabela 10 Número de sequências em nível de gênero pertencentes AOB e BFNVLencontradas em sequências geradas por pirosequenciamento.......61

# 1 INTRODUÇÃO

Os micro-organismos do solo são considerados essenciais nos ciclos biogeoquímicos globais, promovendo a disponibilização de nutrientes dentro das cadeias tróficas em sistemas aquáticos e terrestres.

No ciclo do nitrogênio a transformação deste elemento pela microbiota do solo ocorre de várias formas como, por exemplo, pela fixação biológica do N<sub>2</sub> e pela nitrificação. Na fixação biológica do nitrogênio, o N<sub>2</sub> atmosférico é convertido em amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) por meio de diazotróficos bacterianos de vida livre ou simbióticos (ZHANG et al., 2006). Embora a maior parte do nitrogênio fixado em ecossistemas terrestres seja conduzida por bactérias simbióticas em associação com plantas, tais como as leguminosas, as bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre (BFNVL) do solo têm mostrado sua importância na provisão do nitrogênio em vários ecossistemas (CLEVELAND et al., 1999). Nestes micro-organismos, os genes *nif* são responsáveis pela codificação de duas subunidades da nitrogenase que são altamente conservadas (FALKOWSKI; FENCHEL; DELONG, 2008). Estudos filogenéticos baseados nestes genes mostraram resultados similares aos obtidos a partir do gene 16S RNAr e, por isso, o gene *nif*, passou a ser utilizado para a caracterização da diversidade de bactérias diazotróficas (ZEHR et al., 2003).

A nitrificação é outra etapa do ciclo do nitrogênio em que os micro-organismos do solo participam ativamente, convertendo amônio  $(NH_4^+)$  em nitrato  $(NO_3^-)$ . Os micro-organismos que participam desta transformação são denominados amônio oxidantes. Este processo consiste de duas fases. Na primeira, o  $NH_4^+$  é oxidado em nitrito  $(NO_2^-)$  e, na segunda, o  $NO_2^-$  é oxidado em  $NO_3^-$ . Alguns estudos têm sugerido que a oxidação do  $NH_4^+$  no solo é impulsionada primordialmente por arquéias amônio oxidantes (AOA) (TOURNA et al., 2008), enquanto outros apontam o papel das bactérias amônio oxidantes (AOB) (JIA; CONRAD, 2009).

A oxidação do NH4<sup>+</sup> em hidróxido de amônio (NH4OH) por AOA e AOB é mediada pelo produto da expressão do 'operon' *amo* (amônio oxidase), que é composto pelos genes *amo*A, *amo*B e *amo*C (LEININGER et al., 2006). Uma vez que o gene *amo*A é conservado entre estes micro-organismos, ele se tornou alvo de estudos independentes de cultivo, sendo usado como marcador molecular para o acesso de comunidades de AOA e AOB (FRANCIS et al., 2005).

Embora vários estudos tenham focado sobre a diversidade de AOA, AOB e BFNVL em vários ambientes, informações desta natureza são ainda desconhecidas para vários ecossistemas, tais como os que compõem a Mata Atlântica. A Mata Atlântica é considerada um dos biomas mais ricos e antigos do mundo, sendo formado por ecossistemas diferenciados e caracterizados, principalmente, pelas condições locais de clima e relevo (DUBOIS, 2008). Em suas florestas, os solos são heterogêneos e ricos em diversidade microbiana (NACKE, 2011), sendo esta fração essencial na disponibilização dos nutrientes, principalmente o nitrogênio, para a fauna e flora (TONHASCA JR., 2005). Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi estudar a diversidade e abundância das comunidades de AOA, AOB e BFNVL em solos de três áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo.

#### 2 DESENVOLVIMENTO

#### 2.1 Revisão bibliográfica

### 2.1.1 Bioma Mata Atlântica

A Mata Atlântica é um dos biomas mais ricos e antigos do mundo, sendo formado por ecossistemas diferenciados e caracterizados, principalmente, pelas condições locais de clima e relevo. Este bioma é encontrado no Brasil, Argentina, Paraguai e, em menor proporção, no Uruguai. No Brasil as faixas de Mata Atlântica se estendem pela costa do Rio Grande do Sul até o Ceará. (DUBOIS, 2008).

No Brasil pré-colonial a Mata Atlântica possuía cerca de 1,2 milhões de quilômetros quadrados de floresta nativa, mas atualmente esta área não ultrapassa os 100 mil Km<sup>2</sup>, ou seja, 7% da área original. Esta redução se deve ao desmatamento indiscriminado, visando à abertura de novas áreas para a agricultura, urbanização e industrialização (MIRANDA; CANELLAS; NASCIMENTO, 2007).

Os ecossistemas associados à Mata Atlântica são formados por florestas ombrófilas, que por sua vez são compostos por matas pluviais montanas, submontanas e de baixada. Além disso, existem as florestas ombrófilas mistas que correspondem às matas sulinas, onde predominam as araucárias e lauráceas; florestas estacionárias e semidecíduas; mangues; restingas; campos de altitude; brejos interioranos; florestas nordestinas; e ilhas costeiras e oceânicas (CÂMARA, 2005).

Do ponto de vista edafoclimático, as regiões de Mata Atlântica possuem características bastante distintas. Por exemplo, a Serra do Mar, incluída no 'hot spot' Mata Atlântica, é uma região com regime de vento, chuva e salinidade muito heterogêneo devido às variações topográficas, alterações de fertilidade e da idade pedogenética dos solos. Tais condições proporcionam uma grande heterogeneidade ambiental que reflete no perfil das espécies de plantas e animais estabelecidos na região (SANCHEZ, 2001).

A importância da Mata Atlântica reside em sua reserva biológica, que é considerada uma das mais ricas do mundo. Contudo, esta riqueza demanda uma alta quantidade de nutrientes dentro da cadeia trófica (TONHASCA JR., 2005), os quais são fornecidos, principalmente, via solo. Os solos de Mata Atlântica são ricos em matéria orgânica que é um dos constituintes fundamentais da fertilidade do sistema (MIRANDA; CANELLAS; NASCIMENTO, 2007). Além disso, estes solos se

distinguem de outras formações geológicas pela alta diversidade e atividade microbiana (TONHASCA JR., 2005).

Dentro deste complexo formado pela matéria orgânica e pela diversidade microbiana, nem todos os elementos encontrados nos solos de Mata Atlântica estão prontamente disponíveis para as plantas como, por exemplo, o nitrogênio (MIRANDA; CANELLAS; NASCIMENTO, 2007, GAMA-RODRIGUES et al., 2008). Neste ponto, as comunidades microbianas do solo exercem um importante papel na disponibilização dos elementos dentro da cadeia trófica, tornando fauna e flora altamente dependentes destas comunidades (TONHASCA JR., 2005).

# 2.1.2 Comunidade microbiana do solo

O sistema solo é um ambiente heterogêneo e um dos mais ricos em diversidade microbiana (NACKE, 2011). Neste sistema, os micro-organismos participam da decomposição da matéria orgânica, formação do solo, ciclagem de nutrientes, interações com plantas (WARDLE et al., 2004, FEENEY et al., 2006, VAN DER HEIJDEN et al., 2008, HARRIS, 2011) e manutenção da resiliência do sistema (CHAER et al., 2009). Solos com altos teores de biomassa microbiana são considerados mais estáveis microbiologicamente, tendo seu funcionamento menos afetado após perturbações (GRIFFITHS et al., 2000, CHAER et al., 2009). Entretanto, o desmatamento e o uso inadequado do solo podem prejudicar essas comunidades e, consequentemente, limitar suas atividades (DANIEL, 2005, CHAER et al., 2009, WESSÉN; HALLIN, 2011).

Em solos de florestas e agrícolas, as comunidades microbianas contribuem para o crescimento de plantas por meio da disponibilização de nutrientes (VAN DER HEIJDEN et al., 2008) ou supressão de doenças (GARBEVA; VEEN; ELSAS, 2004). Neste último ponto, alguns trabalhos têm apontado que as plantas recrutam ativamente micro-organismos benéficos do solo em sua rizosfera, visando suprimir o ataque de patógenos (MENDES et al., 2011). Considerando que essa supressão é proporcional a abundância e diversidade das comunidades microbianas presentes no solo (GARBEVA; VEEN; ELSAS, 2004), ela pode responder pela saúde das plantas que compõem uma floresta.

A estrutura e a funcionalidade das comunidades microbianas variam de acordo com as propriedades do solo (pH, temperatura e teor de oxigênio), assim como o seu tipo de uso e ocupação (HAYDEN et al., 2010). Além destes fatores, a matéria orgânica do solo, oriunda principalmente de material vegetal, é conhecida como uma importante fonte de energia para os micro-organismos do solo, principalmente para os envolvidos nos ciclos biogeoquímicos terrestres (RASCHE et al., 2011).

# 2.1.3 Ciclo do nitrogênio

O nitrogênio é o quinto elemento mais abundante do sistema solar e dentro dos organismos é essencial para a síntese de diversos compostos, como os ácidos nucléicos e proteínas (ZEHR; KUDELA, 2011). O ciclo biogeoquímico desse elemento é quase que inteiramente dependente de reações de oxi-redução mediadas por micro-organismos (CANFIELD et al, 2010).

Devido o nitrogênio elementar (N<sub>2</sub>) ser inerte, o nitrogênio na forma de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ou amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) torna-se um fator limitante para a produtividade primária em ambientes aquáticos e terrestres (FALKOWSKI; FENCHEL; DELONG, 2008). Por isso os micro-organismos são considerados essenciais na disponibilização do nitrogênio em sistemas aquáticos e terrestres, onde atuam na conversão do N<sub>2</sub> atmosférico em NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (LAM; KUYPERS, 2010, ZEHR; KUDELA, 2011).

### 2.1.3.1 Fixação biológica do nitrogênio

De todas as variáveis que apontam os micro-organismos como elementos chave no ciclo do nitrogênio, uma das mais importantes é a fixação biológica do nitrogênio. A fixação biológica é realizada pelos micro-organismos simbióticos e os de vida livre, sendo responsável pela entrada de 97% de todo nitrogênio encontrado em ecossistemas terrestres (CUSACK et al., 2009, REED et al., 2011). A fixação simbiótica do nitrogênio ocorre pela associação dos micro-organismos com algumas espécies de plantas como, por exemplo, as leguminosas (SPRENT; STRENT, 1990). Já os fixadores de nitrogênio de vida livre, comumente chamados de não simbióticos, atuam sobre superfícies de plantas, material orgânico em decomposição e solo (BARRON et al., 2008), sendo muito importantes para a entrada do nitrogênio em ambientes florestais (REED et al., 2007).

A fixação biológica do nitrogênio é catalisada pela enzima nitrogenase que requer ferro e molibdênio como co-fatores. A reação resultante é altamente exergônica, com elevada energia de ativação, a qual é inibida na presença de

oxigênio (CANFIELD, 2010). Nesse processo, os genes *nif* são responsáveis pela codificação de duas subunidades da nitrogenase que são altamente conservadas, os quais são encontrados nos microrganismos fixadores de nitrogênio (FALKOWSKI; FENCHEL; DELONG, 2008). Entre os genes *nif* estão os genes *nifD*, *nifH* e *nifK*, que são todos codificadores das proteínas do complexo nitrogenase (SARITA et al., 2008). O complexo nitrogenase é composto por duas unidades básicas: uma ferro-proteína, que coleta a força redutora e a energia; e uma proteína ferro-molibdênio, que coleta e reduz o substrato (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A filogenia obtida a partir de genes *nif* mostrou ser similar à obtida pela filogenia baseada no gene 16S RNAr e, por isso, o gene *nif*, passou a ser utilizado para a caracterização da diversidade de bactérias diazotróficas (ZEHR et al., 2003).

#### 2.1.3.2 Nitrificação e desnitrificação

A nitrificação é outra etapa do ciclo do nitrogênio em que os micro-organismos possuem um importante papel, promovendo a conversão do amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) em nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Os micro-organismos que participam desta transformação são denominados amônio oxidantes. Este processo consiste em duas etapas. Na primeira, o amônio é oxidado em nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e, na segunda, o NO<sub>2</sub><sup>-</sup> é oxidado em NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Cada etapa é realizada por grupos específicos de micro-organismos, todos classificados como quimiolitoautotróficos. As duas reações necessitam de oxigênio como aceptor terminal de elétrons (CANFIELD; GLAZER; FALKOWSKI, 2010, LAM; KUYPERS, 2010, CAVICCHIOLI, 2011), sendo que os elétrons e prótons derivados da oxidação do NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup> são utilizados pelos micro-organismos para fixar o carbono na ausência de luz, sendo, por isso, chamados de quimioautotróficos (CANFIELD; GLAZER; FALKOWSKI, 2010).

A nitrificação ocorre predominantemente em ambientes aeróbios. No entanto, sabe-se que comunidades microbianas nitrificantes encontradas em sedimentos de estuários são responsáveis pela oxidação do  $NH_4^+$  sob diferentes níveis de oxigênio (ABELL et al., 2010).

Depois de gerado, o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> pode ser reduzido na ausência de oxigênio por vários micro-organismos, sendo usado como aceptor final de elétrons na respiração num processo chamado de desnitrificação (CANFIELD; GLAZER; FALKOWSKI, 2010). Na desnitrificação estão envolvidos mais de 60 gêneros de arquéias e bactérias,

bem como alguns eucariotos (fungos e protozoários). Esse processo envolve quatro metaloenzimas: nitrato redutase dissimilatória, nitrito redutase, óxido nítrico redutase e oxido nitroso redutase. O N<sub>2</sub>O é um intermediário obrigatório da desnitrificação e é considerado um importante gás de efeito estufa (WUEBBLES, 2009, CODISPODI, 2010).

A nitrificação e desnitrificação são afetadas diretamente pelas características do solo, como a aeração, temperatura, umidade, aplicação de fertilizantes, matéria orgânica, relação C/N e presença de elementos tóxicos aos micro-organismos (SNYDER et al., 2009).

# 2.1.3.3 Oxidação anaeróbica do nitrogênio (Anammox)

Uma rota alternativa do nitrogênio fixado é encontrada em um grupo de bactérias conhecidas como Planctomicetos. Neste grupo a oxidação do  $NH_4^+$  é acoplada a redução do  $NO_2^-$ , num processo chamado de 'anammox' (Anaerobic Ammonium Oxidation) (KLOTZ; STEIN, 2008, KUENEN, 2008). Esse processo pode dominar a produção de  $N_2$  em ambientes aquáticos (DALSGAARD et al., 2003; KUYPERS et al., 2003; STEVENS; ULLOA, 2008), sedimentos marinhos (HIETANEN; KUPARINEN, 2008, RICH et al, 2008) e mares congelados (RYSGAARD et al., 2008). Devido a combinação do amônio com o nitrito, neste processo não ocorre a produção de  $N_2O$  (STROUS et al., 2006). Por outro lado, a distribuição, diversidade e atividade de 'anammox' em ambientes terrestres permanecem ainda pouco conhecidas (HUMBERT et al., 2010). Juntas, a desnitrificação e 'anammox' encerram o ciclo do nitrogênio, com o retorno do  $N_2$  para a atmosfera (CANFIELD; GLAZER; FALKOWSKI, 2010).

# 2.1.4 Bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre (BFNVL)

Embora a maior parte da fixação de nitrogênio ser através da associação de bactérias com leguminosas, as entradas deste elemento via fixação por bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre (BFNVL) (diazotróficas) são muito importantes para a manutenção da fertilidade em vários ecossistemas (CLEVELAND et al. 1999). Entre estes micro-organismos podem ser citados as pseudomonas, azospirillum, azotobacter, os quais podem fixar quantidades significativas de nitrogênio (0 a 60 Kg N ha<sup>-1</sup> por ano) (CLEVELAND et al., 1999).

A população de BFNVL é regulada por diversos fatores, tais como predação, disponibilidade de nutrientes (VITOUSEK; HOWARTH, 1991, REED et al., 2007), temperatura (KEOUGH; SCHMIDT; HICKS, 2003) e umidade (ROSKOSKI, 1980). Além disso, a atividade fixadora de BFNVL pode ser induzida ou estimulada por aumento da relação C:N ou pela disponibilidade de fontes de C facilmente degradáveis, tais como restos vegetais e exudados de raízes (BÜRGMANN et al., 2003).

Os estudos sobre a diversidade de BFNVL e os fatores que influenciam a sua diversidade são muito importantes para o entendimento do movimento global do nitrogênio em nosso planeta (ZHANG et al., 2006). Esta diversidade tem sido acessada através da marcação do gene *nif*H (ZEHR et al., 2003, ZHANG et al., 2006, WAKELIN, 2010).

#### 2.1.4 Domínio Archaea

A maioria dos estudos microbiológicos ambientais tem focado a diversidade de bactérias e fungos. Por décadas as arquéias foram erroneamente classificadas como bactérias por possuírem características morfológicas semelhantes. Contudo, estudos moleculares posteriores demonstraram que arquéias e bactérias estão em domínios distintos (WOESE; KANDLERT; WHEELIS, 1990, ALLERS; MEVARECH, 2005). Estes domínios podem ser diferenciados pelo RNAt, RNAr, membrana citoplasmática, composição da parede celular e características de adaptação a ambientes extremos (VALENTINE, 2007).

As arquéias possuem membrana citoplasmática composta de éteres de isopropanil de glicerol, apenas um envoltório celular; RNAt com 1-metilpseudouridina no lugar de ribotimina; e vários cofatores diferentes dos relatados para bactérias (JURGENS, 2002). Além disso, as arquéias têm prosperado durante milhões de anos sob condições extremas de salinidade, temperatura e pH, levando a algumas inferições de que elas exigem tais condições para sobreviver (DELONG, 1992). Mas é a adaptação ao estresse crônico de energia, devido à baixa permeabilidade de membrana (VALENTINE, 2007), aliada a uma via metabólica única com enzimas catalisadoras exclusivas (SATO; ATOMI, 2011) que permitem a diferenciação de arquéias e bactérias. Sabe-se ainda, que as arquéias não são específicos de ambientes extremos, mas que dividem os mais diferentes habitats terrestres com bactérias e outros micro-organismos.

As arquéias representam uma fração considerável da diversidade de microrganismos em ecossistemas marinhos e terrestres, sendo importantes nos ciclos biogeoquímicos globais (DELONG, 2006). Apesar da ampla distribuição das arquéias nos ambientes terrestres, grupos específicos são encontrados em locais geográficos e ecossistemas que possuem geoquímicas particulares (SCHLEPER et al., 2005).

A maioria das linhagens de arguéias conhecida foi descrita por aproximações filogenéticas moleculares, entretanto, ainda permanecem as dificuldades de cultivo destes micro-organismos (SCHLEPER et al., 2005). Baseado em seu RNAr, o domínio Archaea consiste de cinco filos distintos: Crenarchaeota, Euryarchaeota, Korarchaeota. Nanoarchaeota е Thaumarchaeota (SPANG, 2010). Em Crenarchaeota existem espécies aeróbias e anaeróbias com ampla diversidade fisiológica e são conhecidas como hipertermófilas, enquanto que em Euryarchaeota predominam as espécies tolerantes as adversidades ambientais, tais como as metanogênicas, halófilas extremas e termoacidófilas (BROCHIER-ARMANET et al., 2008). Membros de Korarchaeota já foram encontrados em vários ambientes, mas nenhuma espécie pôde ainda ser cultivada. Nanoarchaeota é o menor dos filos e seus representantes são simbióticos, sendo Nanoarchaeum equitans o seu principal representante (ALLERS; MEVARECH, 2005). Thaumarchaeota foi descrito recentemente, com base em análises genômicas e de comparação filogenética entre três genomas de arquéias amônio oxidante oriundas de ambientes marinhos e termofílicos (KRUPOVIC, 2011). Genes de Thaumarchaeota, incluindo o 16S rRNA e os que codificam a enzima que participa da oxidação do amônio, têm sido detectados em diferentes ambientes, tais como no solo (LEININGER et al., 2006; TREUSCH et al., 2005), estuários, plâncton marinho, fontes termais terrestres e aquáticas (SPANG et al., 2010), o que evidência a participação ativa deste grupo microbiano no ciclo biogeoquímico do nitrogênio, especialmente na nitrificação.

### 2.1.5 Arquéias e bactérias amônio oxidantes

Até pouco tempo as bactérias amônia oxidante (AOB) eram consideradas como os únicos organismos responsáveis pela oxidação do NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (ERGUDER et al.,

2009). Contudo, estudos metagenômicos apontaram a participação de arquéias na oxidação do NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em ecossistemas marinhos e terrestres, surgindo a denominação de arquéias amônio oxidantes (AOA) (VENTER et al., 2004, SCHLEPER; JURGENS; JONUSCHEIT, 2005, TREUSCH et al., 2005). A oxidação do NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) por arquéias e bactérias é mediada pelo produto da expressão do 'operon' *amo* (amônio oxidase), que é composto pelos genes *amo*A, *amo*B e *amo*C (LEININGER et al., 2006). Uma vez que o gene *amo*A é conservado entre estes micro-organismos, ele se tornou alvo de estudos independentes de cultivo, sendo usado como marcador molecular para o acesso de comunidades de AOA e AOB (FRANCIS et al., 2005).

Estudos sobre o gene *amo*A revelaram a composição das comunidades de AOA e AOB em vários ambientes, tais como o solo (LEININGER et al., 2006), subsolo (DI et al., 2010), fontes termais (HATZENPICHLER et al., 2008), estuários (CAFFREY et al., 2007; SANTORO et al., 2008), ecossistemas marinhos (FRANCIS et al., 2007; BEMAN et al., 2008), sedimentos (FRANCIS et al., 2005; PARK et al., 2008), biofiltradores, biorreatores e sistemas de águas residuais (PARK et al., 2006; JIN et al., 2011).

A presença de AOA no solo foi comprovada por Treusch et al. (2005), os quais demonstraram que a expressão do amoA aumentou com a adição de amônia no solo. Já Konneke et al. (2005) foram os primeiros a isolar uma AOA do solo, Candidatus Nitrosopumilus maritimus. Este isolado foi usado em cultura pura para comprovar a presença do gene amoA, e para comprovar a oxidação do NH4<sup>+</sup> na ausência de carbono orgânico. Leininger et al. (2006) utilizaram o gPCR para quantificar a expressão do gene amoA de AOA e AOB em solos agrícolas e florestais, constatando que as AOA podem compor o grupo mais abundantes no solo. Segundo Wuchter et al. (2006), a abundância do amoA de arquéias em ambientes marinhos é duas vezes maior que o de bactérias nitrificantes. Além disso, cópias de amoA de arguéias foram encontradas em altas proporções nos solos do Monte Everest a 5400 m de altitude (ZHANG et al. 2009), e em solos submetidos a altas doses de fertilizantes nitrogenados durante anos (SHEN et al. 2008). Tourna et al. (2011) isolaram e cultivaram Nitrososphaera viennensis que é uma arquéia amônio oxidante encontrada no solo, dando maior subsídio as inferências feitas com base na detecção molecular de tais organismos.

Existem controvérsias quanto às condições predominantes para uma maior atividade de AOA ou AOB na oxidação do NH4<sup>+</sup> nos solos. Alguns estudos têm sugerido que a oxidação do NH4<sup>+</sup> no solo é impulsionado primordialmente por AOA (TOURNA et al., 2008), enquanto outros apontam que este processo é impulsionado por AOB (JIA; CONRAD, 2009). No entanto, tais comunidades encontram-se em equilíbrio no solo, sendo uma mais ou menos funcional do que a outra, devido aos fatores ambientais, tais como o pH (NICOL et al., 2008), salinidade (MOSIER; FRANCIS, 2008) e concentração de metais pesados (LI et al., 2009, MERTENS et al., 2009). Segundo Di et al. (2010), as arquéias e bactérias amônio oxidantes atuam diferencialmente sob diferentes concentrações de nitrogênio mineral, principalmente devido a modulação de seu desenvolvimento por tal fator. Dentro deste contexto, as AOB são favorecidas pela alta disponibilidade de nutrientes no solo, enquanto que as AOA preferem ambientes oligotróficos, ou seja, com baixa disponibilidade de nutrientes (VALENTINE, 2007; ERGUDER et al., 2009).

# 2.2 Material e métodos

Os experimentos foram realizados no Departamento de Ciências do Solo, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ/USP, em Piracicaba, SP, Brasil.

# 2.2.1 Coleta das amostras de solo

A diversidade de comunidades de bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre (BFNVL) e de arquéias e bactérias amônio oxidantes (AOA e AOB, respectivamente) foi avaliada em amostras de solo coletadas em três áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo (Figura 1). Estas áreas estão inseridas em dois núcleos dentro do Parque Estadual da Serra do Mar e foram previamente divididas num 'grid' amostral identificado no projeto temático Biota intitulado: 'Gradiente Funcional – Composição Florística, Estrutura e Funcionamento da Floresta Ombrófila Densa dos Núcleos Picinguaba e Santa Virgínia do Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo, Brasil', (Processo FAPESP 03/12595-7; Coordenação: Dr. Carlos A. Joly – UNICAMP; e Dr. Luiz A. Martinelli – CENA/USP).

No núcleo Picinguaba (23°34' S e 45°02' W) as amostras de solo foram coletadas em uma área de restinga (0–5 m de altitude), que correspondeu a parcela

'A' do 'grid' amostral, e numa área de terras baixas (50–100 m de altitude), que correspondeu a parcela 'E'. Já no núcleo Santa Virginia (23°17' S e 45°11' W) as coletas foram realizadas em uma área montanhosa (900–1000 m de altitude) (Figura 2).



Figura 1 – Foto de satélite mostrando a localização das três áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo onde as amostras de solo foram coletadas: Santa Virgínia, Picinguaba e Restinga



Figura 2 – Foto de satélite mostrando as características do terreno e indicação dos pontos de coleta por cores em cada uma das três áreas de Mata Atlântica: (A) Santa Virgínia (amarelo), (B) Restinga (verde) e (C) Picinguaba (azul)

As amostras de solo foram coletadas em cinco pontos diferentes por área, sendo que cada amostra recebeu uma notação específica (sigla) que indicou o local, parcela e subparcela das quais pertenciam (Tabela 1). Cada amostra foi composta de uma porção de solo superficial (0–10 cm de profundidade) contendo

aproximadamente 100 g, a qual foi coletada com auxílio de uma pá e acondicionada em sacos plásticos. As amostras foram mantidas sob refrigeração a 4 °C até a realização dos experimentos.

Amostra	Local	'Grid' amostral *	Sigla
1	Santa Virgínia	Parcela N, subparcela 92	SV1
2	Santa Virgínia	Parcela N, subparcela 74	SV2
3	Santa Virgínia	Parcela N, subparcela 96	SV3
4	Santa Virgínia	Parcela N, subparcela 80	SV4
5	Santa Virgínia	Parcela N, subparcela 71	SV5
6	Picinguaba	Parcela E, subparcela 51	PC1
7	Picinguaba	Parcela E, subparcela 23	PC2
8	Picinguaba	Parcela E, subparcela 39	PC3
9	Picinguaba	Parcela E, subparcela 75	PC4
10	Picinguaba	Parcela E, subparcela 58	PC5
11	Restinga	Parcela A, subparcela 01	RE1
12	Restinga	Parcela A, subparcela 22	RE2
13	Restinga	Parcela A, subparcela 35	RE3
14	Restinga	Parcela A, subparcela 53	RE4
15	Restinga	Parcela A, subparcela 77	RE5

Tabela 1 – Notação utilizada para a identificação das amostras de solo coletadas em três áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo

\* As parcelas foram de 1 ha, as quais foram subdivididas em 100 subparcelas de 100 m<sup>2</sup>

# 2.2.2 Análise física e química do solo

As análises físicas e químicas das amostras de solo coletadas foram realizadas no Departamento de Ciência do Solo, da ESALQ/USP de acordo com os protocolos presentes no endereço eletrônico <a href="http://www.solos.esalq.usp.br/metodo.html">http://www.solos.esalq.usp.br/metodo.html</a>. Entretanto, apenas três das cinco amostras de solo foram utilizadas para as análises.

#### 2.2.3 Quantificação do nitrogênio mineral do solo

O nitrogênio mineral do solo (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) foi quantificado por extração em KCl 2 normal (N), seguida de destilação. Foram utilizados 10 g de solo de cada área em 50 mL de KCl 2 N, seguido de agitação a 200 rpm por 2 h. Após a decantação das partículas do solo, o sobrenadante foi filtrado e submetido a duas destilações. Na primeira destilação, o amônio foi determinado após a adição de óxido de magnésio ao extrato, seguido de titulação com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,0025 N. Na segunda destilação, o nitrato foi determinado no mesmo extrato pela adição de liga de Devarda que converte o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (KEENEY; NELSON, 1982).

#### 2.2.4 Contabilização e identificação de espécies arbóreas presentes nas áreas

Os dados sobre as espécies arbóreas que ocorrem em cada uma das três áreas de Mata Atlântica estudadas aqui foram obtidos dos "Relatórios Anuais" do "Projeto Temático Biota Gradiente Funcional" financiado pela FAPESP que está sob a responsabilidade dos Professores Coordenadores: Carlos A. Joly (Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP) e Luiz A. Martinelli (Centro de Energia Nuclear na Agricultura/CENA – Universidade de São Paulo/USP).

Em cada parcela foram identificados e contados todos os indivíduos arbóreos vivos, incluindo as palmeiras e pteridófitas (fetos arborescentes), com perímetro à altura do peito (PAP; 1,30 m) ≥ 15 cm (4,8 cm de diâmetro ao nível do peito – 1 DAP), segundo metodologia apresentada no I Relatório Anual (JOLY; MARTINELLI, 2006). Árvores mortas em pé e ligeiramente tombadas (inclinação < 30 °) também foram contabilizadas e identificadas. Além disso, a altura total e a altura do fuste foram estimadas visualmente para cada indivíduo registrado.

Estes dados foram utilizados no presente trabalho para comparar a diversidade florestal com a estrutura das comunidades de AOA, AOB e BFNVL presentes no solo em cada uma das três áreas de Mata Atlântica estudadas.

# 2.2.5 Extração de DNA das amostras de solo

A partir de cada uma das 15 amostras de solo o DNA foi extraído utilizando o 'Power Soil DNA kit' (MoBio; EUA) seguindo a metodologia descrita pelo fabricante. Após a extração, a integridade e a qualidade dos DNAs foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1,5% (w/v) por 1 h a 90 Volts em tampão TAE 0,5 x (20 mM Tris, 10 mM acetato, 0,5 mM EDTA; pH 8), seguido de coloração em brometo de etídio por 20 min e observação em luz ultravioleta.

### 2.2.6 Análise em PCR em tempo real (qPCR)

As análises em qPCR foram realizadas para quantificar os genes de interesse nas amostras de solo das três áreas de Mata Atlântica estudadas. As reações foram realizadas no equipamento RotorGene 3000 (Cobertt Research, Austrália), do Laboratório de Microbiologia Molecular, da ESALQ/USP, utilizando os sistema 'SYBR Greenl'.

As reações de qPCR foram realizadas em 25 µL contendo 12,5 µL do 'kit Platinum® Quantitative PCR SuperMix - UDG' (Invitrogen, Brasil) e 10 nM de oligonucleotídeos. Para as amplificações do gene *amo*A de AOA foram utilizados os 'primers' *amo*196F e *amo*277R (Tabela 2), os quais foram amplificados por desnaturação inicial de 3 min a 95 °C, seguidos de 35 ciclos de 15 s a 95 °C; 40 s a 55 °C e 30 s a 72 °C. Já para as amplificações do fragmento 16S DNAr de AOB foram utilizados os 'primers' CTO189fA/CTO189fB, CTO189fC e R1 (Tabela 2), os quais foram realizadas a 95 °C/3 min, seguidos de 35 ciclos de 30 s a 95°; 1 min a 58 °C; 45 s a 68 °C; e 5 min a 68 °C. Para as amplificações do gene *nif*H foram utilizados os 'primers' FGPH19 e PolR (Tabela 2), os quais foram realizadas de 5 min a 95 °C, seguidos de 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 45 s a 57 °C, 1 min a 72 °C; 7 min a 72 °C.

Para a quantificação dos genes *amo*A, 16S DNAr (AOB) e *nif*H as curvas padrões foram obtidas por meio de amplificações com o número de cópias conhecido do DNA molde adicionado nas reações. As diluições do DNA de *amo*A, *nif*H e 16S de AOB foram utilizadas para a amplificação e obtenção das curvas padrões. 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.

### 2.2.7 Análise em gel de eletroforese em gradiente desnaturante (PCR-DGGE)

As comunidades de AOA foram analisadas pelo fragmento do gene 16S DNAr Crenarchaeal como marcador molecular. As reações de PCR foram realizadas utilizando 'primers' CrenamoA23f e CrenamoA616r, conforme protocolo descrito por Tourna et al. (2008). A amplificação do gene 16S DNAr ocorreu em 50 µL de solução contendo: 5 µL de 10x Tampão Taq (750 mM Tris-HCL pH 8,8, 200 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,1% de Tween); 2,0 µL de 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µL de 'bovine serum albumin' (BSA) em 0,4 µg/µL, 0,5 µL de 25 mM de dNTP (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos), 0,2 µL de 5 U µL<sup>-1</sup> de Taq DNA Polimerase recombinante (Bioline Life Sciences), 1 µL de cada iniciador (10 pmoles µL<sup>-1</sup>) e 10 ng de DNA . O restante do volume foi completado com água ultra pura autoclavada. As condições de amplificação foram: 5 min a 95 °C; 10 ciclos de 30 s a 94 °C; 30 s a 55 °C; 1 min a 72 °C; 25 ciclos de 30 s a 92 °C; 30 s a 55 °C; 1 min a 72 °C; e 10 min de 72 °C.

Para a análise de PCR-DGGE de bactérias amônio oxidantes (AOB), foi utilizado uma região especifica do gene 16S DNAr, exclusiva para os AOB pertencentes a subdivisão ß proteobacterias de bactérias. Foi utilizado os 'primers' CTO189fA/CTO189fB, CTO189fC e CTO654r (Tabela 2), com fragmento de 450 pares de bases. A amplificação ocorreu em 25 µL de solução contendo: 2,5 µL de 10x tampão Tag (750 mM Tris-HCL pH 8,8, 200 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,1% de Tween), 1  $\mu$ L de 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5  $\mu$ L de BSA de 0,4  $\mu$ g/ $\mu$ L, 0,25  $\mu$ L de 25 mM de dNTP (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos), 0,2  $\mu$ L de 5 U  $\mu$ L<sup>-1</sup> de Tag DNA Polimerase recombinante (Bioline Life Sciences), 0,50 µL de primers CTO189fA/CTO189fB, 0,25 µL de CTO189fC e 0,75 µL de CTO654r (10 pmoles µL<sup>-</sup> <sup>1</sup>) e 10 ng de DNA metagenômico, sendo o restante do volume completado com água ultra pura autoclavada. As condições de amplificação foram: 1 min a 93 °C; 35 ciclos de 30 s a 92 °C; 1 min a 57 °C; 45 s a 68 °C; e 5 min a 68 °C. O produto amplificado foi utilizado para a segunda reação com os primers 341f-GC e 518r (Tabela 2). A segunda reação ocorreu em 25 µL de solução contendo: 2,5 µL de 10x Tampão Taq (750 mM Tris-HCL pH 8,8, 200 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,1% de Tween), 1,75 µL de 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µL de formamida, 0,2 µL de 25 mM de dNTP (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos), 0,1 µL de 5 U µL<sup>-1</sup> de Tag DNA Polimerase recombinante (Bioline Life Sciences), 1 µL de cada iniciador (10 pmoles  $\mu L^{-1}$ ) e 10 ng de DNA do solo, sendo o restante do volume completado com água ultra pura autoclavada. As condições de amplificação foram: 10 min a 95 °C; 30 ciclos de 1 min a 95 °C; 1 min a 57 °C; 3 min a 72 °C; e 30 min a 72 °C.

Para a amplificação do gene *nif*H foram utilizados os 'primers' FGPH19 e PolR (Tabela 2). A amplificação ocorreu em 25 µL de solução contendo: 2,5 µL de 10x tampão Tag (20 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,4), 200 mM de KCI, 1 mM de EDTA, 7 mM de mercaptoetanol, 10% glicerol, 0,2 mg/mL de BSA, Roche), 0,05 µL de BSA, 0,2 µL de 25 mM de dNTP (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos), 0,1  $\mu$ L de 5 U  $\mu$ L<sup>-1</sup> de Taq DNA Polimerase recombinante (100 mM de Tris-HCl, 15 mM de MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl, pH 8,3 (20°C), Roche), 1 µL de cada iniciador (10 pmoles µL<sup>-1</sup>) e 10 ng de DNA do solo, sendo o restante do volume completado com água ultra pura autoclavada. As condições da amplificação foram: 5 min a 94 °C; 30 ciclos de 1 min a 94 °C; 1 min a 56 °C; 2 min a 72 °C; 30 min a 72 °C. Os 'amplicons' foram utilizados na segunda reação de PCR com os 'primers' PoIF-GC e AQER (Tabela 2). A amplificação ocorreu em 50 µL de solução contendo: 5 µL de 10x tampão Taq (20 mM tampão fosfato de potássio (pH 7.4), 200 mM de KCI, 1 mM de EDTA, 7 mM de mercaptoetanol, 10% glicerol, 0,2 mg/mL de BSA, Roche), 0,4 µL de 25 mM de dNTP (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos), 0,16 µL de 5 U  $\mu$ L<sup>-1</sup> de Taq DNA polimerase recombinante (100 mM de Tris-HCl, 15 mM de MgCl<sub>2</sub>, 500 mM de KCl, pH 8,3 (20°C), Roche), 2,5  $\mu$ L de cada iniciador (10 pmoles  $\mu$ L<sup>-1</sup>) e 10 ng de DNA metagenômico, sendo o restante do volume completado com água ultra pura autoclavada. Os ciclos de amplificação foram 5 min a 94 °C; 30 ciclos de 1 min a 94 °C; 1 min a 48 °C; 2 min a 72 °C e 30 min a 72 °C.

Todos os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose 1%. As análises por DGGE foram realizadas no equipamento Ingeny PhorU System (Ingeny, Goes, The Netherlands). Para a análise, foram preparados géis de poliacrilamida 6% (w/v), com gradiente desnaturante de 15 a 55% para 16S DNAr (AOA), de 35 a 65% para 16S DNAr (AOB) e de 40 a 65% para *nif*H (onde 100% de desnaturação que consiste na concentração de 7 M de uréia e 40% de formamida). Os géis foram submetidos à eletroforese por 16 h a 100 Volts com temperatura de 60 °C. Após eletroforese, os géis foram corados com SYBR-gold (Invitrogen, Breda, The Netherlands) em TAE 0,5 x no escuro por 120 min e fotografados sob luz ultravioleta.

'Primers'	Sequências (5'- 3')	Alvo	Referência
CrenamoA23f	ATG GTC TGG CTW AGA CG	Gene 16S DNAr (AOA)	Tourna et al. (2008)
CrenamoA616r	GCC ATC CAT CTG TAT GTC CA	Gene 16S DNAr (AOA)	Tourna et al. (2008)
CTO189fA/CTO189fB	GGA GRA AAG CAG GGG ATC G	Gene 16S DNAr (AOB)	Kowalchuk et al. (1997)
CTO189fC	GGA GGA AAG TAG GGG ATC G	Gene 16S DNAr (AOB)	Kowalchuk et al. (1997)
CTO654r	CTA GCY TTG TAG TTT CAA AC	Gene 16S DNAr (AOB)	Kowalchuk et al. (1997)
341f-GC	CGC GGC GGG CGG GGC GGG GGC ACG GGG GGC CTA CGG GAG GCA GCA G	Gene 16S DNAr	Muyzer; Dewaal; Uitterlinden (1993)
518r	ATT ACC GCG GCT GCT GG	Gene 16S DNAr	Muyzer; Dewaal; Uitterlinden (1993)
FGPH19	TAC GGC AAR GGT GGN ATH	Gene <i>nif</i> H	Simonet et al. (1991)
PolR	ATS GCC ATC ATY TCR CCG	Gene <i>nif</i> H	Poly et al. (2001)
PolF-GC	CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCC CCG CCC CTG CGA YCC SAA RGC BGA CTC	Gene <i>nif</i> H	Poly et al. (2001)
AQER	ACG ATG TAG ATY TCC TG	Gene <i>nif</i> H	Poly et al. (2001)
amo196f	GGW GTK CCR GGR ACW GCM AC	Gene <i>amo</i> A	Treusch et al. (2005)
amo277r	CRA TGA AGT CRT AHG GRT ADC C	Gene amoA	Treusch et al. (2005)
R1	CGT CCT CTC AGA CCA RCT ACT G	Gene 16S DNAr (AOB)	Hermansson; Lindgren (2001)

Tabela 2 – 'Primers' utilizados para a amplificação de diferentes alvos a partir de DNA das amostras de solo coletadas em três áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo

#### 2.2.8 Análise estatística

Os perfis de 'amplicons' obtidos do PCR-DGGE foram analisados e comparados utilizando o programa 'Image Quant Software' (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA), visando gerar uma matriz de presença e ausência de bandas A partir das matrizes geradas foram realizadas análises de nMDS ('non-Metric Multidimensional Scaling') com o programa 'Primer 6' (Plymouth Marine, Primer, Reino Unido), sendo adotado como estimativa de similaridade o modelo 'Jaccard'. Com isso, foi obtida a distribuição espacial dos atributos físico-químicos, assim como os agrupamentos das amostras baseadas nos perfis dos genes *nif*H (BFNVL), 16S DNAr (AOA e AOB) das amostras de solo. A nMDS classifica a distância entre objetos e usa as classificações para mapear objetos não lineares sobre uma ordenação espacial simplificada e bidimensional para preservar as diferenças classificadas e não as distâncias originais (SHEPARD, 1966).

Adicionalmente, o índice de similaridade das comunidades de AOA, AOB e BFNVL presentes nas três áreas estudadas foi obtido pela análise de similaridade (ANOSIM). Esta análise teve como objetivos testar se há diferença significativa entre dois ou mais grupos baseado em alguma medida de distância (CLARKE, 1993). Ele compara as classificações das distâncias entre os grupos de amostras, como resultado um valor de R, que mede a separação dos grupos, sendo a separação consistente e clara (R = 1) ou inexistente (R = 0). Os valores de R > 0,75 são comumente interpretados como grupos 'bem separados', R > 0,5 como 'separados' mas com sobreposições, e R < 0,25 como grupos com separação inexistente (CLARKE; GORLEY, 2001).

Visando avaliar a relação da comunidade microbiana estudada com a cobertura vegetal, assim como com os atributos físico-químicos do solo, foi realizada a análise de redundância (RDA), utilizando o 'software' Canoco 4.5 (Biometris, Wageningen, Holanda). Esta análise utiliza uma ordenação linear para correlacionar a espécie com o ambiente por somas ponderadas das pontuações da espécie e do ambiente, sendo determinados quais fatores ambientais foram mais significativos para explicar a variação na composição da comunidade microbiana (RAMETTE, 2007).

Para correlacionar os perfis de comunidades microbianas do solo com os atributos físico-químicos, assim como com a cobertura vegetal das áreas foi utilizado o teste de Mantel. Este teste compara duas matrizes que foram calculadas para a
mesma área, porém utilizando dois conjuntos de dados independentes, gerando um valor de correlação entre as separações observadas, além de fornecer a significância desta correlação com base nas permutações dos objetos em uma das matrizes (MANTEL, 1967).

### 2.2.9 Sequenciamento parcial do gene 16S DNAr por pirosequenciamento

O DNA extraído das amostras foi amplificado com 'primers' franqueadores da região 'V4' do gene 16S ribossômico, utilizando os 'primers forward' 520F e 'primers' reverso 802R (Tabela 3). Com isso, os 'primers' adaptadores A e B, foram adicionados na reação, conforme o manual do fabricante do equipamento (Roche, EUA). Já o 'primer forward' utilizado para cada amostra recebeu um 'tag' de identificação, composto por 6 a 8 bases, utilizado como identificador da origem de cada uma das sequências obtidas. Para os grupos de arquéias, a região amplificada foi a região V3 do gene 16S ribossômico, utilizando o 'primer' reverso ArcR e o 'primer forward' foi o ArcF (Tabela 3). Cada amostra recebeu um 'tag' de identificação, como descrito em bactérias.

A amplificação do 16S rRNA de arquéia ocorreu em 50 µL de uma solução contendo: 5 µL de de 10x tampão Taq (750 mM Tris-HCl pH 8,8, 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,1% de Tween 20), 4 µL de 2,5 mM de dNTP (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos); 3  $\mu$ L de 25 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,5  $\mu$ L de 5 U  $\mu$ L<sup>-1</sup> de Taq Platinum DNA Polimerase recombinante (Invitrogen); 1  $\mu$ L de cada iniciador (10 pmoles  $\mu$ L<sup>-1</sup>), (Tabela 3); e 10 ng de DNA da amostra, sendo o restante do volume completado com água deionizada esterilizada. Os ciclos de amplificação foram de 5 min a 95 °C; 30 ciclos de 30 s a 95 °C; 30 s a 55,8 °C; 1 min a 72 °C; e 10 min a 72 °C. Para a amplificação do 16S DNAr de bactéria foram utilizados 50 µL de uma solução contendo: 5 µL de 10x tampão Taq (750 mM Tris-HCl; pH 8,8; 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; e 0,1% de Tween 20); 4 µL de 2,5 mM de dNTP (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos); 3,75  $\mu$ L de 25 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,6  $\mu$ L de 5 U  $\mu$ L<sup>-1</sup> de Taq Platinum DNA Polimerase recombinante (Invitrogen); 0,5 µL dos 'primers' reversos e 1 µL dos 'primers foward' (10 pmoles  $\mu L^{-1}$ ), (Tabela 3); e 10 ng de DNA extraídos das amostras, sendo o restante do volume completado com água deionizada esterilizada. Os ciclos de amplificação foram de 3 min a 95 °C; 30 ciclos de 45 s a 95 °C; 1 min e 45 s a 57 °C; 1 min a 72 °C e 4 min a 72 °C. Os produtos de PCR foram

verificados em gel de agarose 1%. Os produtos de PCR foram enviados a empresa Helixxa (Genomics Service Provider, Campinas, SP, Brasil) para a purificação e o sequenciamento das amostras.

Domínio	Amostra	'Primer Foward'	Sequências (5' – 3')
Bactéria	SV2	520FMID1	CGT ATC GCC TCC CTC GCG CCA TCA GAT GAG AGC AYT GGG YDT AAA GNG
	SV3	520FMID4	CGT ATC GCC TCC CTC GCG CCA TCA GAG CAT GAG AYT GGG YDT AAA GNG
	PC2	520FMID3	CGT ATC GCC TCC CTC GCG CCA TCA GCA TCT CTG AYT GGG YDT AAA GNG
	PC3	520FMID5	CGT ATC GCC TCC CTC GCG CCA TCA GCA GAG AGC AYT GGG YDT AAA GNG
	RE2	520FMID8	CGT ATC GCC TCC CTC GCG CCA TCA GAG ATC ATC AYT GGG YDT AAA GNG
	RE3	520FMID1	CGT ATC GCC TCC CTC GCG CCA TCA GCA TGC ATG AYT GGG YDT AAA GNG
Arquéia	SV2	ArcFMID4	CGT ATC GCC TCC CTC GCG CCA TCA GAG CAT GAG CCC TAC GGG GYG CAS CAG
	SV3	ArcFMID6	CGTA TCG CCT CCC TCG CGC ATC AGA TCA GAT CCC CTA CGG GGY GCA SCA G
	PC2	ArcFMID1	GTA TCG CCT CCC TCG CGC ATC AGA GAG AGA GCC CTA CGG GGY GCA SCA G
	PC3	ArcFMID8	CGT ATC GCC TCC CTC GCG CAT CAG AGA TCA TCC CCT ACG GGG YGC ASC AG
	RE2	ArcFMID12	GTA TCG CCT CCC TCG CGC ATC AGC TGA GCT GCC CTA CGG GGY GCA SCA G
	RE3	ArcFMID10	GTA TCG CCT CCC TCG CGC ATC AGA GCA GAG CCC CTA CGC CCY GCA SCA G
Domínio		'Primer' Reverso	Sequências (5' – 3')
Bactéria		820R-1	CTA TGC GCC TTG CCA GCC CGC TCA GTA CCR GGG THT CTA ATC C
		820R-2	CTA TGC GCC TTG CCA GCC CGC TCA GTA CCA GAG TAT CTA ATT C
		820R-3	CTA TGC GCC TTG CCA GCC CGC TCA GCT ACD SRG GTM TCT AAT C
		820R-4	CTA TGC GCC TTG CCA GCC CGC TCA GTA CNV GGG TAT CTA ATC C
Arquéia		ArcR	CTA TGC GCC TTG CCA GCC CGC TCA GTT ACC GCG GCK GCT G

Tabela 3 – 'Primers' utilizados nas amplificações a partir do 16S rRNA de arquéia e bactéria para o pirosequenciamento (JESUS et al., 2010)

### 2.2.10 Análise das sequências obtidas por pirosequenciamento

As sequências do gene 16S DNAr de arquéias e bactérias obtidas por pirosequenciamento foram processadas no Projeto Banco de Dados Ribossômico (RDP), no pipeline pirosequenciamento (RDP, 2011). As sequências obtidas de arquéias e bactérias foram submetidas ao algoritmo 'Classifier', no RDP (COLE et al., 2007) e estas por sua vez utilizadas para atribuições taxonômicas.

Para a análise com base em unidades taxonômicas operacionais (UTOs), inicialmente foi feito o alinhamento para cada amostra pelo software INFERNAL e com base nestes alinhamentos, usando o PHYLIP foi construída a matriz de distância. Estas etapas foram feitas usando as ferramentas dentro do RDP. Posteriormente, a matriz de distância foi usada como arquivo de entrada de dados para o programa MOTHUR que agrupou as sequências em UTOs com um 'cut-off' máximo de 0,10. Depois de se obter esses dados, foi feita a distribuição de frequência com o nível de 3% de similaridade, o qual foi utilizado para obter a riqueza de espécie (índice de Chao1), índices de diversidade (Shannom-Weaver) e construir as curvas de rarefação e o diagrama de Venn.

Para o agrupamento das sequências em unidades taxonômicas operacionais (UTOs) foi utilizado o programa MOTHUR v.1.7.2 (SCHLOSS et al., 2009), definida por um nível de distância de 3%.

Os números de UTOs e de sequências da cada UTO foram computados para o cálculo dos índices de diversidade de Shannon e para a estimativa de riqueza de espécies pelos métodos não-paramétricos Chao (CHAO; BUNG, 2002) foram realizados no programa MOTHUR, como também as análises de geração de diagrama de Venn.

### 2.3 Resultados e discussão

### 2.3.1 Análise física e química do solo

De acordo com as análises granulométricas, os solos de Santa Virgínia e Picinguaba são classificados como médio argilosos, enquanto que os da Restinga são classificados como arenosos (Tabela 4).

A análise de pH do solo das três áreas apresentaram valores muito similares, com uma variação entre 3,6 a 3,7 sendo, portanto, classificados como solos ácidos.

Da mesma forma, o teor de matéria orgânica foi similar entre as áreas. Por outro lado, Santa Virgínia e Picinguaba apresentaram os maiores valores de soma de bases (SB) e capacidade de troca catiônica (CTC) (Tabela 5), possivelmente devido aos seus maiores teores de argila em comparação com o solo da Restinga.

Tabela 4 – Resultado da análise granulométria do solo coletado em três áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo. Os teores (g/Kg) (média ± erro padrão) das frações areia, silte e argila foram obtidos de três amostras por área de coleta. Métodos utilizados: Bouyoucos (densímetro) S.S.S.A. Book Series: 5 Methods of Siol Analysis, Part4; Classe de diâmetro (mm) U.S.D.A									
Local	Areias	Silte	Argilas	Classe de textura					
Sta Virgínia	559,3 ± 16,0	123,3 ± 11,9	317,3 ± 16,3	Média argilosa					
Picinguaba	568,3 ± 11,9	113,7 ± 3,9	318,0 ± 8,0	Média argilosa					

46,7 ± 13,4

75,3 ± 14,7

Arenosa

Restinga

878,0 ± 8,4

	(eeundade	aa ananoo	quinned de						iod de Estade	46 646 1	Giano
Área pl		МО	(P	S)	(К	Са	Mg	Al	H+AI	SB	CTC)
	рн	g.dm <sup>-3</sup>	mg.	dm⁻³	mmolc.dm <sup>-3.</sup>						
Sta Virgínia	3,6±0,1	70,3±8,0	15,3±1,2	9,7±0,9	2,0±0,3	2,3±0,3	2,3±0,3	23,3±0,7	146,3±12,9	6,6±1,0	153,0±12,9
Picinguaba	3,6±0,1	63,7±3,9	13,0±2,5	13,0±0,6	1,7±0,2	2,3±0,3	2,0±0	20,4±0,6	139,3±3,2	6,0±3,5	145,4±2,7
Restinga	3,7±0,1	62,0±4,0	5,3±0,3	5,3±0,3	0,8±0,1	1,0±0	1,0±0	16,5±1,6	104,7±12,4	2,8±0,1	107,6±12,4

Tabela 5 – Resultado da análise química dos solos coletados em de três áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo

Em relação ao nitrogênio mineral do solo, foi observado que a concentração de nitrato foi significativamente maior em solos de Picinguaba e Santa Virgínia (P < 0,01), enquanto que a concentração de amônio não deferiu entre as áreas (P = 0,162) (Tabela 6). A baixa concentração de nitrato na Restinga pode ser resultado das condições de alagamento desta área, o que pode gerar uma grande abundância de sítios de anaerobiose em seu solo, inibindo o processo de oxidação NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e, consequentemente, a geração de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Em contraste, nas áreas de Santa Virgínia e Picinguaba ocorre um predomínio de condições aeróbias, o que disponibiliza o oxigênio para AOA e AOB, possibilitando a constante formação de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (ABELL et al., 2010). Outro fator que pode atuar de maneira determinante neste balanço é o consumo diferencial do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> gerado a partir da mineralização da matéria orgânica. Uma vez que este NO<sub>3</sub><sup>-</sup> é consumido pela desnitrificação em áreas sob anaerobiose (CANFIELD; GLAZER; FALKOWSKI, 2010), isto deve ocorrer preferencialmente na área de Restinga, o que também limita a detecção deste composto no solo.

Tabela 6 – Concentração (µg/g de solo) (média ± erro padrão) de amônio e nitrato em três áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo

Área	Amônio	Nitrato
Santa Virgínia	26,3 ± 4,2 a	116,6 ± 12,3 a
Picinguaba	53,7 ± 12,6 a	125,7 ± 16,4 a
Restinga	36,5 ± 9,7 a	25,4 ± 4,8 b

\* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $\alpha \le 0,05$ )

A análise paralela dos dados físicos e químicos do solo foram posteriormente usadas para auxiliar na interpretação dos resultados sobre abundância e padrão estrutural das comunidades de AOA, AOB e BFNVL.

### 2.3.2 Abundância de AOA, AOB e BFNVL

A abundância de AOA, AOB e BFNVL nos solos das três áreas de Mata Atlântica estudadas foi determinada qPCR dos genes *amo*A, 16S DNAr e *nif*H, respectivamente. A eficiência de amplificação dos genes foi de 1,02 (*amo*A), 1,08 (16S DNAr) e 0,99 (*nif*H). O valor de regressão logarítmica das curvas obtidas (R<sup>2</sup>) foi de 0,99 para todas as quantificações.

Os genes *amo*A de AOA e 16S DNAr de AOB foram mais abundantes nas amostras de solo de Santa Virgínia (valores em log de 4,36 e 4,50 cópias/g de solo,

respectivamente) e Picinguaba (valores em log de 4,79 e 4,48 cópias/g de solo, respectivamente) em relação a Restinga (valores em log de 3,06 e 2,70 cópias/g de solo, respectivamente) (Figura 3). Esta menor ocorrência de BFNVL na Restinga corrobora com a menor ocorrência de nitrificação nesta área, como o proposto com base nas quantificações de  $NO_3^-$  e  $NH_4^+$ , indicando que as condições físico-químicas são limitantes para a ocorrência deste processo. Estas inferências corroboram as observações de Szukics et al. (2011) que verificaram que a abundância de AOA foi significativamente reduzida quando o solo de floresta atingiu 70% de umidade.



Genes

Figura 3 – Logarítimo do número de cópias (média ± erro padrão) dos genes *amo*A de AOA e 16S DNAr de AOB encontrado por grama de solo de três áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo. Barras do histograma seguida de mesma letra dentro do mesmo gene não diferem estatisticamente entre si (Tukey,  $\alpha = 5\%$ )

Analisando a razão entre a quantidade de genes *amoA* de AOA e de genes 16S DNAr de AOB, na tentativa de estimar a razão AOA/AOB, foi verificado uma maior abundância de AOA em relação as AOB em todas as áreas analisadas (Figura 4). Uma explicação direta deste padrão pode ser atribuída ao pH dos solos estudados, com valores entre 3,7 e 3,8 (Tabela 2). De forma geral, os solos ácidos de florestas apresentam a abundância e a atividade de AOB muito reduzida (NUGROHO et al., 2007, STOPNIŠEK, et al., 2010). Em contraste, a comunidade de AOA é relatada como dominante nestas condições (BOMBERG; TIMONEN, 2007, KEMNITZ; KOLB; CONRAD, 2007, LEHTOVIRTA; PROSSER; NICOL, 2009). Assim, as comunidades de AOA demonstraram ser os organismos mais abundantes relacionados a oxidação do amônio nas áreas de Mata Atlântica avaliadas.



Figura 4 – Razão do número de cópias (média ± erro padrão) dos genes *amo*A de AOA por 16S DNAr de AOB encontrados por grama de solo de três áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo

Em relação ao gene *nif*H, as quantidades detectadas variaram entre valores de log por grama de solo de 6,4 e 5,17, sendo Picinguaba a que apresentou a menor abundância do gene (Figura 5). Essa menor abundância de *nif*H pode estar ocorrendo por algum efeito local, o qual não foi possível acessar. Neste contexto, estudos têm apontado que as frações de argila no solo são importantes para a abundância do gene *nif*H devido a formação de micro e macroagregados, estes por

sua vez proporcionam condições de microaerofilia ou anaerobiose, os quais são favoráveis a fixação de nitrogênio (GUPTA; ROPER, 2010, PEREIRA e SILVA et al., 2011). Vários estudos têm demonstrado que 70% de BFNVL estão localizadas na fração da argila (CHOTTE et al., 2002). Além disso, a disponibilidade de carbono é outro fator que pode afetar a abundância e o nível de fixação de nitrogênio no solo (PEREIRA e SILVA et al., 2011).



Figura 5 – Logarítimo do número de cópias (média ± erro padrão) do gene *nif*H de BFNVL encontrado por grama de solo de três áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo. Barras do histograma com a mesma letra não diferem estatisitcamente entre si (Tukey, α = 5%)

### 2.3.3 Estrutura das comunidades de AOA, AOB e BFNVL

A partir dos perfis de amplicons após o PCR-DGGE do gene 16S DNAr de AOA e AOB e do gene *nif*H de BFNVL foram observadas diferenças estruturais nas comunidades destes micro-organismos nos solos das três áreas estudadas (Figura 6). Dentre as três análises por DGGE a que mostrou perfis mais constantes entre as repetições de cada área foi AOA (Figura 6A), onde foi observado a ocorrência de padrões de bandas distintos para cada uma das áreas estudadas. Em contrapartida, nas análises de AOB (Figura 6B) e de BFNVL (Figura 6C) os perfis de bandas ocorreram de forma mais errática, dificultando a separação visual entre as áreas.

Para melhorar a resolução das separações das áreas analisadas, os géis foram convertidos em matrizes e submetidos à análise de NMDS (Figura 7). Nesta análise as separações foram mais claras, mostrando uma menor variação entre as repetições para a comunidade de AOA, e uma maior dispersão das repetições para as análises de AOB e BFNVL. No entanto, mesmo com esta dispersão, foram determinadas as separações entre as áreas amostradas, sugerindo que grupos distintos de bactérias amônio-oxidantes e bactérias fixadoras de nitrogênio ocorram em cada uma das áreas amostradas.

Adicionalmente, com o intuito de testar significativamente as separações observadas na NMDS, foi realizada a análise de ANOSIM. Nesta análise foi comprovado que as comunidades de AOA são estruturalmente diferentes entre as três áreas ( $R_{Morisita} = 1$ ;  $p \le 0,01$ ). Por outro lado, as comunidades de AOB e BFNVL de Santa Virgínia possuem algumas semelhanças estruturais com as de Picinguaba ( $R_{Morisita} = 0,65$ ;  $p \le 0,01$  e  $R_{morisita} = 0,53$ ;  $p \le 0,01$ , respectivamente), mas são distintas das encontradas na área de Restinga (Tabela 7).



Figura 6 – Perfis de DGGE do gene 16S DNAr de AOA (A) e AOB (B) e do gene *nif*H de BFNVL (C) obtidos de amostras de solo de Santa Virgínia (SV), Picinguaba (PC) e Restinga (RE)



SV-2

SV-3

SV-1



2D Stress: 0

PC-3

Área

Santa Virgínia 🔻 Picinguaba Restinga

Área



RE-2 RE-3

RE-4

(gene ////	., e de , le, l e , le B (ge		
Área	16S DNAr de AOA	16S DNAr de AOB*	<i>nif</i> H ∗
Santa Virgínia x Picinguaba Santa Virgínia	1	0,65	0,53
x Restinga Picinguaba x	1	0,76	0,85
Restinga	1	0,78	0,76

Tabela 7 – Índice de similaridade (ANOSIM) entre três áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo quanto à estrutura de comunidades de BFNVL (gene *nif*H) e de AOA e AOB (gene 16S DNAr) presentes no solo

\* Significativamente diferentes (> 0,75),  $p \le 0,05$ 

\*\*Significativamente diferentes, mas com algumas semelhanças (0,50 – 0,75),  $p \le 0,05$ 

Procurando relacionar à estrutura das comunidades microbianas com os fatores ambientais das áreas de Santa Virgínia, Picinguaba e Restinga, foi realizado o teste de Mantel. Foram relacionadas as separações observadas para as comunidades microbianas com aquelas observadas com base em características físicas e químicas do solo e da composição da vegetação nas áreas estudadas. Esse teste mostrou que a estruturação das comunidades microbianas analisadas está mais relacionada à estratificação da vegetação das áreas do que com as características físicas e químicas dos solos (Tabela 8). Com base nestes resultados, e considerando que os solos estudados apresentam baixa disponibilidade nutrientes, pH baixo, e alta quantidade de matéria orgânica, é sugerido que a composição deste ultimo constituinte seja fundamental na estruturação das comunidades microbianas das três áreas. Neste contexto, a vegetação local pode contribuir com a matéria orgânica a partir da liberação de nutrientes via decomposição de resíduos vegetais, e liberação de compostos específicos via exudados radiculares para a rizosfera Este complexo serve como fonte de energia para diversos micro-organismos do solo, dentre os quais os envolvidos na ciclagem do nitrogênio (YARWOOD; MYROLD; HÖGBERG, 2009).

Tabela 8 – Teste de Mantel da correlação entre as matrizes de dissimilaridade da estrutura de comunidades microbianas (AOA, AOB e BFNVL), famílias de espécies arbóreas e atributos do solo (físicos e químicos) de três áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo. As matrizes de dissimilaridade foram calculadas utilizando as distâncias de Bray-Curtis

	Família	Química do solo	Física do solo
AOA (16S DNAr)	0,97***	0,26*	0,45*
AOB (16S rDNA)	0,53***	0,23*	0,31*
BFNVL ( <i>nif</i> H)	0,66***	0,08 <sup>NS</sup>	0,38 <sup>NS</sup>
Família	-	0,38***	0,58*
	1		

Valores de  $r \ge 0,5$  indicam correlação \*\*\* P < 0,001\* P < 0,05NS: não significativo (P > 0,05)

# 2.3.4 Análise de redundância (RDA) da estrutura das comunidades de AOA, AOB e BFNVL

Visando detalhar os parâmetros que regem a composição das comunidades microbianas analisadas presentes nas três áreas de Mata Atlântica, foi realizada uma correlação entre estes fatores e os perfis de DGGE por meio da análise de redundância (RDA). Para tanto, os dados representados pelos perfis de DGGE foram convertidos em dados matriciais, objetivando correlacionar a ocorrência de espécies (representadas por bandas nesta análise) com os atributos químicos do solo (pH e teores de amônio, nitrato e matéria orgânica) e famílias de espécies arbóreas presentes em Santa Virgínia, Picinguaba e Restinga.

A análise de redundância, considerando os atributos químicos do solo, mostrou que as respostas de cada grupo microbiano foram distintas (Figura 8). Nas três análises foram observadas separações entre as amostras de cada área, porém a somatória das porcentagens da relação entre perfis de comunidades com os parâmetros avaliados foram distintas (85%, 35% e 37%, para AOA, AOB e BFNVL, respectivamente). Neste contexto, de acordo com o teste de Monte Carlo, foram encontradas significâncias na estruturação da comunidade de AOA para os valores de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (P < 0,01) (Figura 8A), e para os valores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> na composição da comunidade de AOB (P < 0,01) (Figura 8B). A análise baseada no perfil de BFNVL mostrou significância para NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (P < 0,01) (Figura 8C).



Figura 8 – Análise de redundância canônica (RDA) comparando os atributos químicos (pH, matéria orgânica, teores de amônio e nitrato) do solo que determinam a composição da comunidade de AOA, AOB e BFNVL em solos de três áreas de Mata Atlântica. Foi utilizado o teste de Monte Carlo (*p* < 0,05) para todas as variáveis ambientais utilizadas. Os valores nos eixos indicam a porcentagem da variância dos dados explicada pela distribuição das amostras nos respectivos eixos</p>

Numa análise similar, porém, considerando a distribuição de espécies vegetais que compõem a vegetação de cada área, foi possível identificar as famílias botânicas mais relacionadas com a estruturação das comunidades microbianas acessadas neste trabalho. Os valores da somatória das porcentagens da relação entre perfis de comunidades com os parâmetros avaliados tiveram a mesma tendência observada para a análise anterior, sendo encontradas porcentagens explicadas de 97%, 33% e 39%, para AOA, AOB e BFNVL, respectivamente (Figura 9).

Em relação aos valores de significância determinados pelo teste de Monte Carlo, a comunidades microbianas mostraram ser altamente influenciadas pela ocorrência de determinadas famílias de espécies arbóreas, sendo AOA para membros de Cecropiaceae ( $\lambda = 0,71$ , p = 0,002) (Figura 9A), AOB para membros de Anacardiaceae ( $\lambda = 0,20$ , p = 0,006) (Figura 9B) e BFNVL para membros de Clusiaceae ( $\lambda = 0,24$ , p = 0,002) (Figura 9C).

Em relação ao método empregado, outros trabalhos usam esta sistemática para inferir sobre importantes parâmetros da estruturação de comunidades microbianas. Salles et al. (2002) usou este método para inferir sobre os principais fatores que afetam a diversidade de *Burkholderia* spp. no solo e rizosfera. Similarmente, Andreote et al. (2009) determinou pelo método de análise multivariada o efeito da colonização de plantas por bactérias endofíticas. Dentro do contexto de entendimento da estruturação de comunidades microbianas em ambientes naturais, os fatores que interferem na composição da comunidade de bactérias (DIAS et al., 2010) e arquéias (DIAS et al., 2011) de manguezais foram estudados por métodos similares.

Por outro lado, a altitude é relevante para as variáveis que afetam o ecossistema, como a temperatura e disponibilidade de oxigênio. O efeito da altitude pode estar relacionado a uma mudança de vegetação e este fator pode resultar em alterações complexas das propriedades físico-químicas do solo е consequentemente, da diversidade microbiana (FAORO et al., 2010). Para avaliar corretamente um ecossistema microbiano é necessário integrar as influências de fatores bióticos e abióticos na estrutura da comunidade e biodiversidade. A diversidade microbiana presente no solo ácido da Mata Atlântica brasileira é influenciada por fatores adicionais, tais como cobertura vegetal, relação micro e macro nutriente, gradiente de altitude e teor de oxigênio. A importância da

caracterização das propriedades abióticas e bióticas do ambiente é para entender quais fatores afetam a diversidade microbiana no solo e, consequentemente, ter uma visão mais clara de como ocorrem às mudanças na comunidade microbiana.



Figura 9 – Análise de redundância canônica (RDA) comparando as Famílias de espécies arbóreas que determinam a composição da comunidade de AOA, AOB e BFNVL em solos de três áreas de Mata Atlântica. Foi utilizado teste de Monte Carlo (*p* < 0,05) para todas as variáveis ambientais utilizadas. Os valores nos eixos indicam a porcentagem da variância dos dados explicada pela distribuição das amostras nos respectivos eixos

## 2.3.5 Análise taxonômica das comunidades microbianas por meio de pirosequenciamento

Com o objetivo de confirmar a diferenciação entre as comunidades microbianas entre as áreas estudadas, foi realizado o pirosequenciamento da região V3 do gene 16S DNAr para arquéias e da região V4 do gene 16S DNAr para bactéria de duas amostras de cada uma das três áreas. Cerca de 32.221 sequências foram classificadas usando o 'RDP Classifier', dos quais 25.610 sequências foram atribuídas a bactérias e 6.611 sequências a arquéias.

Em relação ao Domínio Archaea os resultados mostraram a presença de dois filos, Crenarchaeota e Euryarchaeota. Além disso, a maioria das sequências encontradas pertence ao Filo Crenarchaeota (79,3%) (Figura 10A), com valores similares de frequência nas três áreas estudadas. A Classe Thermoprotei foi à única classe encontrada dentre as sequências do Filo Crenarchaoeta, sendo dentro dela os grupos distribuídos ao nível de Ordem classificados como Thermoproteales, Desulfurococcales, Acidilobales e Sulfolobales, sendo Thermoproteales os mais abundantes (Figura 10B). Em nível de Família, as sequências representam sete grupos: Acidilobaceae, Caldispphaeraceae, Desulfurococcaceae, Pyrodictiaceae, Sulfolobaceae, Thermofilaceae e os Thermoproteaceae, sendo esta última família a mais abundante (Figura 10C). A princípio, a ocorrência e maior atividade de representantes desta família tem sido relatados em ambientes com altas temperaturas (TAMAMES et al., 2010), condições estas muito diferentes das encontradas em áreas de Mata Atlântica. Para a distribuição ao nível de gênero foram encontrados 19 grupos afiliados (Figura 10D).





### 2.3.6 Análise das comunidades microbianas do solo baseada em UTOs

Para as demais análises foram selecionadas as sequências do Filo Crenarchaeota pelo RDP ('Ribosomal Data Project') através do 'RDP Fasta Sequence Selection' (http://pyro.cme.msu.edu/). Foram construídos três 'datasets', sendo cada um deles correspondente a uma área de coleta (Santa Virgínia, Picinguaba e Restinga). Portanto, para as análises baseadas em UTOs foram obtidas três matrizes de distância com os dados unificados das duas repetições de cada área. A complexidade taxonômica de Crenarchaeota foi calculada pelos índices de Chao1 e Shannon (Tabela 9) e pelas curvas de rarefação, sendo as unidades taxonômicas operacionais (UTOs) detectadas com base numa distância máxima de agrupamento de 3%.

A partir da análise das curvas de rarefação geradas, foi observado que a diversidade das comunidades de Crenarchaeota foi similar entre as áreas estudadas (Figura 11). Além disso, todas as curvas foram assintóticas, indicando que o número de sequências de 16S DNAr amostrou completamente a riqueza de filotipos destas comunidades ao nível de 3% de dissimilaridade.

Neste mesmo nível de dissimilaridade, o número de UTOs detectado nas comunidades das três áreas foi próximo do número de UTOs estimado pelo índice de riqueza de Chao1 e ACE, apresentando evidências adicionais de que as comunidades naturais foram bem cobertas durante o sequenciamento (Tabela 9). Além disso, os valores obtidos com o índice de diversidade de Simpson revelaram maior diversidade de UTOs em Picinguaba, comparado com os valores obtidos para as demais áreas. A mesma relação de diversidade de UTOs foi estabelecida entre as áreas com os valores obtidos pelo índice de diversidade de Shannon. No entanto, Santa Virgínia apresentou maior índice de riqueza em relação às demais áreas (Tabela 9).

Além destes valores de riqueza e diversidade, foram também determinados os valores de cobertura (ICE), o que revelou a ótima representatividade dos 'datasets' analisados, que cobriram valores próximos a 88% da diversidade de Crenarchaeota em Santa Virgínia e Picinguaba, e 87% na Restinga. Estes valores conferem grande robustez aos dados gerados e analisados, permitindo as inferências sobre alterações na composição de tais comunidades microbianas. Esta alta cobertura é comumente encontrada em estudos que utilizam o pirosequenciamento como ferramenta de análise da comunidade microbiana (LAUBER et al., 2009), enquanto que estudos que usam o método tradicional de clonagem e sequenciamento de genes de interesse dificilmente atingem valores altos de cobertura (ANDREOTE et al., 2009).



Figura 11 – Curva de rarefação geradas do gene 16S DNAr de Crenarchaeota de solos de três áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo. As unidades taxonômicas operacionais (UTOs) foram detectadas ao nível de 3% de dissimilaridade

Tabela 9 -	Estim	ativa	de rie	queza	de	UTOs	e ír	ndices	de	diversidade	e calculad	los a
	partir	da a	nálise	das	seq	uência	s do	Filo	Cre	narchaeota	geradas	pela
	técnic	a de	pirose	quen	ciam	ento n	o 'so	ftware	e' M	OTHUR 1.8	.1	

		Estimativa d	Estimativa de			
		riqueza		diversidade		
NS	NU	ACE	Chao1	Simpson	Shannon	ICE
				•		(%)
1912	354	1113	810	0,008	5,29	88
1903	388	1088	794	0,007	5,35	88
1419	337	908	642	0,012	5,02	87
	NS 1912 1903 1419	NS NU 1912 354 1903 388 1419 337	Estimativa de riqueza   NS NU ACE   1912 354 1113   1903 388 1088   1419 337 908	Estimativa de riqueza   NS NU ACE Chao1   1912 354 1113 810   1903 388 1088 794   1419 337 908 642	Estimativa de riqueza Índice de diversidade   NS NU ACE Chao1 Simpson   1912 354 1113 810 0,008   1903 388 1088 794 0,007   1419 337 908 642 0,012	Estimativa de riqueza Índice de diversidade   NS NU ACE Chao1 Simpson Shannon   1912 354 1113 810 0,008 5,29   1903 388 1088 794 0,007 5,35   1419 337 908 642 0,012 5,02

UTOs foram detectadas ao nível de 3% de dissimilaridade

NS: Número de sequências

NU: Número de UTOs determinado pelo MOTHUR 1.8.1;

ICE: Índice de cobertura estimada

Para verificar a ocorrência diferencial de sequências do Filo Crenarchaeota dentro de cada área de Mata Atlântica amostrada, foi utilizado o diagrama de Venn (FAUTH et al., 1996). Esta análise mostrou que a grande maioria das UTOs geradas são exclusivas de uma das áreas estudadas. O número de UTOS em Santa Virgínia foi 354, em Picinguaba foi 388 e na Restinga foi 337. O número de UTOs compartilhados entre Picinguaba e Restinga foi 87 (7,5%) (Figura 12).



Figura 12 – Diagrama de Venn representando o número de UTOs compartilhadas entre as amostras de solo de três áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo. Santa Virgínia (SV), Picinguaba (PC) e Restinga (RE)

O Filo Crenarchaeota é amplamente distribuído em ambientes marinhos e terrestres (HERSHBERGER et al., 1996), sendo considerado filogeneticamente diverso e abrangendo os micro-organismos halofílicos e termofílicos (PESADRO; WIDMER, 2002). Estes micro-organismos são os mais abundantes em ecossistemas terrestres (DeLONG, 1998), especialmente no sistema solo (AUGUET et al., 2009), onde exercem um papel preponderante no processo de nitrificação (LEININGER et al.. 2006: NICOL; SCHLEPER, 2006). Recentemente, foi proposto um desmembramento deste grupo, dando origem ao filo chamado Thaumarchaeota, englobando as AOA (BROCHIER-ARMANET, 2008). No entanto, o presente trabalho não utilizou a classificação que incluiu a separação destes filos, o que limitou algumas inferências sobre a ocorrência de tais grupos nos solos estudados.

Todas as sequências classificadas como Crenarchaeota no presente estudo foram filiadas à classe Thermoprotei. Apesar de muitos microrganismos desta classe serem encontrados em ambientes extremos (SILVA et al., 2011), estudos apontam a presença destes organismos em água doce e em sedimentos de lagos (SCHLEPER; HOLBEN; KLENK, 1997; SCHELEPER; JURGENS; JONUSCHEIT, 2005). O metabolismo de tais organismos e suas possíveis funções no solo ainda não foram descritas (SCHELEPER; JURGENS; JONUSCHEIT, 2005).

## 2.3.7 Grupos de Bactéria que ocorrem nos solos de Mata Atlântica do Estado de São Paulo

A composição das comunidades bacterianas encontradas nos solos das áreas de Mata Atlântica estudadas foi caracterizada pela classificação taxonômica das sequências, sendo encontrados 'reads' afiliados a 29 filos bacterianos. O Filo Acidobacteria mostrou ser o mais abundante dentre os filos analisados. Sua frequência e dominância nos solos estudados corroboram com a literatura, mostrando que ambientes como a floresta primária, pastagem e solos agrícolas possuem grande abundância de bactérias pertencentes a este grupo (JANSSEN, 2006; GRIFFITHS et al., 2006; NACKE et al., 2011).

O objetivo desta análise foi buscar grupos bacterianos responsáveis pela oxidação do amônio no solo. Porém foram encontradas poucas sequências destes grupos (Tabela 10).

A taxonomia de AOB se divide em dois grupos monofileticos: os beta e gamaproteobactérias. Os Beta-AOB consistem principalmente de dois gêneros, as *Nitrosomonas* e as *Nitrosospira* (PURKHOLD et al.; 2003). Os Gamma-AOB, como *Nitrosococcus oceani*, são os menores membros de comunidades amônio oxidantes (NOLD et al., 2000), com menor diversidade e encontrados na maioria das vezes em ambientes marinhos (O'Mullan; Ward, 2005). No entanto, neste trabalho as sequências pertencentes a este grupo foram maiores em relação aos Beta-AOB (Tabela 10).

Este resultados corroboram com os obtidos da análise de qPCR mostrados anteriormente. As comunidades de AOA são dominantes no processo de nitrificação aeróbica em solos de Mata Atlântica do Estado de São Paulo em relação as comunidades de AOB. Esta maior abundância de comunidades de AOA pode estar relacionada as condições ambientais de cada área.

Cânoro			Parc	celas		
Genero	SV2	SV3	PC2	PC3	RE2	RE3
Nitrosococcus	24	12	5	9	7	11
Nitrosospira	3	8	0	6	1	9
SV: Santa Virgínia						

Tabela 10 – Número de sequências em nível de gênero pertencentes AOB e BFNVL encontradas em sequências geradas por pirosequenciamento

PC: Picinguaba RE: Restinga

### 3 CONCLUSÕES

- As comunidades de AOA são mais abundantes do que as de AOB nas três áreas de Mata Atlântica estudadas;
- As comunidades de BFNVL foram menos abundantes no solo de Picinguaba;
- Os fatores físicos e químicos do solo modulam a atividade dos genes amoA de AOA, 16S DNAr de AOB e nifH de BFNVL nas três áreas;
- A cobertura vegetal influencia diretamente a estrutura das comunidades de AOA, AOB e BFNVL presentes nos solos de Mata Atlântica do Estado de São Paulo;
- As comunidades de AOA, AOB e BFNVL são estrturalmente diferentes entre os solos das três áreas estudadas, embora as comunidades de Santa Virgínia e Picinguaba possuam algumas semelhanças;
- A diversidade das comunidades de Crenarchaeota foi similar entre as áreas, porém, as sequências do gene 16S DNAr obtidas de Picinguaba apresentam maior diversidade de unidades taxonômicas operacionais (UTOs);
- As comunidades de AOA são dominantes no processo de nitrificação aeróbica em solos de Mata Atlântica do Estado de São Paulo em relação as comunidades de AOB.

### REFERÊNCIAS

ABELL, G.C.J.; REVILL, A.T.; SMITH, C.; BISSETT, A.P.; VOLKMAN, J.K.; ROBERT, S.S. Archaeal ammonia oxidizers and nirS-type denitrifiers dominate sediment nitrifying and denitrifying populations in a subtropical macrotidal estuary. **ISME Journal**, New York, v. 4, n. 2, p. 286–300, 2010.

ALLERS, T.; MEVARECH, M. Archaeal genetics-the third way. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 6, n. 1, p. 58–73, 2005.

ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n.3, p. 417–432, 2009.

AUGUET, J.C.; BARBERAN, A.; CASAMAYOR, E.O. Global ecological patterns in uncultured Archaea. **ISME Journal**, New York, v. 4, n. 2, p. 182–190, 2010.

BARRON, A.R.; WURZBURGER, N.; BELLENGER, J.P.; WRIGHT, S.J.; KRAEPIEL, A.M.L.; HEDIN, L.O. Molybdenum limitation of asymbiotic nitrogen fixation in tropical forest soils. **Nature Geoscience**, London, v. 2, p. 42–45, 2008.

BEMAN, J.M.; POPP, N.P.; FRANCIS, C.A. Molecular and biogeochemical evidence for ammonia oxidation by marine Crenarchaeota in the Gulf of California. **ISME Journal**, New York, v. 2, p. 429–441, 2008.

BOMBERG, M.; TIMONEN, S. Distribution of cren- and euryarchaeota in Scots pine mycorrhizospheres and boreal forest humus. **Microbial Ecology**, New York, v. 54, n.3, p. 406-416, 2007.

BROCHIER-ARMANET, C.; BOUSSAU, B.; GRIBALDO, S.; FORTERRE, P. Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 6, n.3, p. 245–252, 2008.

BÜRGMANN, H.; WIDMER, F.; VON SIGLER, W.; ZEYER, J. New molecular screening tools for analysis of free-living diazotrophs in soil. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 1, p. 240–247, 2004.

CAFFREY, J.M.; BANO, N.; KALANETRA, K.; HOLLIBAUGH, J.T. Ammonia oxidation and ammonia-oxidizing bacteria and archaea from estuaries with differing histories of hypoxia. **ISME Journal**, New York, v. 1, n. 7, p. 660–662, 2007.

CÂMARA, I.G. Breve história da conservação da Mata Atlântica. In: GALINDO LEAL, C.; CÂMARA,I.G. (Org.). Mata Atlântica biodiversidade, ameaças e perspectivas, State of the Hotspots. Belo Horizonte: Fundação SOS Mata Atlântica e Conservação Internacional, 2005. p. 31–42.

CANFIELD, D.; GLAZER, A.N.; FALKOWSKI, P.D.The evolution and future of earth's nitrogen cycle. **Science,** Washington, v. 330, n. 6001, p. 192-196, 2010.

CAVICCHIOLI, R. Archaea — timeline of the third domain. **Nature**, London, v. 9, n. 1, p. 51–61, 2011.

CHAER, G.; FRNANDES, M.; MYROLD, D.; BOTTOMLEY, P. Comparative resistance and resilience of soil microbial communities and enzyme activities in adjacent native forest and agricultural soils. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, n. 2, p. 414–424, 2009.

CHAO, A.; BUNGE, J. Estimating the number of species in a stochastic abundance model. **Biometrics**, Malden, v. 58, n. 3, p. 531–539, 2002.

CHOTTE, J.L.; SCHWARTZMANN, A.; BALLY, R.; MONROZIER, L.J. Changes in bacterial communities and *Azospirillum* diversity in soil fractions of a tropical soil under 3 or 19 years of natural fallow. **Soil Biology & Biochemistry**, England, v. 34, n.8, p. 1083–1092, 2002.

CLARKE, K.R. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. **Austral Ecology**, Malden, v. 18, n. 1, p. 117–143, 1993.

CLARKE, K.R.; GORLEY, R.N. PRIMER v5: User Manual/ Tutorial. PRIMER-E: Plymouth, 2001. p. 91.

CLEVELAND, C.C.; TOWNSEND, A.R.; SCHIMEL, D.S.; FISHER, H.; HOWARTH, R.W. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N2) fixation in natural ecosystems. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, v. 13, n. 2, p. 623–645, 1999.

CODISPOTI, L.A. Interesting times for marine N<sub>2</sub>O. **Science**, Washington, v. 327, n. 5971, p. 1339-1340, 2010.

COLE, J.R.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; MCGARRELL, D.M.; BANDELA, A.M.; CARDENAS, E.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The ribosomal database project (RDP-II): introducing my RDP space and quality controlled public data. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 35, p. 169–172, 2007.

CUSACK, D.F.; WHENDEE, S.; McDOWELL. Biological nitrogen fixation in two tropical forests: ecosystem-level patterns and effects of nitrogen fertilization. **Ecosystems**, New York, v. 12, n. 8, p. 1299-1315, 2009.

DALSGAARD, T.; CANFIELD, D.E.; PETERSEN, J.; THAMDRUP, B.; ACUNA-GONZALEZ, J. N<sub>2</sub> production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. **Nature**, London, v. 422, n. 6932, p. 606–608, 2003.

DANIEL, R. The metagenomics of soil. Nature, London, v. 3, n. 6, p. 470-480, 2005.

DELONG, E. Archaea in coastal marine environments. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, n. 12, p. 5685–5689, 1992.

DELONG, E.F. Everything in moderation: Archaea as "non-extremophiles." **Current Opinion in Genetics & Development**, London, v. 8, n. 6, p. 649–654, 1998.

DELONG, E.F. Archaeal mysteries of the deep revealed. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 17, n. 17, p. 6417-6418, 2006. DI, H.J.; CAMERON, K.C.; SHEN, J.P.; WINEFIELD, C.S.; O'CALLAGHAN, M.; BOWATTE, S.; HE, J.Z. Ammonia-oxidizing bacteria and archaea grow under contrasting soil nitrogen conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, New York, v. 72, n. 3, p. 386–394, 2010.

DIAS, A.C.F.; ANDREOTE, F.D.; RIGONATO, J.; FIORE, M.F.; MELO, I.S.; ARAÚJO. W.L. The bacterial diversity in a Brazilian non-disturbed mangrove sediment. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, Dordrecht, v. 98, n. 4, p. 541–551, 2010.

DIAS, A.C.F.; DINI-ANDREOTE, F.; TAKETANI, R.G.; TSAI, S.M.; AZEVEDO, J.L.; MELO, I.S. ANDREOTE, F.D. Archaeal communities in three contrasting mangrove sediments. **Journal of Soils and Sediments**, Heidelberg, v. 11, p. 1466–1476, 2011.

DUBOIS, J. Classificação e breve caracterização de safras e práticas agroflorestais. In: MAY, H.; TROVATTO, C.M.M. (Ed.). **Manual Agroflorestal para a Mata Atlântica.** Brasília, 2008. p. 17-62.

ERGUDER, T.H.; BOON, N.; WITTEBOLLE, L.; MARZORATI, M.; VERSTRAETE, W. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. **FEMS Microbiology Reviews**, Malden, v. 33, n. 5, p. 855–869, 2009.

FALKOWSKI, P.G.; FENCHEL, T.; DELONG, E.F. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. **Science**, Washington, v. 320, n. 5879, p. 1034–1038, 2008.

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 and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 14, p. 4744–4749, 2010.

FEENEY, D.S.; CRAWFORD, J.W.; DANIELL, T.; HALLETT, P.D.; NUNAN, N.; RITZ, K.; RIVERS, M.; YOUNG, I.M. Three dimensional microorganization of the soil root microbe system. **Microbial Ecology**, New York, v. 52, n. 1, p. 151–158, 2006.

FRANCIS, C.A.; BEMAN, J.M.; KUYPERS, M.M.M. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. **ISME Journal**, New York, v. 1, n.1, p. 19–27, 2007.

FRANCIS, C.A.; ROBERTS, K.J.; BEMAN, J.M.; SANTORO, A.E.; OAKLEY, B.B. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 41, p. 14683–14688, 2005.

GAMA-RODRIGUES, A.C.; GAMA-RODRIGUES, E.; BARROS, N.F. Balanço de carbono e nutrientes em plantio puro e misto de espécies florestais nativas no Sudeste da Bahia. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 1165–1179, 2008.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 42–243, 2004.

GRIFFITHS, R.; WHITELEY, A.; O'DONNELL, A.G.; BAILEY, M.J. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition.

Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 66, n. 12, p. 5488–5491, 2000.

GRIFFITHS, B.S.; CAUL, S.; THOMPSON, J.; BIRCH, A.N.E.; SCRIMGEOUR, C.; CORTET, J.; FOGGO, A.; HACKETT, C.A. Soil microbial and faunal community responses to Bt maize and insecticide in two soils. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 35, n. 3, p. 734–741, 2006.

GUPTA, V.V.S.R.; ROPER, M.M. Protection of free-living nitrogen-fixing bacteria within the soil matrix. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 109, n. 1, p. 50–54, 2010.

HARRIS, J. Soil Microbial Communities and Restoration Ecology: Facilitators or Followers? **Science**, Washington, v. 325, n. 5940, p. 573-574, 2009.

HATZENPICHLER, R.; LEBEDEVA, E.V.; SPIECK, E.; STOECKER, K.; RICHTER, A.; DAIMS, H.; WAGNER, M. A. moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring.

**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington v. 105, n. 6, p. 2134–2139, 2008.

HUMBERT, S.; TARNAWSKI, S.; FROMIN, N.; MALLET, M.P.; ARAGNO, M.; ZOPFI, J. Molecular detection of anammox bacteria in terrestrial ecosystems: distribution and diversity. **ISME Journal**, New York, v. 4, p. 450–454, 2010.

HARRIS, J. Soil Microbial Communities and Restoration Ecology: Facilitators or Followers? **Science**, Washington, v. 325, p. 573-574, 2011.

HAYDEN, H.L.; DRAKE, J.; IMHOF, M.; OXLEY, A.P.A.; NORNG, S.; MELE, P.M. The abundance of nitrogen cycle genes *amo*A and *nif*H depends on land-uses and soil types in South-Eastern Australia. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, n. 10, p. 1774–1783, 2010.

HERMANSSON, A.; LINDGREN, P.E. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 2, p. 972-976, 2001.

HERSHBERGER, K.L.; BARNS, S.M.; REYSENBACH, A.L.; DAWSON, S.C.; PACE, N.R. Wide diversity of Crenarchaeota. **Nature**, London, v. 384, n. 6608, p. 420–420, 1996.

HICKS, W.T.; HARMON, M.E.; GRIFFITHS, R.P. Abiotic controls on nitrogen fixation and respiration in selected woody debris from the Pacific Northwest, U.S.A. **Ecoscience**, Quebec, v. 10, n. 1, p. 66–73, 2003.

HIETANEN, S.; KUPARINEN, J. Seasonal and short-term variation in denitrificationand anammox at a coastal station on the Gulf of Finland, Baltic Sea. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 596, n. 1, p. 67–77, 2008.

JANSSEN, P.H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 3, p. 1719–1728, 2006.

JESUS, E.C.; SUSILAWATI, E.; SMITH, S. L.; WANG, Q.; CHAI, B.; FARRIS, R.; RODRIGUES, J.L.M.; THELEN, K.D.; TIEDJE, J.M. Bacterial communities in the rhizosphere of biofuel crops grown on marginal lands as evaluated by 16s rRNA gene pyrosequences. **Bioenergy Research**, New York, v. 3, p. 20–27, 2010.

JIA, Z.J.; CONRAD, R. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 11, n.7, p. 1658–1671, 2009.

JIN, T.; ZHANG, T.; YE, L.; LEE, O.O.; WONG, Y.H.; QIAN, P.Y. Diversity and quantity of ammonia-oxidizing Archaea and Bacteria in sediment of the Pearl River Estuary, China. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 90, n. 3, p. 1137–1145, 2011.

JOLY, C.A.; MARTINELLI, L.A. **Composição florística, estrutura e funcionamento da floresta ombrófila densa dos núcleos Picinguaba e Santa Virgínia do Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo, Brasil.** 2º Relatório do Projeto Temático Biota Gradiente Funcional, 2007. p. 99–402.

KEENEY, D.R.; NELSON, D.W. Nitrogen inorganic forms. In: PAGE, L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Pt 2: Chemical and Microbiological Properties American Society of Agronomy. Madison :Soil Science of America, 1982., p. 643–698.

KEMNITZ, D.; KOLB, S.; CONRAD, R. High abundance of Crenarchaeota in a temperate acidic forest soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 60, n. 3, p. 442–448, 2007.

KEOUGH, B.P.; SCHMIDT, T.M.; HICKS, R.E. Archaeal nucleic acids in picoplankton from great lakes on three continents. **Microbial Ecology**, New YorK, v. 46, n. 2, p. 238–248, 2003.

KLOTZ, M.G.; STEIN, L.Y. Nitrifier genomics and evolution of the nitrogen cycle. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 278, n. 2, p.146–156, 2008.

KONNEKE, M.; BERNHARD, A.E.; DE LA TORRE, J.R.; WALKER, C.B.; WATERBURY, J.B.; STAHL, D.A. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. **Nature**, London, v. 437, n. 7058, p. 543–546, 2005.

KOWALCHUK, G.A.; STEPHEN, J.R.; DE BOER, W.; PROSSER, J.I.; EMBLEY, T.M.; WOLDENDORP, J.W. Analysis of  $\beta$ -proteobacteria ammonia-oxidizing bacteria in coastal sand dunes using denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR amplified 16S rDNA fragments.

Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 63, n. 4, p. 1489-1497, 1997.

KRUPOVIC, M.; SPANG, A.; GRIBALDO, S.; FORTERRE, F.; SCHLEPER, C. A thaumarchaeal provirus testifies for an ancient association of tailed viruses with archaea. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 39, n. 1, p. 82–88, 2011.KUENEN, J.G. Anammox bacteria: from discovery to application. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 6, n. 4, p. 320–326, 2008.

KUYPERS, M.M.; SLIEKERS, A.O.; LAVIK, G.; SCHMID, M.; JØRGENSEN, B.B.; KUENEN, J.G.; SINNINGHE DAMSTÉ, J.S.; STROUS, M.; JETTEN, M.S. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. **Nature**, London, v. 422, n. 6932, p. 608–611, 2003.

LACERDA, M.S. **Composição florística e estrutura da comunidade arbórea num gradiente altitudinal da Mata Atlântica**. 2001. 123p. Tese de (Doutorado na área Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas., 2001.

LAM, P.; KUYPERS, M.M. Microbial nitrogen cycling processes in oxygen minimum zones. **Annual Review of Marine Science**, Palo Alto, v. 3, p. 317–345, 2010.

LAUBER, C.L.; HAMADY, M.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 15, p. 5111–5120, 2009.

LEHTOVIRTA, L.E.; PROSSER, J.I.; NICOL. G.W. Soil pH regulates the abundance and diversity of group 1.1c Crenarchaeota. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 70, n. 3, p. 367–376, 2009.

LEININGER, S.; URICH, T.; SCHLOTER, M.; SCHWARK, L.; QI, J.; NICOL, G.W.; PROSSER, J.I.; SCHUSTER, S.C.; SCHLEPER, C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. **Nature**, London, v. 442, n. 7104, p. 806-809, 2006.

LI, C.H.; ZHOU, H.W.; WONG, Y.S.; TAM, N.F. Vertical distribution and anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments in Hong Kong, South China. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 21, n. 407, p. 5772–5779, 2009.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 27, n. 2, p. 209–220, 1967.

MENDES, R.; KRUIJT, M.; BRUIJN, I.; DEKKERS, E.; VAN DER VOORT, M.; SCHNEIDER, J.H.M.; PICENO, I.M.; DESANTIS, T.Z.; ANDERSEN, G.L.; BAKKER, P.A.H.M.; RAAIJMAKERS, J.M. Deciphering the rhizosphere microbiome for diseasesuppressive bacteria. **Science**, Washington, v. 332, n. 6033, p. 1097-1100, 2011.

MERTENS, J.; BROOS, K.; WAKELIN, S.A.; KOWALCHUK, G.A.; SPRINGAEL, D.; SMOLDERS, E. Bacteria, not archaea, restore nitrification in a zinc-contaminated soil. **ISME Journal**, New York, v. 3, n. 8, p. 916-923, 2009.

MIRANDA, C.C.; CANELLAS, L.P.; TRINDADE NASCIMENTO, M. Caracterização da matéria orgânica do solo em fragmentos de mata atlântica e em plantios abandonados de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 31, n. 5, p. 905–916, 2007.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2nd ed. Lavras: Universidade Federal de Viçosa, , 2006. 729p.

MOSIER, A.C.; FRANCIS, C.A. Relative abundance and diversity of ammoniaoxidizing archaea and bacteria in the San Francisco Bay estuary. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 10, n. 11, p. 3002–3016, 2008.

MUYZER, G.; DEWAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA.

Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 59, n. 3, p. 695–700, 1993.

NACKE, H.; THURMER, A.; WOLLHERR, A.; WILL, C.; HODAC, L.; HEROLD, N.; SCHONING, I.; SCHRUMPF, M.; DANIEL, R. Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 2, e17000, 2011.

NICOL, G.W.; SCHLEPER, C. Ammonia-oxidising Crenarchaeota: Important players in the nitrogen cycle? **Trends in Microbiology**, London, v. 14, n. 5, p. 207–212, 2006.

NICOL, G.W.; LEININGER, S.; SCHLEPER, C.; PROSSER, J.I. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidising archaea and bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 10, n. 11, p. 2966–2978, 2008.

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.

NUGROHO, R. A.; RÖLING, W.F.M.; LAVERMAN, A.M.; VERHOEF, H.A. Low nitrification rates in acid scots pine forest soils are due to pH-related factors. **Microbial Ecology**, New York, v. 53, n. 1, p. 89–97, 2007.

O'MULLAN, G.D.; WARD, B.B. Comparison of temporal and spatial variability of ammonia-oxidizing bacteria to nitrification rates in Monterey Bay, California. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 2, p. 697–705, 2005.

PARK, H.D.; WELLS, G.F.; BAE, H.; CRIDDLE, C.S.; FRANCIS, C.A. Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 8, p. 5643–5647, 2006.

PARK, S.J.; PARK, B.J.; RHEES, K. Comparative analysis of archaeal 16A rRNA and amoA genes to estimate the abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea in marine sediments. **Extremophiles**, Tokyo, v. 12, n. 4, p. 605–615, 2008.
PEREIRA E SILVA, M.C.; SEMENOV, A.V.; VAN ELSAS, J.D.; SALLES, J.F. Seasonal variations in the diversity and abundance of diazotrophic communities across soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 77, n. 1, p. 57–68, 2011.

PESADRO, M.; WIDMER, F. Identification of novel Crenarchaeota and Euryarchaeota clusters associated with different depth layers of a forest soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 42, n. 1, p. 89–98, 2002.

POLY, F.; MONROZIER, L.J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Microbiology**, Netherlands, v. 152, 95-103, 2001.

RAMETE, A. Multivariate analyses in microbial ecology. FEMS Microbiology Ecology, Malden, v.62, n. 2, p. 142-160, 2007.

RDP. **Ribosomal database project**. Disponível em: < http://pyro.cme.msu.edu/>. Acesso em: 1 nov. 2011.

REED, S.C.; CLEVELAND, C.C.; TOWNSEND, A.R. Controls over leaf litter and soil nitrogen fixation in two lowland tropical rain forests. **Biotropica**, Malden, v. 39, n. 5, p. 585–592, 2007.

REED, S.C.; CLEVELAND, C.C.; TOWNSEND, A.R. Functional Ecology of Free-Living Nitrogen Fixation: A Contemporary Perspective. **Annual Review of Ecology**, **Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v. 42, p. 489-512, 2011.

RICH, J.J.; DALE, O.R.; SONG, B.; WARD, B.B. Anaerobic ammonium oxidation (Anammox) in Chesapeake Bay sediments. **Microbial Ecology**, New York, v. 55, n. 2, p. 311–320, 2008.

ROSKOSKI, J.P. Nitrogen fixation in hardwood forests of the northeastern United States. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 54, n. 1, p. 33–44, 1980.

RYSGAARD, S.; GLUD, R.N.; SEJR, M.K.; BLICHER, M.E.; STAHL, H.J. Denitrification activity and oxygen dynamics in Arctic sea ice. **Polar Biology**, New York, v. 31, n. 5, p. 527–537, 2008.

RASCHE, F.; KNAPP, D.; KAISER, C.; KORANDA, M.; KITZLER, B.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S.; RICHTER, A.; SESSITSCH, A. Seasonality and resource availability control bacterial and archaeal communities in soils of a temperate beech forest. **ISME Journal**, New YorK, v. 5, n. 3, p. 389-402, 2011.

SALLES, J.F.; DE SOUZA, F.A.; VAN ELSAS, J.D. Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 4, p. 1595-1603, 2002.

SARITA, S.; PRIEFER, U.B.; PRELL, J.; SHARMA, P.K. Diversity of *nifH* gene amplified from rhizosphere soil DNA. **Current Science,** Bangalore, v. 94, n. 1, p. 109-114, 2008.

SANTORO, A.E.; FRANCIS, C.A.; SIEYES, N.R.; BOEHM, A.B. Shifts in the relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across physicochemical gradients in a subterranean estuary. **Environmental Microbiology**, Malden, v. 10, n. 4, p. 1068–1079, 2008.

SANTOS, H.F.; CURY, J.C.; CARMO, F.L.; SANTOS, A.L.; TIEDJE, J.; VAN ELSAS, J.D.; ROSADO, A.S.; PEIXOTO, R.S. Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: bacterial proxies for oil pollution. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 3, e16943, 2011.

SATO, T.; ATOMI, H. Novel metabolic pathways in Archaea. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 14, n. 3, p. 1–8, 2011.

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, communitysupported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.

SCHLEPER, C.; HOLBEN, W.; KLENK, H.P. Recovery of crenarchaeotal ribosomal DNA sequences from freshwater lake sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 1, p. 321–323, 1997.

SCHLEPER, C.; JURGENS, G.; JONUSCHEIT, M. Genomic studies of uncultivated archaea. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 6, p. 479–488, 2005.

SHEN, J.P.; ZHANG, L.M.; ZHU, Y.G.; ZHANG, J.B.; HE, J.Z. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. **Environmental Microbiology**, Malden, v. 10, n. 6, p. 1601–1611, 2008.

SHEPARD, R.N. Metric structures in ordinal data. **Journal Mathematical Psychology**, San Diego, v. 3, n. 2, p. 287–315, 1966.

SIMONET, P.; GROSJEAN, M.C.; MISRA, A.K.; NAZARET, S.; COURNOYER, B.; NORMAND, P. *Frankia* genusspecific characterization by polymerase chain reaction. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 11, p. 3278–3286, 1991.

SNYDER, L.A.S.; LOMAN, N.; PALLEN, M.J.; PENN, C.W. Next generation sequencing the promise and perils of charting the great microbial unknown. **Microbial Ecology**, New York, v. 57, n. 1, p. 1-3, 2009.

SPANG, A.; HATZENPICHLER, R.; BROCHIER-ARMANET, C.; RATTEI, T.; TISCHLER, P.; SPIECK, E.; STREIT, W.; STAHL, D.A.; WAGNER, M.; SCHLEPER, C. Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota. **Trends in Microbiology**, London, v. 18, n. 8, p. 331–340, 2010.

SPRENT, J.I.; SPRENT, P. Nitrogen fixing organisms. **Chapman and Hall**, London, UK, 1990. P. 256.

STEVENS, H.; ULLOA, O. Bacterial diversity in the oxygen minimum zone of the eastern tropical South Pacific. **Environmental Microbiology**, Malden, v. 10, n. 5, p. 1244–59, 2008.

STOPNISEK, N.; GUBRY-RANGIN, C.; HÖFFERLE, S.; NICOL, G.W.; MANDIC-MULEC, I.; PROSSER, J.I. Thaumarchaeal Ammonia Oxidation in an Acidic Forest Peat Soil Is Not Influenced by Ammonium Amendment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 22, p. 7626–7634, 2010.

STROUS, M.; PELLETIER, E.; MANGENOT, S.; RATTEI, T.; LEHNER, A.; TAYLOR, M.W.; HORN, M.; DAIMS, H.; BARTOL-MAVEL, D.; WINCKER, P.; BARBE, V.; FONKNECHTEN, N.; VALLENET, D.; SEGURENS, B.; SCHENOWITZ-TRUONG, C.; MÉDIGUE, C.; COLLINGRO, A.; SNEL, B.; DUTILH, B.E.; OP DEN CAMP, H.J.; VAN DER DRIFT, C.; CIRPUS, I.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.T.; HARHANGI, H.R.; VAN NIFTRIK, L.; SCHMID, M.; KELTJENS, J.; VAN DE VOSSENBERG, J.; KARTAL, B.; MEIER, H.; FRISHMAN, D.; HUYNEN, M.A.; MEWES, H.W.; WEISSENBACH, J.; JETTEN, M.S.; WAGNER, M.; LE PASLIER, D. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. **Nature**, London, v. 440, n. 7085, p. 790–794, 2006.

SZUKICS, U.; HACKL, E.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S.; SESSITSCH, A. Rapid and dissimilar response of ammonia oxidizing archaea and bacteria to nitrogen and water amendment in two temperate forest soils. **Microbiological Research**, Jena, (In Press), doi:10.1016/j.micres.2011.04.002, 2011.

TAMAMES, J.; ABELLÁN, J.J.; PIGNATELLI, M.; CAMACHO, A.; MOYA, A. Environmental distribution of prokaryotic taxa. **BMC Microbiology**, London, v. 10, n. p. 1-14, 2010.

TOURNA, M.; FREITAG, T.E.; NICOL, G.W.; PROSSER, J.I. Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 10, n. 5, p. 1357-64, 2008.

TOURNA, M.; STIEGLMEIER, M.; SPANG, A.; KÖNNEKE, M.; SCHINTLMEISTER, A.; URICH, T.; ENGEL, M.; SCHLOTER, M.; WAGNER, M.; RICHTER, A.; SCHLEPER, C.; Nitrososphaera viennensis, an ammonia oxidizing archaeon from soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, n. 20, p. 8420-8425, 2011.

TREUSCH, A.H.; LEININGER, S.; KLETZIN, A.; SCHUSTER, S.C.; KLENK, H.; SCHLEPER, C. Novel genes for nitrite reductase and Amo related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. **Environmental Microbiology**, Malden, v. 7, n. 12, p. 1985–1995, 2005.

TONHASCA JUNIOR, A. Definição, características e limites da mata atlântica. In: TONHASCA JUNIOR, A. (Ed.). Ecologia e História Natural da Mata Atlântica. Interciência, Rio de Janeiro, v. 1, p. 9-16, 2005.

VALENTINE, D.L. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, n. 4, p. 316–323, 2007.

VAN DER HEIJDEN, M.G.A.; BARDGETT, R.D.; VAN STRAALEN, N.M. The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. **Ecology Letters**, Malden, v. 11, n. 3, p. 296–310, 2008.

VENTER, J.C.; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J.F.; HALPERN, A.L.; RUSCH, D.; EISEN, J.A.; WU, D.; PAULSEN, I.; NELSON, K.E.; NELSON, W.; FOUTS, D.E.; LEVY, S.; KNAP, A.H.; LOMAS, M.W.; NEALSON, K.; WHITE, O.; PETERSON, J.; HOFFMAN, J.; PARSONS, R.; BADEN-TILLSON, H.; PFANNKOCH, C.; YU-HUI ROGERS, Y-H.; HAMILTON O. SMITH, H.O. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. **Science**, Washington, v. 304, n. 5667, p. 66–74, 2004.

VITOUSEK, P.M.; HOWARTH, R.W. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 13, n. 2, p. 87-115, 1991.

WAKELIN, S.A.; GUPTAC, V.V.S.R.; FORRESTER, S.T. Regional and local factors affecting diversity, abundance and activity of free-living, N2-fixing bacteria in Australian agricultural soils. **Pedobiologia**, Jena, v. 53, n. 6, p. 391-399, 2010.

WARDLE, D.A.; BARDGETT, R.D.; KLIRONOMOS, J.N.; SETALA, H.; VAN DER PUTTEN, W.H.; WALL, D.H. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. **Science**, Washington, v. 304, p. 1629-1633, 2004.

WESSÉN, E.; SÖDERSTRÖM, M.; STENBERG, M.; BRU, D.; HELLMAN, M.; WELSH, A.; THOMSEN, F.; KLEMEDTSON, L.; PHILIPPOT, L.; HALLIN, S. Spatial distribution of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across a 44-hectare farm related to ecosystem functioning. **ISME Journal**, New York, v. 5, p.1213-1225, 2011.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, n. 12, p. 4576–4579, 1990.

WUCHTER, C.; ABBAS, B.; COOLEN, M.J.L.; HERFORT, L.; VAN BLEIJSWIJK, J.; TIMMERS, P.; STROUS, M.; TEIRA, E.; HERNDL, G.J.; MIDDELBURG, J.J.; SCHOUTEN, S.; DAMSTÉ, J.S.S. Archaeal nitrification in the ocean. **Proceedings of the National Academy of Scienceof the United States of America**, Washington, v. 103, n. 33, p. 12317–12322, 2006.

ZHANG, Y.M.; WANG, H.L.; WANG, X.Q. The microstructure of microbiotic crust and its influence on wind erosion for a sandy soil surface in the Gurbantunggut desert of Northwestern China. **Geoderma**, Amsterdam, v. 132, p. 441–449, 2006.

ZHANG, Y.; DONG, J.; YANG, B.; LING, J.; WANG, Y.; ZHANG, S. Bacterial community structure of mangrove sediments in relation to environmental variables accessed by 16S rRNA gene-denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting. **Scientia Marina**, Barcelona, v. 73, n. 3, p. 487-498, 2009.

ZEHR, J.P.; JENKINS, B.D.; SHORT, S.M.; STEWARD, G.F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 5, n. 7, p. 539–554, 2003.

ZEHR, J.P.; KUDELA, R.M. Nitrogen cycle of the open ocean: from genes to ecosystems. **Annual review of marine science**, Palo Alto, v. 3, p. 197-225, 2011.

YARWOOD, S.A.; MYROLD, D.D.; HÖGBERG, M.N. Termination of belowground C allocation by trees alters soil fungal and bacterial communities in a boreal forest. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 70, n. 1, p. 151–162, 2009.