

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

**Diversidade de bactéria e *Archaea* em solos de Mata Atlântica no  
estado de São Paulo**

**Júlia Elidia de Lima**

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

**Piracicaba  
2011**

**Júlia Elidia de Lima**  
**Bióloga**

**Diversidade de bactéria e *Archaea* em solos de Mata Atlântica no 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**

Lima, Júlia Elidia de  
Diversidade de bactéria e *Archaea* em solos de Mata Atlântica no estado de São Paulo / Júlia Elidia de Lima. - - Piracicaba, 2011.  
83 p. : il.

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

1. Bactérias 2. DNA 3. Ecologia microbiana 4. Reação em cadeia por polimerase  
5. Ribossomos 6 Sequenciamento genético I. Título

CDD 631.46  
L732d

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

Aos meus pais Benedito e Ivani  
e minha irmã Giovana;  
Por mostrarem ser a melhor família,  
**Dedico.**

Ao meu noivo, grande amor e metade Adalto,  
**Ofereço.**



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e oportunidade de vivenciar o que pude até aqui.

Ao Prof. Dr. Fernando Dini Andreote pela orientação acolhedora, confiança e pela oportunidade de aprendizagem e crescimento acadêmico e profissional. Novas idéias, conselhos, conversas e ensinamentos fizeram parte desta jornada de trabalho e sem dúvida levarei comigo para sempre.

Aos meus maravilhosos pais. É impossível descrever o meu carinho. A importância deles vai além da vida e posso afirmar que nada disso teria se concretizado se não fosse por eles. Agradeço à minha irmã Giovana pela melhor amizade e companheirismo. Ao meu grande amor e noivo, que entre estresse e artigos, desdobrou-se para me acalmar e que sempre depois da conversa ao final do meu dia, eu estava pronta para o próximo. Vocês todos foram essenciais.

À minha família inteira; em especial ao casal que eu admiro desde que nasci: Santa e Licínio. Aos meus tios e tias pelo apoio e curiosidade.

Agradeço à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

À Prof. Dra. Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso que, em 2008, despertou em mim a curiosidade pela pesquisa. Sempre serei grata!

Ao Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais pelo espaço e equipamentos em seu laboratório.

Aos técnicos Fernando, Denise e Wladimir. Obrigada pelo auxílio, força e amizade!

À Família Perim, que faz parte da minha vida.

Agradeço à minha grande amiga Emiliana pela amizade; maravilhosa pessoa e sempre presente, seja nos géis de DGGE ou nos almoços no Rucas. Obrigada especial pra você, Emi!

A todas as minhas amigas de Santa Bárbara d'Oeste, Sumaré, Nova Odessa, Perdões, Piracicaba... É com elas que as risadas nos finais de semana acontecem.

Aos amigos com participação especial neste trabalho: Ademir, Armando, Francisco e Josh. Muito obrigada pelos ensinamentos e ajuda!

A todos os companheiros e amigos da ESALQ, salinha, laboratório: Carol, Cris Alcântara, Cris Kit, Danice, Daniel, Danielle, Diego, Dig, Éder, Jamil, Joice, Josh, Júlia, Marina, Maryeimy, Moelinha, Mylenne, Paulinho, Pedro, Rafael, Sandra e Silvia.

Enfim, a todos que estiveram presentes e participaram de alguma forma neste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

“Você é filho do Universo,  
irmão das estrelas e árvores.  
Você merece estar aqui  
e mesmo que você não possa perceber  
a Terra e o universo  
vão cumprindo o seu destino.”  
- **Desiderata** -





## SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT .....	13
1 INTRODUÇÃO .....	15
2 DESENVOLVIMENTO .....	17
2.1 Revisão bibliográfica .....	17
2.1.1 Mata Atlântica .....	17
2.1.2 Diversidade de <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i> em solos .....	21
2.1.3 Fatores que modulam a composição das comunidades microbianas no solo.....	23
2.2 Material e Métodos .....	25
2.2.1 Área de estudo e amostragem do solo .....	25
2.2.2 Identificação dos indivíduos arbóreos das áreas .....	27
2.2.3 Coleta das amostras de solo .....	27
2.2.4 Análise química e física do solo .....	28
2.2.5 Extração de DNA das amostras de solo .....	28
2.2.6 PCR em tempo real (qPCR) do gene 16S DNAr de <i>Archaea</i> e <i>Bacteria</i> .....	28
2.2.7 Análise dos perfis das comunidades de bactérias e arqueias por meio da técnica de PCR-DGGE .....	30
2.2.8 Análises dos perfis de DGGE das comunidades microbianas .....	32
2.2.9 Análises das comunidades de bactérias e arqueias por meio do sequenciamento parcial do gene 16S DNAr via pirosequenciamento .....	34
2.3 Resultados e discussão .....	36
2.3.1 Quantificação de bactérias e arqueias por meio de PCR em tempo real (qPCR) .	36
2.3.2 Diversidade das comunidades microbianas no solo baseada em PCR-DGGE ....	39
2.3.3 Determinação dos parâmetros ambientais que determinam a composição das comunidades de <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i> nas áreas estudadas .....	42
2.3.3.1 Análise taxonômica dos grupos de <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i> presentes em solos de Mata Atlântica .....	47
2.3.3.1.1 Grupos de <i>Bacteria</i> que ocorrem em solos de Mata Atlântica .....	47
2.3.3.1.2 Grupos de <i>Archaea</i> que ocorrem em solos de Mata Atlântica .....	52

2.3.3.1.3 Análise das comunidades microbianas em solo de Mata Atlântica baseada em UTOs .....	55
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	59
REFERÊNCIAS .....	61
ANEXOS .....	73

## RESUMO

### Diversidade de bactéria e *Archaea* em solos de Mata Atlântica do estado de São Paulo

A Mata Atlântica é um bioma constituído de vários ecossistemas e considerado um *hotspot* da biodiversidade mundial. Sua extensão vai do Rio Grande do Sul até o Piauí, compondo cerca de 15% do território nacional. Porém, aproximadamente 93% da formação original da Mata atlântica já foi devastada. Seus solos são comumente pobres (baixa disponibilidade de nutrientes), mas apresenta alta taxa de decomposição do material orgânico, baixas perdas de nutrientes por lixiviação e grande ciclagem de nutrientes. Portanto, esse ambiente é composto por comunidades microbianas complexas e eficientes nestes processos, apesar do papel delas ser ainda pouco descrito. Desta maneira, no presente trabalho foram avaliados vários fatores que estão diretamente relacionados com a composição da comunidade de bactérias e arqueias em três áreas presentes num gradiente altitudinal de Mata Atlântica; Santa Virgínia, Picinguaba e Restinga. Com base em análises independentes de cultivo, foi demonstrado por PCR-DGGE que a estruturação da comunidade de bactérias e arqueias nestas áreas é mais dependente da vegetação do que das características físicas e químicas do solo. Adicionalmente, a abundância de tais comunidades, determinada por PCR em tempo real mostrou-se similar nas três áreas amostradas, com valores de  $10^9$  e  $10^8$  cópias do gene ribossomal 16S DNAr de bactérias e arqueias, respectivamente. Em relação aos grupos taxonômicos presentes em tais áreas, bactérias mostraram-se predominantemente pertencentes aos filos *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia* e *Proteobacteria* (com destaque para *Acidobacteria*, que foi o grupo dominante com média de 55,9%) e arqueias foram semelhantes aos grupos *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota*, com destaque para *Crenarchaeota* que compôs uma média de 84%. Desta forma, este trabalho mostrou de maneira pioneira, a detalhada composição da comunidade de *Bacteria* e *Archaea* em solos de Mata Atlântica, destacando alterações nestas comunidades devido às diferenciações nas características das áreas, principalmente guiadas pela composição florística da vegetação.

Palavras-chave: Ecologia microbiana; PCR-DGGE; 16S DNAr; qPCR; Pirosequenciamento



## ABSTRACT

### **Bacterial and archaeal diversity in soil from Atlantic forest of São Paulo State**

The Atlantic Forest biome consists of many ecosystems and is considered one of the world's biodiversity hotspots. It extends from Rio Grande do Sul to Piauí, covering nearly 15% of the country. However, approximately 93% of the original Atlantic Forest has been devastated. Soils are often poor (low nutrient availability) in this biome, but exhibit high rates of organic matter decomposition, low nutrient loss by leaching, and high nutrient cycling. Therefore, this environment harbors complex and efficient microbial communities that participate in these processes, although their role is still poorly described. Thus, this study assessed several factors directly related to bacterial and archaeal community composition at 3 Atlantic Forest sites in an altitudinal gradient: Santa Virgínia, Picinguaba, and Restinga. Based on culture-independent analyses, PCR-DGGE profiles indicated that bacterial and archaeal community structures at these sites are more dependent on vegetation than soil physical and chemical attributes. Additionally, abundance of these communities, determined by real-time PCR, was similar at the 3 sampling sites, with  $10^9$  and  $10^8$  copies of 16S rDNA gene for Bacteria and Archaea, respectively. Regarding the taxonomic groups present at these sites, bacteria predominantly belonged to the phyla, Acidobacteria, Verrucomicrobia, and Proteobacteria (highlighting Acidobacteria, the dominant group with an average of 55.9%) and archaea were similar to Euryarchaeota and Crenarchaeota groups, highlighting Crenarchaeota with an average of 84%. Thus, this study took a novel approach to illustrate the detailed composition of Bacteria and Archaea in Atlantic Forest soil, pointing out alterations in these communities due to different characteristics specific to each sampling site, mainly driven by vegetative floristic composition.

Keywords: Microbial ecology; PCR-DGGE; 16S rDNA; qPCR; Pirosequencing



## 1 INTRODUÇÃO

A faixa da Mata Atlântica presente no estado de São Paulo é composta por fisionomias e composições distintas, que variam principalmente de acordo com as variações altimétricas e latitudinais. Em termos gerais, a Mata Atlântica pode ser vista como um mosaico diversificado de ecossistemas, apresentando estruturas e composições florísticas diferenciadas em função das diferenças de solo, relevo e características climáticas existentes na ampla área de ocorrência deste bioma no Brasil.

A importância deste bioma reside em seu valor como imensa reserva biológica, sendo considerado um dos mais produtivos do mundo. Contudo, esta produtividade requer uma alta quantidade de nutrientes dentro da cadeia trófica, a qual liga a ocorrência desta abundância e complexidade com a importância dos microrganismos, uma vez que estes podem atuar diretamente na disponibilização destes elementos para outros seres vivos, o que torna fauna e flora altamente dependentes destas comunidades. Dentro destas comunidades, os microrganismos mais abundantes são as bactérias e os representantes do domínio das arqueias, que vêm sendo estudados e considerados uma importante fração da composição da microbiota do solo. Contudo, pouco se conhece sobre a diversidade destas comunidades microbianas em solos da Mata Atlântica.

Portanto, a utilização de metodologias independentes de cultivo, baseando as análises no DNA de tais organismos permite o conhecimento da diversidade destes grupos microbianos em solos da Mata Atlântica do estado de São Paulo. Adicionalmente, a possibilidade de trabalhar-se em três áreas distintas microclimaticamente dentro deste ecossistema permite a ampla análise e o melhor conhecimento da diversidade residente neste bioma. Esta informação, juntamente com o levantamento de outros parâmetros de estrutura de paisagem e fragmentação da floresta podem ser úteis para estabelecer diretrizes gerais num planejamento de conservação deste bioma.





## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 Revisão Bibliográfica**

#### **2.1.1 Mata Atlântica**

A Mata Atlântica é um bioma rico que abriga ecossistemas diferenciados, onde variam os relevos, paisagens, climas e a composição das comunidades de plantas e animais. Do Rio Grande do Sul até o Piauí são 1.315.460 km<sup>2</sup> de Mata Atlântica, ou cerca de 15% do território nacional, englobando 17 estados brasileiros, atingindo também o Paraguai e a Argentina. Esta mata é considerada a mais antiga do planeta, contando com aproximadamente 20.000 espécies de plantas vasculares, das quais metade são encontradas apenas neste bioma (LAMBALIS et al., 2006), resultando em um dos maiores endemismos do mundo (MYERS et al., 2000; RIBEIRO et al., 2009).

Porém, aproximadamente 93% da formação original da Mata atlântica já foi devastada (SOS MATA ATLÂNTICA, 2011), sendo perdida a maior parte desta região reconhecida como uma área com níveis excepcionais de biodiversidade, e que atualmente se encontra sob intenso estresse (BIAVATTI et al., 2007). Um mapeamento feito em 2006 pelo Ministério do Meio Ambiente mostra que os remanescentes de vegetação nativa da Mata Atlântica ocupam atualmente apenas 27% da área original, incluindo áreas originais e outras originárias de regeneração, em vários estágios e de todas as fisionomias: florestas, campos naturais, restingas, manguezais e outros tipos de vegetação nativa. Dentro desta porcentagem, as áreas que garantem sua biodiversidade intacta não chegam a 8% do que era na época do descobrimento do Brasil, sendo a maior parte convertida para área de cidades e atividades agropecuárias.

Aproximadamente 123 milhões de pessoas vivem em áreas de Mata Atlântica, espalhadas em 3.410 municípios, dos quais 2.928 têm suas sedes municipais dentro da área de Mata Atlântica. Tais cidades dependem diretamente da conservação dos remanescentes desta mata, os quais mantêm nascentes e fontes, regulam clima, temperatura do solo e protegem escarpas e encostas de morros (CAMPANILI; WIGOLD, 2010).

Num contexto global, a Mata Atlântica é considerada um *hotspot*, que é uma área com alta biodiversidade e endemismo e ao mesmo tempo ameaçada pela degradação em seu mais alto grau. A organização não-governamental Conservação Internacional (CI), numa última atualização realizada em 2005, identificou 34 regiões do planeta mais ameaçadas, onde vivem 75% dos mamíferos, aves e anfíbios, sendo relacionadas entre elas, a Mata Atlântica e Cerrado brasileiro. Juntas, essas áreas correspondem a apenas 2,3% da superfície terrestre, onde se encontram 50% das plantas e 42% dos vertebrados conhecidos. No mapa dos *hotspots* da CI, a Mata Atlântica é primeiro bioma a ser classificado de acordo com os requisitos avaliados (<http://www.conservation.org.br>).

Do ponto de vista de conservação, a educação ambiental e exploração sustentável devem ser planejadas para estimular a continuidade dos esforços, diminuindo a dependência de financiamento internacional e de outras entidades para a proteção deste bioma (BIAVATTI et al., 2007). Vários autores sugeriram anteriormente que essa paisagem intensamente fragmentada proporciona um excelente alvo de estudos sobre possíveis consequências que esse processo traz à biodiversidade do bioma (BROWN; BROWN, 1992; VIANA; TABANEZ, 1995; TABARELLI; MANTOVANI, 1997; TABARELLI; MANTOVANI; PEREZ, 1999). Num aviso de recuperação, Ribeiro e colaboradores (2009) sugerem que a plantação de árvores exóticas pode ser uma alternativa para aumentar a conectividade entre os fragmentos, bem como abrigar algumas espécies extremamente exigentes.

A Mata Atlântica é classificada como Floresta Ombrófila Densa, que ocupa boa parte do litoral brasileiro; seu clima é equatorial ao norte e quente temperado sempre úmido ao sul e com temperaturas médias elevadas durante todo o ano. Em razão do seu tamanho, este bioma também possui diferenças na composição da floresta; a pluviosidade é maior nas áreas costeiras, atingindo mais de 4.000 mm/ano, enquanto que em florestas interioranas este índice chega a 1.000 mm/ano (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2003). A alta pluviosidade em certas regiões deve-se à barreira que a Serra do Mar constitui para os ventos que sopram do oceano.

Os solos da Mata Atlântica são comumente pobres (baixa disponibilidade de nutrientes) e a topografia é bastante acidentada. Apesar da baixa fertilidade,

normalmente observa-se em solo sob floresta uma grande taxa de decomposição do material orgânico, baixas perdas de nutrientes por lixiviação e grande ciclagem de nutrientes (SILVA et al., 2007). No interior da mata, devido à densidade da vegetação, a luz é reduzida, e a variação climática (umidade, pluviosidade, ventos) é principalmente observada devido a alterações na altitude (IBAMA, 2007), que divide este bioma em quatro tipos; Floresta Ombrófila Densa das Terras baixas, com altitude de 5 a 50 metros em relação ao nível do mar; Floresta Ombrófila Densa Submontana, com altitude entre 50 e 500 metros; Floresta Ombrófila Densa Montana, de 500 a 1.200 metros; e Floresta Ombrófila Densa Altimontana, acima de 1.200 metros (VELOSO et al., 1991).

Na busca pela preservação e biodiversidade dos fragmentos da Mata Atlântica foram criadas diversas áreas de preservação ambiental, entre elas o Parque Estadual da Serra do Mar (PESM), criado em 1977 através do Decreto Estadual n.º 10.251, de 30 de agosto de 1977 (posteriormente alterado pelo Decreto Estadual n.º 13.313 de 06 de março de 1979). Esta área representa a maior porção contínua preservada de Mata Atlântica do Brasil, com quase 315.000 ha, numa extensão que vai desde a divisa de São Paulo com o Rio de Janeiro até Itariri, no sul do estado. No seu limite norte, o PESM apresenta uma pequena sobreposição com o Parque Nacional da Serra da Bocaina (PROJETO TEMÁTICO, 2004). Devido às suas dimensões, o PESM é administrado por Núcleos, que são bases instaladas em áreas de domínio do estado. Dentre eles, o Núcleo Picinguaba e Santa Virgínia do Parque Estadual da Serra do Mar (Figura 1), onde pode ser encontrado um interessante gradiente de altitude para estudos focados na descrição da diversidade biológica presente em diferentes ecossistemas componentes da Mata Atlântica.

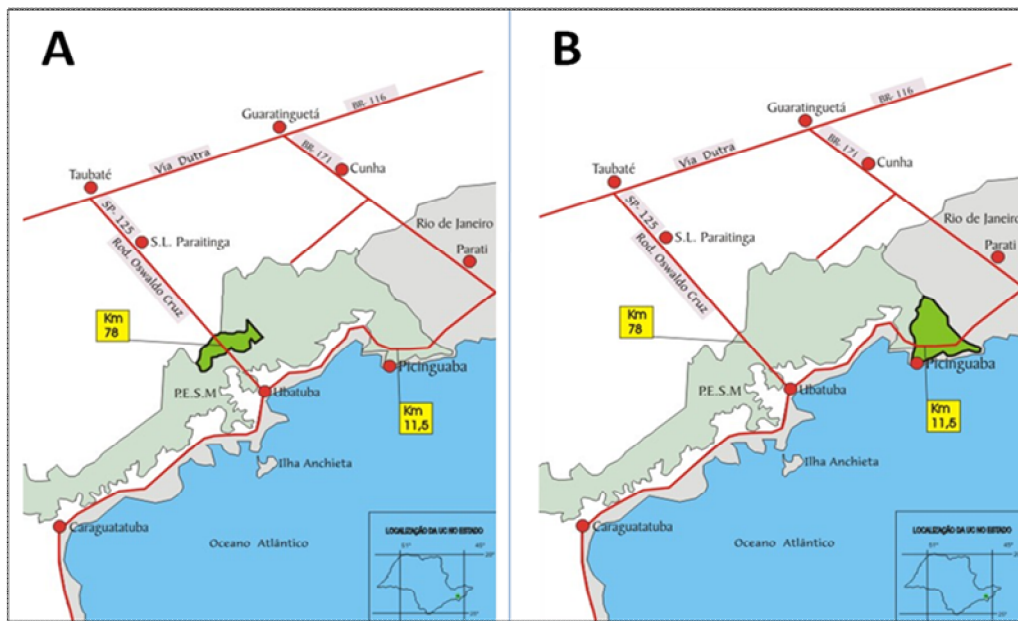


Figura 1 – Mapa dos núcleos Santa Virgínia (A) e Picinguaba (B) no município de Ubatuba, São Paulo, Brasil (Adaptado de <http://www.iflorestal.sp.gov.br/>)

Como anteriormente exposto, o uso da terra para a agricultura, atividades industriais e habitação são as principais causas da redução e da fragmentação da mata. Com isso, a perda de habitats afeta diretamente não apenas a diversidade de animais e plantas, mas também a diversidade microbiana presente neste bioma. Dentro deste contexto, sabe-se que a microbiota do solo é um componente chave dos biomas de floresta devido ao seu papel na agregação do solo, ciclagem de nutrientes, por exemplo, promovendo a quebra de celulose e lignina, e atuando na fixação biológica do nitrogênio (DONELLY et al., 1990; HU; VAN BRUGGEN, 1997). Considerando estas funções, pode-se atribuir à diversidade e à funcionalidade microbiana a suplementação nutricional no início da cadeia trófica de biomas de florestas.

Apesar de existirem limitações quanto a estudos em escalas latitudinais e longitudinais, os parâmetros de estrutura de paisagem e fragmentação da floresta podem ser úteis para estabelecer diretrizes gerais num planejamento de conservação, onde padrões de distribuição de comunidades microbianas ainda não são conhecidos (RIBEIRO et al., 2009).

Dentro do bioma Mata Atlântica, diferentes regiões sofreram durante séculos com o empobrecimento de seus solos, principalmente devido à intensa destruição e

fragmentação das florestas, que se elevou nas últimas décadas com a expansão e intensificação agrícola (BRANNSTROM, 2001; DURIGAN et al., 2007). Devido às diferenças climáticas entre as diversas regiões desta mata, pode-se sugerir que grupos distintos de organismos tenham sido selecionados em cada uma das áreas, o que possivelmente pode ter levado a uma alteração nos perfis das comunidades microbianas do solo nestas regiões.

### **2.1.2 Diversidade de *Bacteria* e *Archaea* em solos**

Devido à sua imensa heterogeneidade física, química e biológica, os solos são considerados os ambientes que exibem maior biodiversidade no nosso planeta. Este ambiente provavelmente representa o maior desafio para os microbiologistas, sendo a descrição de sua composição e funcionamento dificultados pela complexidade gerada através da relação entre a quantidade de espécies componentes das comunidades e a abundância de microrganismos em uma unidade de massa (DANIEL, 2005). Segundo van Elsas, Garbeva e van Veen (2004), o termo biodiversidade pode ser definido de várias maneiras. Em termos microbiológicos, pode se referir ao número de diferentes espécies e sua abundância relativa em uma dada comunidade em determinado habitat. Já em termos ecológicos e moleculares, a biodiversidade pode ser definida como o número e a distribuição de sequências distintas presentes no DNA extraído diretamente da comunidade microbiana de um determinado habitat.

Estimativas recentes do número de espécies em um grama de solo têm chamado muito a atenção, mostrando que o solo pode ser considerado o principal ambiente em relação à complexidade da comunidade de organismos pertencentes ao domínio *Bacteria* (ROESCH et al., 2007). O número estimado destes microrganismos num grama de solo é de  $10^9$  células (DANIEL, 2005), sendo este número dividido entre 2.000 e 18.000 genomas distintos.

Considerando os organismos que compõem tal diversidade dentro dos três domínios da vida na Terra, dois deles são compostos por grupos procariontes, *Archaea* e *Bacteria*. O domínio *Archaea* se distingue do domínio *Bacteria* por diferenças filogenéticas e bioquímicas, sendo que a adaptação ao estresse crônico de energia é

uma hipótese importante e crucial de pressão seletiva que rege a separação destes dois grupos (VALENTINE, 2007). O mecanismo biogeoquímico que permite às arqueias lidarem com este tipo de estresse inclui a baixa permeabilidade das membranas e a presença de vias catabólicas específicas. Estes microrganismos são conhecidos por serem abundantes e importantes nos oceanos (WUCHTER et al., 2006) e solos (BATES et al., 2011) Um processo onde as arqueias têm ganhado importância é a oxidação de amônio, essencial na ciclagem de nitrogênio no solo. Foi identificado num estudo com solos agrícolas da Noruega, Alemanha e Grécia, que a quantidade de arqueias amônio-oxidantes é maior que a de bactérias que realizam o mesmo processo no ciclo do nitrogênio (LEININGER et al., 2006).

A maior parte da enorme diversidade das comunidades microbianas dos solos não se desenvolve em meios de cultura comumente usados e disponíveis comercialmente (SAIT; JANSSEN, 2002; DIALLO et al., 2004). No entanto, estudar a diversidade microbiana de maneira independente de cultivo tem sido possível apenas com o advento das técnicas baseadas na análise do DNA extraído diretamente das amostras ambientais.

Essas técnicas geralmente baseiam-se na PCR (*Polimerase Chain Reaction*) ou RT-PCR (*Reverse Transcriptase - Polimerase Chain Reaction*) e posterior análise de fragmentos específicos do DNA ou RNA do solo. Os genes ribossomais 16S e 18S DNAr representam marcadores ecológicos conservados para procariotos e eucariotos, respectivamente. Com base em tais genes, as metodologias independentes de cultivo tornaram-se métodos comuns para descrever componentes estruturais da microbiota do solo, uma vez que elas são capazes de fornecer informações sobre sequências do DNA extraído e amplificado a partir de alguma amostra alvo (LAIZ et al., 2011).

Tais metodologias podem ser realizadas de maneiras diferentes, como por exemplo, por métodos de *fingerprinting*, onde pode-se citar o *Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis* (DGGE) (MUYZER et al., 1993), que é uma ferramenta poderosa e atualmente muito usada para analisar a estrutura complexa das comunidades microbianas. Adicionalmente, existem métodos quantitativos, como o PCR em tempo real, que é uma técnica muito sensível usada para a quantificação do gene alvo em amostras ambientais (HERMANSSON; LINDGREN, 2001; STUBNER, 2004). Existem

também métodos que permitem inferir sobre a filogenia dos organismos componentes de tais comunidades, como a clonagem e o sequenciamento de produtos de amplificação. Dentro deste último grupo de métodos, existe a tecnologia de pirosequenciamento, que é capaz de acessar a diversidade e a composição microbiana de solo em larga escala, através do sequenciamento de regiões específicas do gene 16S DNAr, não necessitando da etapa de clonagem. Estudos que empregaram esta técnica, utilizando o DNA do solo, geraram grandes conjuntos de dados, destacando esta metodologia como uma importante ferramenta para estudos que envolvem biogeografia de comunidades microbianas do solo (WILL et al., 2010), descrevendo de maneira bastante fiel a complexidade e a abundância de tais comunidades presentes nestas áreas.

Portanto, utilizando métodos como esses citados, tem sido possível acessar microrganismos não descritos por metodologias dependentes de cultivo, obtendo informações sobre os componentes da comunidade microbiana e relacionando a ocorrência destes com as mais distintas variáveis ambientais (ACOSTA-MARTÍNEZ et al., 2008; JONES et al., 2009; LAUBER et al., 2009; ROESH et al., 2007).

### **2.1.3 Fatores que modulam a composição das comunidades microbianas no solo**

Uma enorme variedade de fatores abióticos e bióticos entrelaça associações entre as plantas e os solos, e conseqüentemente modificam as comunidades microbianas, que por sua vez influenciam a qualidade do ambiente, desenvolvimento das plantas e dos ciclos biogeoquímicos (WIELAND; NEUMANN; BACKHAUS, 2011).

Para o grupo *Bacteria*, foi reportado que o uso da terra afeta indiretamente estruturas dessas comunidades, através das modificações das propriedades do solo promovidas por meio de mudanças nas práticas de manejo (JESUS et al., 2009). Outros estudos também indicaram que as propriedades do solo são importantes fatores que implicam nas diferenças estruturais de comunidades bacterianas (WAKELIN et al., 2008). Dentre tais fatores tem grande destaque o pH, que se mostra como um fator importante na composição da comunidade por modular a disponibilidade de nutrientes no solo e por influenciar diretamente complexos enzimáticos usados na nutrição dos



microrganismos do solo (LAUBER et al., 2009). Além disso, tem sido mostrado que o tipo (GIRVAN et al., 2003) e a textura do solo (SESSITSCH et al., 2001), bem como a disponibilidade de nitrogênio (FREY et al., 2004) e a ocorrência de espécies de plantas no ambiente (WIELAND; NEUMANN; BACKHAUS, 2011) afetam a presença dos microrganismos no solo.

Entradas de matéria orgânica no solo são provenientes principalmente das plantas, como por exemplo, através da queda das folhas de suas copas. A cobertura vegetal influencia várias características do solo, incluindo sua textura, fertilidade e funcionamento biológico (AYRES et al., 2009). Dessa forma, as espécies de plantas podem ser consideradas um dos principais determinantes da estrutura das comunidades microbianas no solo, uma vez que são elas as principais fornecedoras de carbonos sob formatos específicos à microbiota presente no ambiente (GARBEVA; van VEEN; van ELSAS, 2004). Vários artigos mostraram que plantas com genótipos distintos podem apresentar comunidades microbianas distintas (ANDREOTE et al., 2009, 2010).

Outro fator de modulação da comunidade microbiana pelas plantas envolve o efeito rizosférico, caracterizado pela liberação de uma grande variedade de compostos no solo como etileno, aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas, polissacarídeos e enzimas. Esses compostos criam ambientes únicos para os microrganismos vivos em associação com as raízes das plantas na rizosfera. Espécies distintas de bactérias, por exemplo, respondem diferentemente aos exsudatos das raízes de plantas de espécies diferentes; logo, diferentes composições desses exsudatos podem selecionar comunidades diferentes na rizosfera da planta. Por outro lado, as bactérias da rizosfera podem influenciar as plantas, de forma que uma ampla gama dessas bactérias serão capazes de promover crescimento das plantas através de sinais químicos, e produção de compostos, tais como auxinas, giberelinas ou glicolipídeos (BERTRAND et al., 2001). Acredita-se que por meio da rizosfera as plantas podem recrutar a partir do solo, os grupos microbianos que serão benéficos ao seu desenvolvimento (MENDES et al., 2011).

A composição de exsudatos da raiz é fortemente afetada pelo estágio de desenvolvimento da planta, que por sua vez pode afetar as comunidades microbianas

presentes na rizosfera ao longo do tempo (YANG; CROWLEY, 2000). Utilizando a metodologia independente de cultivo PCR-TGGE, Wieland e colaboradores (2001) avaliaram o grau de variação de populações bacterianas dominantes em relação ao tipo de solo (areia, silte e areia argilosa), tipo de planta (trevo, feijão e alfafa) e de estágio de desenvolvimento da planta. Estes autores concluíram que a espécie da planta teve maior efeito sobre a microbiota, indicando ser o fator mais importante e determinante na composição de comunidades microbianas.

Portanto, o fato de o tipo de solo, planta ou outro efeito biológico ser primordial na estruturação das comunidades microbianas no solo pode ser explicado através das diferentes relações e interações microbianas, envolvendo os microrganismos presentes no solo, a cobertura vegetal do ambiente e o tipo de solo (GARBEVA; van VEEN; van ELSAS, 2004). Dessa forma, o resultado destas interações são as diferentes estruturas de comunidades microbianas encontradas em solos distintos e sob diferentes ocupações e manejo. No entanto, vale novamente destacar que estes fatores não podem ser simplesmente somados, mas deve-se considerar o ambiente resultante como o produto das interações entre eles (BEVER; WESTOVER; ANTONOVICS, 1997).

## **2.2 Material e Métodos**

### **2.2.1 Área de estudo e amostragem do solo**

Neste trabalho foram avaliadas as comunidades de bactérias e de arqueias presentes no solo de três áreas de Mata Atlântica localizadas no Estado de São Paulo. As três áreas são distintas em relação a sua altitude e estão distribuídas em dois núcleos dentro do Parque Estadual da Serra do Mar: Picinguaba (23°34' S e 45°05' W) e Santa Virgínia (23°17' S e 45°11' W), região nordeste do Estado. O relevo da região de Picinguaba é dominado pela Planície Costeira (PONÇANO et al., 1981) e as altitudes variam do nível do mar até 1.340 metros, tendo seu clima considerado úmido e sem estação seca (SETZER, 1966). Já a região do núcleo Santa Virgínia fica localizada em São Luis do Paraitinga, é recoberto predominantemente de Floresta Ombrófila

Densa Montana (VELOSO et al., 1991); sua altitude varia de 850 a 1.200 metros, e possui clima temperado e sem estação seca.

As áreas dentro do Parque foram previamente divididas num grid amostral identificado no projeto temático Biota<sup>1</sup> sob coordenação dos pesquisadores Carlos A. Joly e Luiz A. Martinelli. Cada fotofisionomia (parcela) de 1 ha foi subdividida em 100 subparcelas de 10 x 10 metros. Foram coletadas amostras de solo de forma aleatória de 4 subparcelas em cada uma das áreas. Dentro do núcleo Picinguaba, que é o único que abrange porção da orla marinha, as parcelas amostradas foram em área de Restinga (0 a 5 metros de altitude) correspondente a parcela A do grid amostral e na área de Floresta Ombrófila Densa das Terras Baixas (50 a 100 metros de altitude) correspondente a parcela E, enquanto que no núcleo de Santa Virgínia foram obtidas as amostras de Floresta Ombrófila Densa Montana, cujas altitudes variam de 900 a 1000 metros (parcela M) (Figura 2).

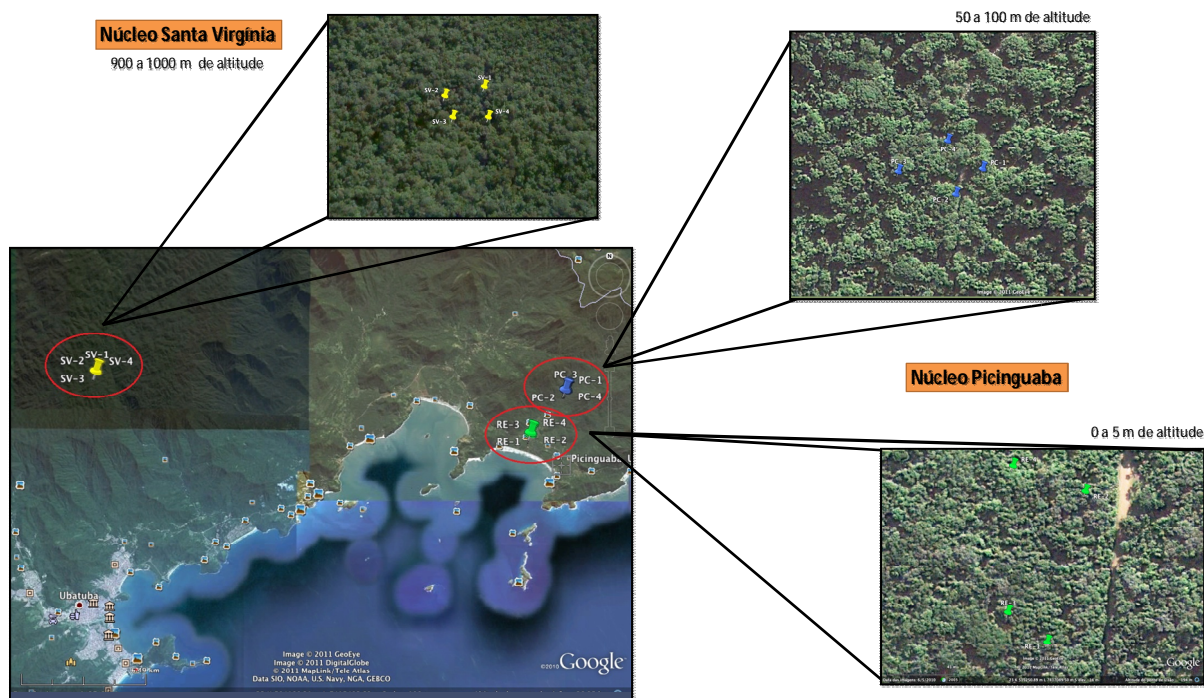


Figura 2 – Área de estudo no Parque Estadual da Serra do Mar

<sup>1</sup> JOLY, C.A., MARTINELLI, L.A. Projeto Temático Biota - Composição florística, estrutura e funcionamento da Floresta Ombrófila Densa dos Núcleos Picinguaba e Santa Virgínia do Parque Estadual da Serra do Mar. FAPESP 03/12595-7, 2004.

### **2.2.2 Identificação dos indivíduos arbóreos das áreas**

Os dados referentes à ocorrência de grupos de plantas nas áreas amostradas foram resgatados de Relatórios Anuais enviados à FAPESP referentes ao Projeto Temático Biota, citado anteriormente. Em cada parcela foram identificados e contados todos os indivíduos arbóreos vivos, incluindo palmeiras e pteridófitas (fetos arborescentes), com perímetro à altura do peito (PAP; 1,30 m)  $\geq$  15 cm (4,8 cm de diâmetro ao nível do peito - DAP), segundo metodologia apresentada no I Relatório Anual<sup>2</sup>. Árvores mortas em pé e ligeiramente tombadas ( $<30^\circ$ ) também foram incluídas e identificadas. A altura total e a altura do fuste foram estimadas visualmente para cada indivíduo registrado.

Estes dados foram usados neste trabalho para comparar a diversificação da floresta com as diferenças encontradas nas estruturas das comunidades de bactérias e arqueias nas diferentes áreas que compõem este estudo.

### **2.2.3 Coleta das amostras de solo**

No total foram coletadas e analisadas quatro repetições por área amostrada. Todas as amostras foram avaliadas separadamente e cada uma foi composta de uma porção de solo superficial de aproximadamente zero a 10 cm de profundidade, desprezando a camada composta de serapilheira. Coletou-se aproximadamente 100 g de solo em cada amostra e estas foram acondicionadas em sacos plásticos e conduzidas ao laboratório, conforme mostra Figura 3.

---

<sup>2</sup> JOLY, C.A., MARTINELLI, L.A. I Relatório Anual do Projeto Temático Biota - Composição florística, estrutura e funcionamento da Floresta Ombrófila Densa dos Núcleos Picinguaba e Santa Virgínia do Parque Estadual da Serra do Mar. FAPESP 03/12595-7, 2006.



Figura 3 – Coleta e armazenamento da amostra de solo

#### 2.2.4 Análise química e física do solo

As análises químicas e físicas das amostras de solo foram realizadas de forma terceirizada pelo Laboratório de Análise de Solo do Departamento de Solos (LSO) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) de acordo com seus protocolos. Estas análises foram compostas de uma caracterização completa de nutrientes e matéria orgânica do solo, além de uma análise da textura do solo, determinada pela quantidade das frações areia, silte e argila em cada amostra analisada.

#### 2.2.5 Extração de DNA das amostras de solo

O DNA ambiental foi extraído de cada uma das 12 amostras de solo utilizando-se o kit *Power Soil DNA Isolation kit* (MoBio, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Para observar a integridade do DNA e quantificá-lo, uma alíquota de 5  $\mu$ l foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x (Tris, Ácido acético, EDTA) adicionado ao corante *Sybr® Green* (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos). Como padrão molecular, foi utilizado 2  $\mu$ l de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology). O gel foi submetido a um campo eletroforético de 80 V por

aproximadamente 30 minutos. A aquisição da imagem do gel foi feita utilizando-se o densitômetro *Storm<sup>TM</sup>* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e analisada pelo programa *Image Quant TL* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

### **2.2.6 PCR em tempo real (qPCR) do gene 16S DNAr de *Archaea* e *Bacteria***

As análises de PCR em tempo real foram realizadas para quantificação do gene 16S DNAr de bactérias e arqueias nas amostras de solos das áreas com Mata Atlântica. As reações foram realizadas em duplicata no equipamento *Rotor Gene 6000* (Corbett Life Science, Austrália), disponível no laboratório de Microbiologia Molecular sob coordenação do Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais (ESALQ/USP). O sistema de detecção utilizado foi por *Sybr Green I*. Todas as reações de PCR em tempo real foram feitas em volume de 25  $\mu$ L contendo 12,5  $\mu$ L do kit *Platinum<sup>®</sup> Quantitative PCR SuperMix-UDG kit* (Invitrogen, Brasil) e 0,2  $\mu$ M dos oligonucleotídeos.

As amplificações do fragmento do gene 16S DNAr de bactérias foram feitas com os *primers* P1 (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') e P2 (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') (MUYZER et al., 1993) numa amplificação com uma desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Em todas as reações, uma curva de desnaturação foi realizada no final, com temperatura variando entre 72°C à 96°C para verificar a especificidade da amplificação.

Para o domínio *Archaea*, os *primers* usados para amplificação foram 1000R (5'-GAG ARG WRG TGC ATG GCC-3') e 340F (5'-CCC TAY GGG GYG CAS CAG-3') (GANTNER et al., 2011) e os ciclos iniciaram com a desnaturação a 98°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos e 72°C por 90 segundos. Em seguida, uma curva de desnaturação foi aplicada variando a temperatura entre 72°C à 96°C.

A aquisição dos dados foi feita através do *software Rotor Gene Real Time Analysis 1.7.65* (Corbett) que é capaz de calcular os valores de *cycle threshold* (*Ct*), a correlação logarítmica ( $R^2$ ) entre o número de ciclos e a quantidade de DNA nas amostras, além da eficiência da reação (*E*). Diluições de um PCR com os *primers* 27F e

1378R foram utilizadas para amplificação do DNA e obtenção das curvas padrão de *Bacteria*; para *Archaea* os *primers* usados na geração deste fragmento padrão foram 340F e 1000R. Este processo serviu como ponto inicial para cálculo da quantificação do gene nas amostras, sendo que os valores de *C<sub>t</sub>*s obtidos para cada amostra em cada uma das quantificações foram utilizados para determinar a quantidade absoluta do DNA alvo nas amostras ambientais.

Para avaliar se existem diferenças significativas entre os tratamentos, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o *software* Sisvar, e as médias foram comparadas com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### **2.2.7 Análise dos perfis das comunidades de bactérias e arqueias por meio da técnica de PCR-DGGE**

As análises das estruturas das comunidades de bactérias e arqueias nas áreas estudadas foram realizadas por PCR-DGGE. O DNA extraído foi utilizado para a amplificação da região V6 do gene 16S DNAr de *Bacteria* em reação de amplificação com os *primers* U968<sub>L</sub>G<sub>C</sub> (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TA-3') e 1378R (5'-CGG TGT GTA CAA CGC CCG GGA ACG-3') (HEUER et al., 1997), sendo o tamanho do fragmento esperado de 410 pb. As reações foram realizadas em volume de 50  $\mu$ L, contendo 2,5 mM de  $MgCl_2$ , 0,2 mM de cada dNTP, 0,5  $\mu$ L de formamida (1%), 0,4 mM de cada *primer*, em solução tampão para DNA polimerase Taq contendo 1 U DNA polimerase Taq (Fermentas, São Paulo, Brasil) e 1  $\mu$ L de DNA molde (5 a 10 ng), sendo completado o volume com água deionizada esterilizada. As condições de amplificação da PCR foram de desnaturação inicial por 4 minutos a 94°C; seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C, 2 minutos a 72°C; seguidos de uma extensão final por 10 minutos a 72°C.

Em seguida, quantidades iguais de amplicons de *Bacteria* (300 ng) foram analisadas através de eletroforese em gel com 6% de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1) contendo um gradiente de 40% a 60% de formamida e uréia, onde 100% de

desnaturação apresentam 7M de uréia e 80% de formamida (HEUER et al., 1997). A eletroforese foi realizada a 180 V e 60°C constantes durante 4 horas.

Para a análise dos grupos de  $\alpha$ -proteobactérias e  $\beta$ -proteobactérias presentes dentro do filo *Proteobacteria*, primeiramente uma PCR táxon específica foi realizada contendo 1  $\mu$ L da amostra de DNA extraído (5 a 10 ng) em 25 ciclos de amplificação com os *primers* seletivos para os grupos  $\alpha$  e  $\beta$ -proteobactérias. As reações para cada grupo foram realizadas separadamente e em combinação com o *primer* 1492R (5'-CCG CAT ACG CCC TAC GGG GGA AAG ATT TAT-3'). Para tais reações, os *primers* AlphaU (5'-CGC ACA AGC CCC TAC GGG GGA AAG ATT TAT-3') e Beta-2 (5'-CGC ACA AGC GGT GGA TGA-3') foram utilizados, respectivamente (GOMES et al., 2001). As reações grupo específicas foram realizadas de acordo com o protocolo descrito anteriormente para os *primers* utilizados.

O produto de amplificação grupo específico foi utilizado como DNA molde para a segunda reação de amplificação (*nested* PCR) com os *primers* para DGGE. As reações foram feitas num volume de 50  $\mu$ L, contendo aproximadamente 20 ng de DNA molde e 200 nM de cada *primer* universal U968 $\perp$ GC e 1378R, conforme descrito anteriormente para a PCR-DGGE de *Bacteria* e a concentração dos amplicons obtidos foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x. A análise de DGGE foi realizado de maneira similar, porém ajustando o gradiente usado para os valores de 45% a 65% de desnaturação. Estes géis foram submetidos a uma corrente elétrica de 180 V e 60°C constantes por 4 horas.

Para amplificação do fragmento do gene 16S DNAr de *Archaea* foram utilizados os iniciadores ARCH21F (5'-TTC YGG TTG ATC CYG CCR GA-3') e ARCH 958R (5'-YCC GGC GTT GAN TCC AAT T-3') (MOYER et al., 1998), e posteriormente numa segunda PCR os *primers* ARCH340FGC (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC CTA CGG GGY GCA SCA G-3') e ARCH519R (5'-TTA CCG CGG CKG CTG-3') (ØVREÅS et al., 1997). Os tamanhos esperados dos fragmentos amplificados foram de 937 pb e 179 pb, respectivamente. Ambas as reações de amplificação foram realizadas em 50  $\mu$ L de solução contendo 1,8 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2  $\mu$ M de cada *primer*, 0,01  $\mu$ L de BSA (10 mg.ml<sup>-1</sup>) em solução tampão para DNA polimerase Taq contendo 1 U DNA polimerase Taq (Fermentas, São



Paulo, Brasil) e 1  $\mu\text{L}$  de DNA molde (5 a 10 ng), sendo o restante do volume completado com água deionizada esterilizada. O DNA ambiental foi utilizado como molde na primeira amplificação, enquanto que 1  $\mu\text{L}$  do produto amplificado na primeira PCR foi utilizado como molde para a segunda reação. As condições de amplificação foram compostas de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguida por 30 ciclos de 30 segundos a 95°C para desnaturação, 30 segundos a 53°C para o anelamento dos oligonucleotídeos e 1 minuto a 72°C para a extensão dos fragmentos; uma extensão final de 6 minutos a 72°C foi acrescida ao término dos ciclos. Os amplicons resultantes da segunda amplificação foram separados e quantificados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x.

Em seguida, cerca de 300 ng de amplicons foram adicionados ao gel, sendo a eletroforese vertical feita num gradiente de 15% a 65% com 8% de acrilamida:bisacrilamida e submetida a 200 V e 60°C constantes durante 3,5 horas.

Para todos os géis de DGGE foi utilizado o sistema *DCode – Universal Mutation Detection System* (BioRad, Hercules, CA, USA), e tampão 0,5x TAE Buffer. Após as eletroforeses os géis foram corados com *Sybr Gold* (Invitrogen, São Paulo, Brasil) diluído em água deionizada esterilizada (1:10.000) e a aquisição das imagens foi feita por densitometria usando o densitômetro a laser *Storm<sup>Tm</sup> 845* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

### 2.2.8 Análises dos perfis de DGGE das comunidades microbianas

Os perfis de amplicons foram analisados pelo programa *Diversity Database* (BioRad, Hercules, CA, USA) e a partir das matrizes de presença e ausência geradas pelo programa, a análise *nMDS* (*non-Metric Multidimensional Scaling*) foi efetuada pelo programa *PAST* (HAMMER et al., 2001) com base no método de similaridade *Jaccard* para todos os grupos (*Bacteria*,  $\alpha$ - proteobactéria,  $\beta$ - proteobactéria e *Archaea*). Esta metodologia é considerada um método de ordenação robusto a situações não lineares, frequentemente resumindo a variância dos dados em menos eixos do que outras técnicas indiretas de ordenação. A distorção da resolução em duas dimensões da ordenação é expressa pelo valor S (chamado *stress*). Quanto mais próximo de zero,

melhor o ajuste entre a distância original dos objetos e a configuração obtida (LEGENDRE; LEGENDRE, 1998).

Adicionalmente, os dados dos perfis das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* foram submetidos à Análise de Similaridade (ANOSIM) com o objetivo de discriminar os tratamentos, comprovando a separação e representatividade destes. Os valores de R obtidos expressaram o nível de separação das estruturas das comunidades microbianas em função dos lugares de amostragem, variando em uma escala de 0 a 1. Interpretam-se os valores de  $R > 0,75$  como indicativos de grupos bem separados,  $R > 0,5$  como grupos com sobreposição claramente diferenciados e  $R < 0,25$  como grupos pouco separados, de acordo com o manual do programa *Primer5* (CLARKE; GORLEY, 2001).

Para demonstrar a variabilidade na distribuição espacial das amostras e correlacioná-las individualmente com a cobertura vegetal, características químicas e textura do solo (LEPS; SMILAUER, 2003) foi realizada uma análise de gradiente direto no *software Canoco* (Canoco 4.5, Biometris, Wageningen, Holanda). Para tal, primeiramente a distribuição dos dados foi testada por uma análise de *DCA* (*Detrended Correspondence Analysis*), sendo o maior de seus tamanhos de gradiente ("*Lenghts of gradiente*") inferior a 3 um indicativo de uma distribuição linear; enquanto que para valores superiores a 4 uma distribuição normal é sugerida, indicando respectivamente, análises de *RDA* (*Redundancy Analysis*) ou *CCA* (*Canonical Correspondence Analysis*) (ANDREOTE, AZEVEDO; ARAÚJO, 2009; RAMETTE, 2007) para melhor exploração dos dados. Após o teste de distribuição dos dados, análises de *RDA* foram geradas e as relações entre os fatores então comparados. Juntamente com a *RDA*, foi feito o Teste de Monte Carlo que considera 499 permutações aleatórias, permitindo avaliar a significância (valor *p*) dos fatores ambientais na distribuição de espécies nas amostras. Na *RDA* também foram obtidos os valores de *lambda-1* que mostram as porcentagens de variância que podem ser explicadas pelos fatores ambientais de forma independente.

O teste de Mantel também foi utilizado neste trabalho. Ele baseia-se na correlação entre duas matrizes distintas, o que segundo Mantel (1967), o torna adequado para estudos de correlação das separações observadas com base em dois conjuntos distintos de dados. Ele é capaz de calcular um coeficiente de correlação entre posições

correspondentes nas duas matrizes e avalia sua significância nas permutações dos objetos em uma das matrizes. Este é um teste comumente usado na ecologia microbiana, especialmente para testar a relação entre duas matrizes de distância geográfica e de diversidade molecular para um mesmo conjunto de microrganismos, ou para relacionar diversidade da comunidade e heterogeneidade ambiental (PARKER; SPOERKE, 1998; CHO; TIEDJE, 2000; HORNER-DEVINE et al., 2004; SCORTICHINI et al., 2006). Portanto, este teste pode assim determinar se a distribuição ambiental dos dados pode explicar significativamente a estrutura da comunidade microbiana evidenciada pela matriz molecular.

### **2.2.9 Análise da comunidade de bactérias e arqueias por meio do sequenciamento parcial do gene 16S DNAr via pirosequenciamento**

O sequenciamento das amostras por pirosequenciamento foi feito através de terceirização do serviço (Helixxa, Campinas, São Paulo, Brasil). Esta técnica se baseia na identificação dos grupos de bactérias e arqueias presentes em solos por meio do sequenciamento de regiões específicas do gene codificador para o RNA funcional da subunidade 16S do ribossomo.

Nesta análise foram avaliadas apenas duas repetições por tratamento, sendo tal redução nas amostras suportada pelo perfil similar demonstrado na análise de PCR-DGGE dentro de cada área de Mata atlântica estudada. Para tanto, o DNA extraído das amostras foi amplificado com *primers* flanqueadores da região V4 deste gene, usando os *primers* 520F (5'-AYT GGG YDT AAA GNG-3') e uma mistura de *primers* reversos 802R (5'-TAC CRG GGT HTC TAA TCC-3', 5'-TAC CAG AGT ATC TAA TTC-3', 5'-CTA CDS RGG TMT CTA ATC-3', 5'-TAC NVG GGT ATC TAA TCC-3'), visando amostrar o maior número de grupos bacterianos possíveis dentro da amostra a ser analisada, como descrito no *Ribosomal Data Project (RDP)*. Em tais *primers* foram adicionados adaptadores A e B, conforme o manual do fabricante do equipamento (Roche, EUA). Adicionalmente, o *primer forward* usado para cada amostra recebeu uma *tag* de identificação composta de 6 a 8 bases, que serviu para identificar a origem de cada uma das sequências obtidas. Para grupos de arqueias, o *primer* reverso utilizado foi o

ArcR (5'-TTA CCG CGG CKG CTG-3') e o *forward primer* foi o ArcF (5'- CCC CTA CGC CCY GCA SCA G-3'), flanqueando assim a região V3 (bases 340 a 519 do gene 16S DNAr) e cada amostra recebeu uma *tag* de identificação, como feito para bactérias. As *tags* e os *primers* usados em cada amostra são apresentados nos Anexos E e F.

A análise inicial das sequências foi feita usando o *Pyrosequencing Pipeline* do *Ribosomal Database Project (RDP)*, onde foi feita inicialmente uma triagem inicial que as separou, através de suas *tags* de identificação, em grupos de cada área de coleta. Neste processo as sequências de baixa qualidade foram removidas. Após isso, os grupos de sequências foram alinhados e agrupadas em *datasets*, somando 6 deles para cada grupo microbiano (*Bacteria* e *Archaea*), que foram submetidos a afiliação taxonômica usando o *RDP Classifier*. Com estes dados foram construídos gráficos de abundância relativa dos grupos de bactérias e arqueias presentes no solo da Mata Atlântica das diferentes áreas estudadas.

Com base na similaridade observada entre as repetições de cada área nesta análise, ambas foram agrupadas para a análise baseada em UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais), realizada no *software* MOTHUR (SCHLOSS et al., 2009). Neste programa, cada *dataset* correspondeu a uma área amostral (Santa Virgínia, Picinguaba e Restinga). Já agrupadas e alinhadas, as sequências foram usadas para gerar matrizes de distância (*Phylip Distance Matrix*), utilizadas posteriormente para obter índices de riqueza (Chao1), diversidade (Shannon) e de cobertura (ICE).

O índice de Chao1 usa o número de UTOs com uma ou duas sequências para estimar o número de espécies faltantes, pois de acordo com o autor esta informação está presente nestas UTOs (CHAO, 1984). Para a estimativa de diversidade de espécies presentes nas comunidades analisadas foi aplicado o índice de Shannon, que é um índice geral de diversidade sensível a riqueza e a abundância relativa de espécies (ATLAS; BARTHA, 1998). Para a análise de suficiência amostral utilizou-se a metodologia descrita por Mullins e colaboradores (1995). A cobertura do número de seqüências amostradas (C) é igual a  $1-(n/N)$  onde  $n$  é o número de seqüências que ocorreram apenas uma vez (seqüências únicas) e  $N$  é o número total de seqüências amostradas. Estes índices foram obtidos usando o *software* MOTHUR (SCHLOSS et al., 2009).

Além disso, foram geradas curvas de rarefação e diagramas de Venn dos grupos microbianos estudados. Esta análise foi realizada com base no agrupamento das sequências em UTOs com sequências de no máximo 3% de dissimilaridade genética (*cutoff* 0,03).

## 2.3 Resultados e discussão

### 2.3.1 Quantificação de bactérias e arqueias por meio de PCR em tempo real (qPCR)

A técnica de PCR em tempo real permitiu a quantificação dos domínios *Bacteria* e *Archaea* nas amostras de solo de maneira independente de cultivo. Os valores de eficiência (E) foram de 0,88 e 0,71 respectivamente, e os valores de regressão logarítmica obtidos na curva padrão ( $R^2$ ) foram de 0,99 para ambas as quantificações. A quantificação de sequências alvo confirmou a abundância semelhante destes dois grupos em todas as áreas analisadas (Figura 4).

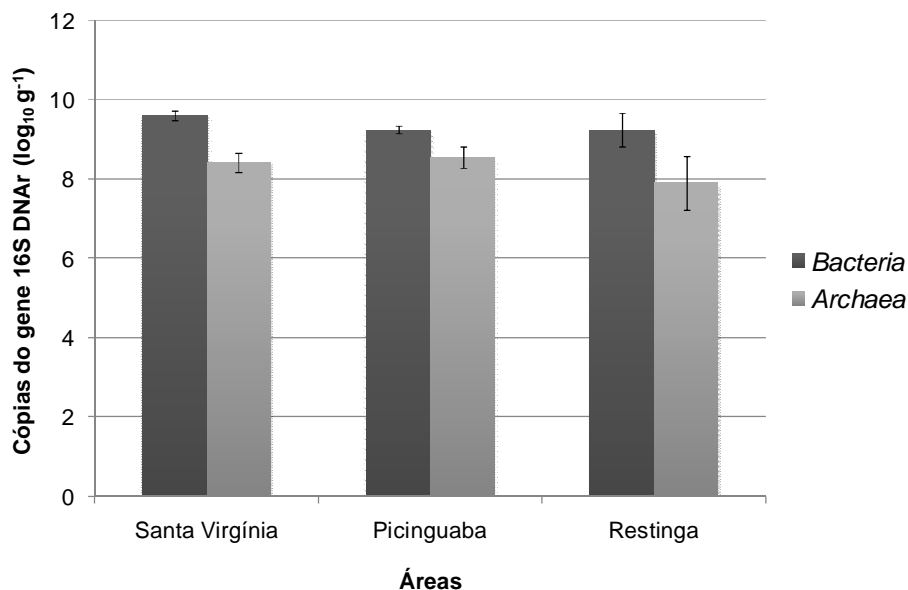


Figura 4 – Densidade das comunidades de bactérias e arqueias em solos das diferentes áreas amostradas. Os valores indicam a média, em Log<sub>10</sub>, de quatro repetições; as barras indicam o erro padrão gerado a partir das repetições

Para o domínio *Bacteria*, os valores variaram entre  $1,84 \cdot 10^9$  e  $4,25 \cdot 10^9$ , observados nas áreas de Picinguaba e Santa Virgínia, respectivamente. Para a área de Restinga, o valor médio foi de  $2,36 \cdot 10^9$ . Estes números estão de acordo com descrições atuais da abundância de microrganismos em amostras de solo; Henry e colaboradores (2006) usaram a quantidade total de genes ribossomais para normalizar a quantidade de genes funcionais em amostras de solo, onde estes autores descrevem uma abundância do gene 16S DNAr de bactérias em valores entre  $10^8$  a  $10^9$  cópias por grama de solo. Adicionalmente, Prosser e Nicol (2008) avaliaram a abundância da comunidade bacteriana sob distintos pHs, obtendo um valor médio de  $10^7$  cópias de *Bacteria*. Dessa forma, acredita-se que na área de desenvolvimento do presente estudo, o solo deva abrigar uma abundante comunidade de bactérias.

Em relação ao grupo das *Archaea*, este se mostrou menos abundante do que as bactérias, com valores entre  $1,43 \cdot 10^8$  e  $4,36 \cdot 10^8$ , observados nas áreas de Restinga e Picinguaba, respectivamente. Na área de Santa Virgínia a quantificação de arqueias revelou um valor médio de  $3 \cdot 10^8$  cópias do gene 16S DNAr por grama de solo. A literatura corrobora com os dados aqui apresentados, indicando uma menor abundância de arqueias do que bactérias em solos florestais. Kemnitz, Kolb e Conrad (2007) amostraram solos ácidos de floresta na Alemanha e verificaram que arqueias apresentaram uma abundância média de  $10^7$  cópias de genes ribossomais por grama de solo, enquanto que a quantificação similar de bactérias chega a  $10^9$  cópias do gene 16S DNAr por grama de solo. O teste de ANOVA mostrou que não existiram diferenças entre as médias das áreas amostradas usando o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Alguns fatores são determinantes na densidade microbiana dos solos, dentre os quais se podem destacar a quantidade de nutrientes no solo e seu manejo. Dentro da temática de solos florestais, a frequente alta quantidade de matéria orgânica deve servir como base para o desenvolvimento de uma densa e complexa comunidade microbiana. Dessa forma, como nas três áreas estudadas a quantidade de matéria orgânica foi alta (entre 56 e 86  $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; Anexo C), acredita-se que, apesar destas comunidades terem a mesma densidade, podem ocorrer diferenças em sua composição devido as variações propiciadas pelo gradiente de altitude existente entre as áreas amostradas. Adicionalmente, pode-se sugerir que este ambiente gerado pela alta quantidade de

matéria orgânica e conhecido como um local de intensa ciclagem de nutrientes (CLEVELAND et al., 2011) sirva como um melhor ambiente de desenvolvimento para as bactérias do que para as arqueias.

Outra forma de avaliar a quantidade de ambos os grupos nas áreas estudadas é por meio da razão obtida entre a abundância de cada grupo. Fazendo tal análise, observa-se que, em média, a menor razão está na área de Picinguaba, onde a quantidade de bactérias é aproximadamente cinco vezes maior do que de arqueias. As demais áreas, de Santa Virgínia e Restinga apresentam maiores valores de razão, com densidades de bactérias, em média, 13 e 18 vezes maior do que a densidade de arqueias, respectivamente (Figura 5). No entanto, apesar destas observações, as variações dentro de uma casa logarítmica, juntamente com o desvio padrão observado, dificultaram inferências sobre as diferenças observadas entre as três áreas estudadas.

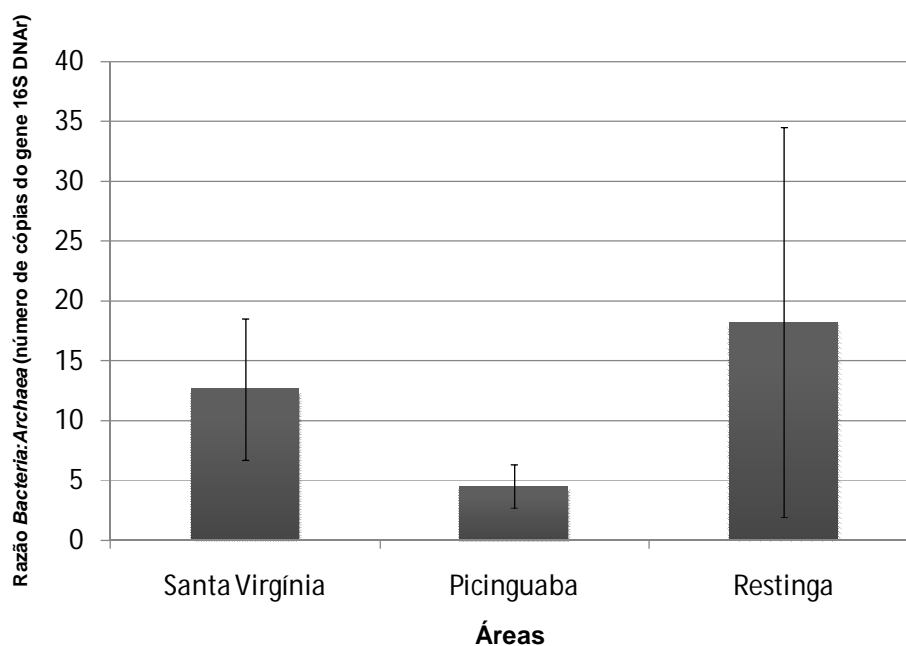


Figura 5 – Razão *Bactéria:Archaea* presentes nos solos das três áreas amostradas na Mata Atlântica. As barras indicam desvio padrão obtidos das quatro repetições

Portanto, neste estudo, a quantificação do gene 16S DNAr foi capaz de indicar que arqueias são menos abundantes do que as bactérias em todas as áreas amostradas, com valores de  $10^9$  cópias do gene 16S DNAr de bactérias por grama de

solo, enquanto que arqueias possuem valores de  $10^8$  cópias deste mesmo gene por grama de solo.

### **2.3.2 Diversidade das comunidades microbianas no solo baseada em PCR-DGGE**

A técnica de PCR-DGGE permitiu uma análise independente de cultivo das comunidades microbiana presentes nos solos da Mata Atlântica. Neste estudo, os perfis de DGGE revelaram alterações nas comunidades de *Bacteria* e *Archaea* nas três áreas amostradas dentro de um gradiente altitudinal (Figura 6).



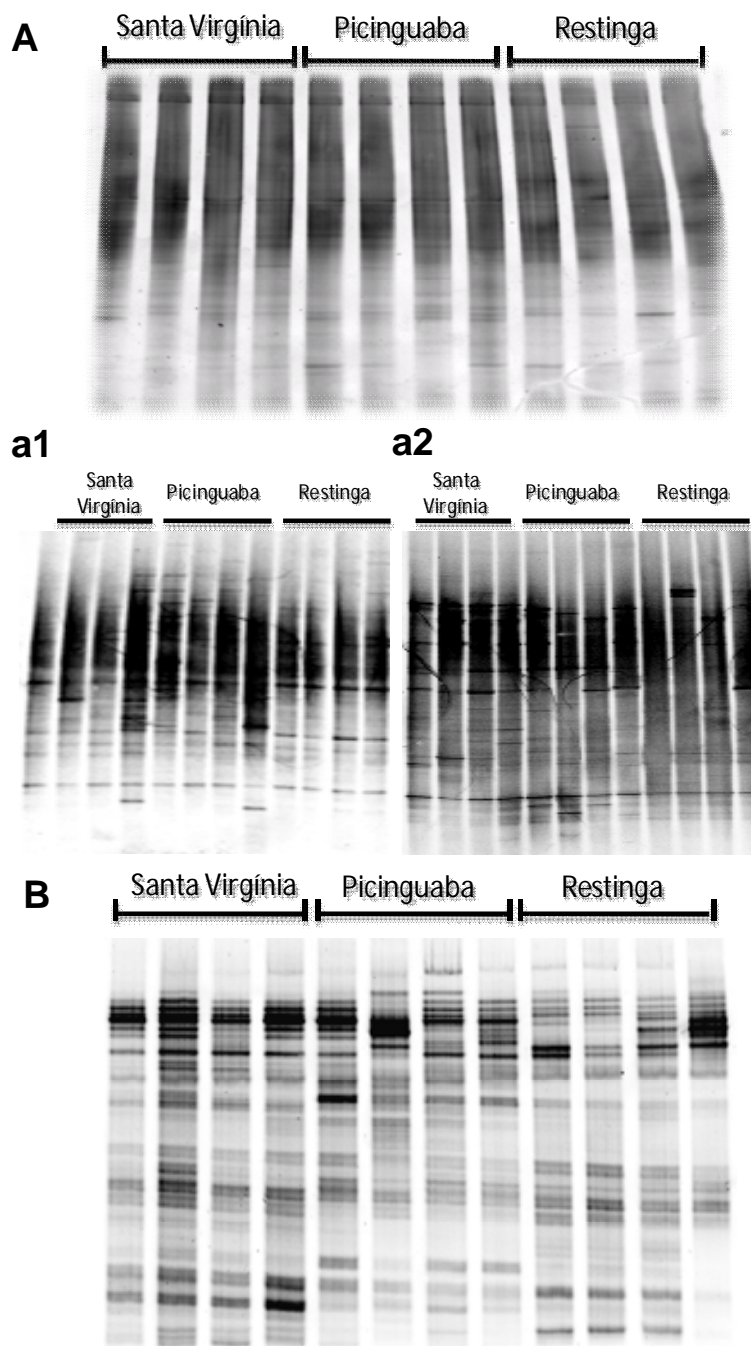


Figura 6 – Através da técnica de PCR-DGGE foi acessado a estrutura das comunidades de bactérias ao longo do gradiente altitudinal da Mata Atlântica (A), bem como das comunidades de  $\alpha$ -proteobacteria (a1),  $\beta$ -proteobacteria (a2) e arqueias (B)

De maneira geral, foi possível observar a ocorrência de padrões complexos, formados por um grande número de bandas em todas as análises realizadas. Apesar da separação visual das amostras e das áreas serem por vezes possível, as inferências sobre as separações foram feitas com base na matriz de presença e ausência gerada

pelos perfis de PCR-DGGE. Inicialmente, tais matrizes foram usadas para análise de *nMDS* (Figura 7), onde as separações foram bastante claras entre as áreas amostradas para os grupos de bactérias (Figura 7A) e arqueias (Figura 7B). Em contrapartida, para as análises dos grupos de *Alphaproteobacteria* e *Betaproteobacteria* as diferenciações entre as áreas não foram possíveis (Figuras 7a1 e 7a2).

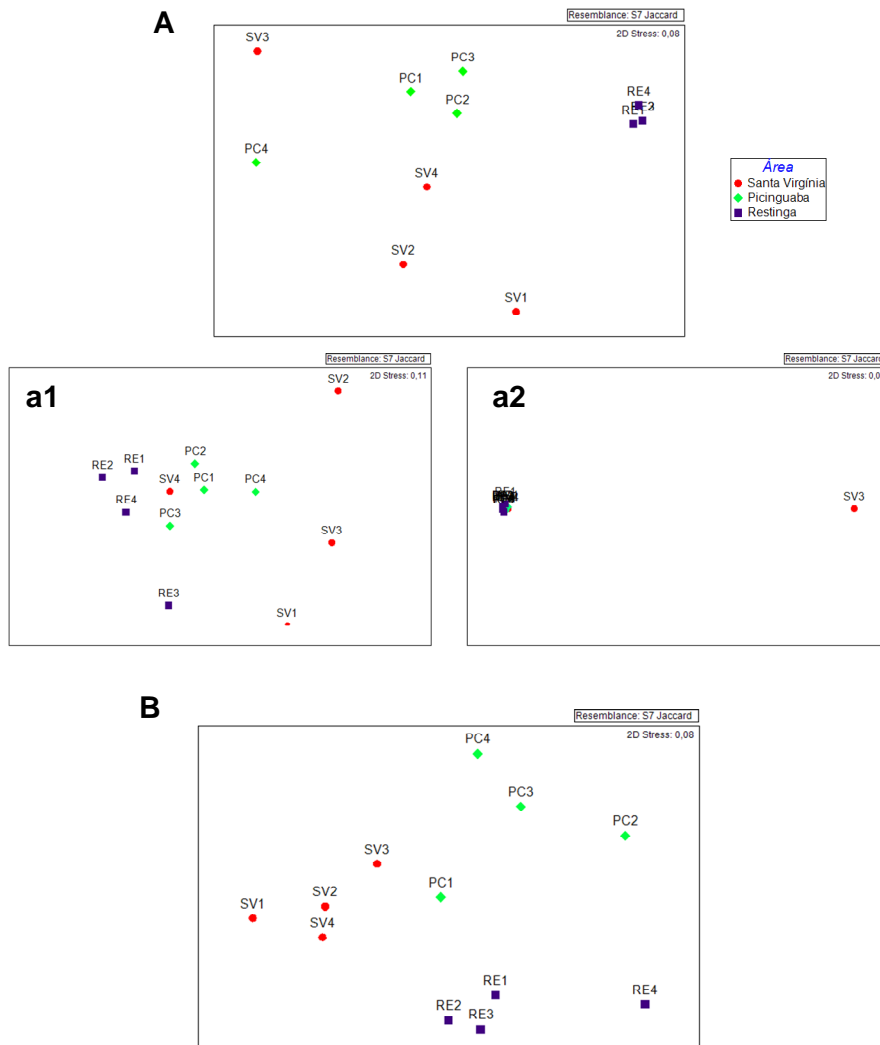


Figura 7 – *nMDS* do domínio *Bacteria* (A), subgrupos  $\alpha$ -*proteobacteria* (a1) e  $\beta$ -*proteobacteria* (a2) e do domínio *Archaea* (B) das diferentes áreas de amostragem do solo, sendo todas calculadas com a matriz de similaridade *Jaccard*

As significâncias estatísticas das separações observadas foram determinadas por meio da análise de ANOSIM (Tabela 1). Esta análise para oPCR-DGGE de *Bacteria* mostrou uma separação significativa para os perfis da área de Restinga em relação aos

demais (valores de  $R=0,802$  e  $0,916$  para Santa Virgínia e Picinguaba, respectivamente). No entanto, já as separações entre Santa Virgínia e Picinguaba foram menos claras ( $R=0,349$ ). Já para a análise com base nos perfis de *Archaea*, as separações foram mais evidentes, diferenciando as três áreas, com valores de  $R$  sempre acima de  $0,5$  (Tabela 1).

Tabela 1 – Análise de ANOSIM efetuada com o coeficiente de similaridade *Jaccard* utilizando a técnica de DGGE

Ambiente	<i>Bacteria</i>	<i>Archaea</i>
<b>Santa Virgínia</b>		
x	0,349	0,729
<b>Picinguaba</b>		
<b>Santa Virgínia</b>		
x	0,802*	0,875*
<b>Restinga</b>		
<b>Picinguaba</b>		
x	0,916*	0,750*
<b>Restinga</b>		

<sup>a</sup>ANOSIM testa a diferença entre amostras. Valores de  $R$  são expressos, todos com  $p<0,05$ . Valores  $>0,75$  são estatisticamente diferentes;  $>0,5$  possuem sobreposição, mas ainda são claramente diferentes; e  $<0,5$  não apresentam diferença estatística.

\*valores de ANOSIM estatisticamente diferentes.

Portanto, esta metodologia mostrou que os solos da área de Restinga detém grupos microbianos de *Bacteria* e *Archaea* distintos daqueles encontrados nas outras áreas estudadas. Somadas as informações obtidas pelo qPCR, pode-se inferir neste ponto, que apesar de tais comunidades possuírem abundâncias similares, os grupos que compõem esta abundância mostram-se diferentes entre as áreas.

### 2.3.3 Determinação dos parâmetros ambientais que determinam a composição das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* nas áreas estudadas

Além das separações entre os perfis, este trabalho visou também identificar as principais variáveis ambientais que regem tais separações, comparando os perfis das comunidades microbianas com as características físicas e químicas do solo, e com a composição da vegetação presente em cada uma das áreas estudadas. Dentro deste objetivo, o teste de Mantel demonstrou uma maior separação das comunidades

microbianas de acordo com a composição de espécies vegetais que ocorrem nas áreas (Anexos A e B). Observando os valores de R para este teste, as correlações entre comunidades microbianas e vegetação obtiveram valores próximos a 0,62 para as correlações entre *Archaea* e gênero ou família de plantas, e 0,64 para a análise de *Bacteria* com os grupos de plantas (Tabela 2). Em contrapartida, os valores para a relação entre as separações das comunidades microbianas com as observadas para atributos químicos e físicos foram de 0,29 e 0,39 para *Bacteria*; e variaram entre 0,29 e 0,58, para a análise de *Archaea*, respectivamente.

Estes resultados corroboram o estudo de Thomson e colaboradores (2010), que demonstraram que a presença de uma comunidade vegetal ativa tem efeito marcante sobre a distribuição dos táxons de bactérias dominantes nos solos. Adicionalmente, é descrita a importância da composição florística da área sobre a composição de comunidades microbianas, de maneira adicional ao papel desempenhado pelas características físico-químicas dos solos (GRIFFITHS et al., 2003, 2006).

Tabela 2 – Valores de R obtidos no Teste de Mantel para a correlação entre as separações microbiológicas e de outros parâmetros das áreas. Diferenças significativas estão destacadas em itálico e negrito, e evidenciam valores de  $R > 0,50$

	<i>Bacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Archaea</i>
<b>Atributos Químicos</b>	0,2938	ND	ND	0,2986
<b>Atributos Físicos</b>	0,3901	ND	ND	<b>0,5789*</b>
<b>Vegetação</b>				
<i>Famílias</i>	<b>0,6415*</b>	0,2341	0,1094	<b>0,6211*</b>
<i>Gêneros</i>	<b>0,6291*</b>	0,1777	0,0750	<b>0,6196*</b>

ND – Não determinado

Pode-se sugerir com base nestes resultados que este papel essencial das plantas na composição da comunidade microbiana esteja relacionado primeiramente com as características de solos de florestas, comumente pobres em nutrientes (SILVA et al., 2007). Adicionalmente, as plantas podem selecionar a comunidade microbiana dos solos de duas maneiras: uma delas é selecionando grupos específicos que atuam na degradação de compostos orgânicos oriundos da incorporação de restos vegetais em tais solos ou via efeito rizosférico, onde compostos específicos oriundos das raízes selecionam grupos capazes de utilizá-los como fonte de nutrientes (GARBEVA; van VEEN; van ELSAS, 2004). Sabe-se que plantas distintas selecionam organismos

distintos para compor suas comunidades rizosféricas, o que foi mostrado em estudos onde mudanças na vegetação levaram à substituição de grupos dominantes em solos de plantações de trigo (SMIT et al., 2001) e pastagem (LIPSON; SCHMIDT, 2004). Adicionalmente, Grayston (1998) mostrou que comunidades específicas de bactérias se reproduzem em genótipos e idades específicos da planta, e que tal modulação se deve a alterações na composição química dos exudados liberados pelas plantas. Germida e colaboradores (1998), além de Kaiser, Puhler e Selbitschkaw (2001), indicaram o papel fundamental na determinação das comunidades bacterianas na rizosfera, enquanto que o tipo de solo desempenha papel menos importante. Usando PCR-DGGE, Kowalchuk e colaboradores (2002) também demonstraram claramente que determinadas comunidades bacterianas parecem ser altamente planta-específicas. No entanto, num ambiente como a Mata atlântica, o que se tem é um efeito rizosférico combinado das plantas que compõem a vegetação da área. Dessa forma, assumindo que esta vegetação tem uma comunidade de plantas diferenciada em cada uma das áreas amostradas neste estudo, espera-se existir em cada uma das áreas comunidades microbianas distintas.

Dessa forma, as frequências de cada uma das famílias de plantas que ocorrem nas áreas estudadas foram determinadas, e a significância de cada uma das famílias foi testada em relação à estruturação da comunidade microbiana por uma análise multivariada de redundância (*RDA*) associada ao teste de Monte Carlo (significância para  $p < 0,05$ ). Este teste gerou dois grupos de plantas para a análise com *Bacteria* (significativas ou não na composição da comunidade), e um grupo de plantas para a análise de *Archaea* (com todas as famílias de plantas sendo significativas na composição desta comunidade) (Figura 8).

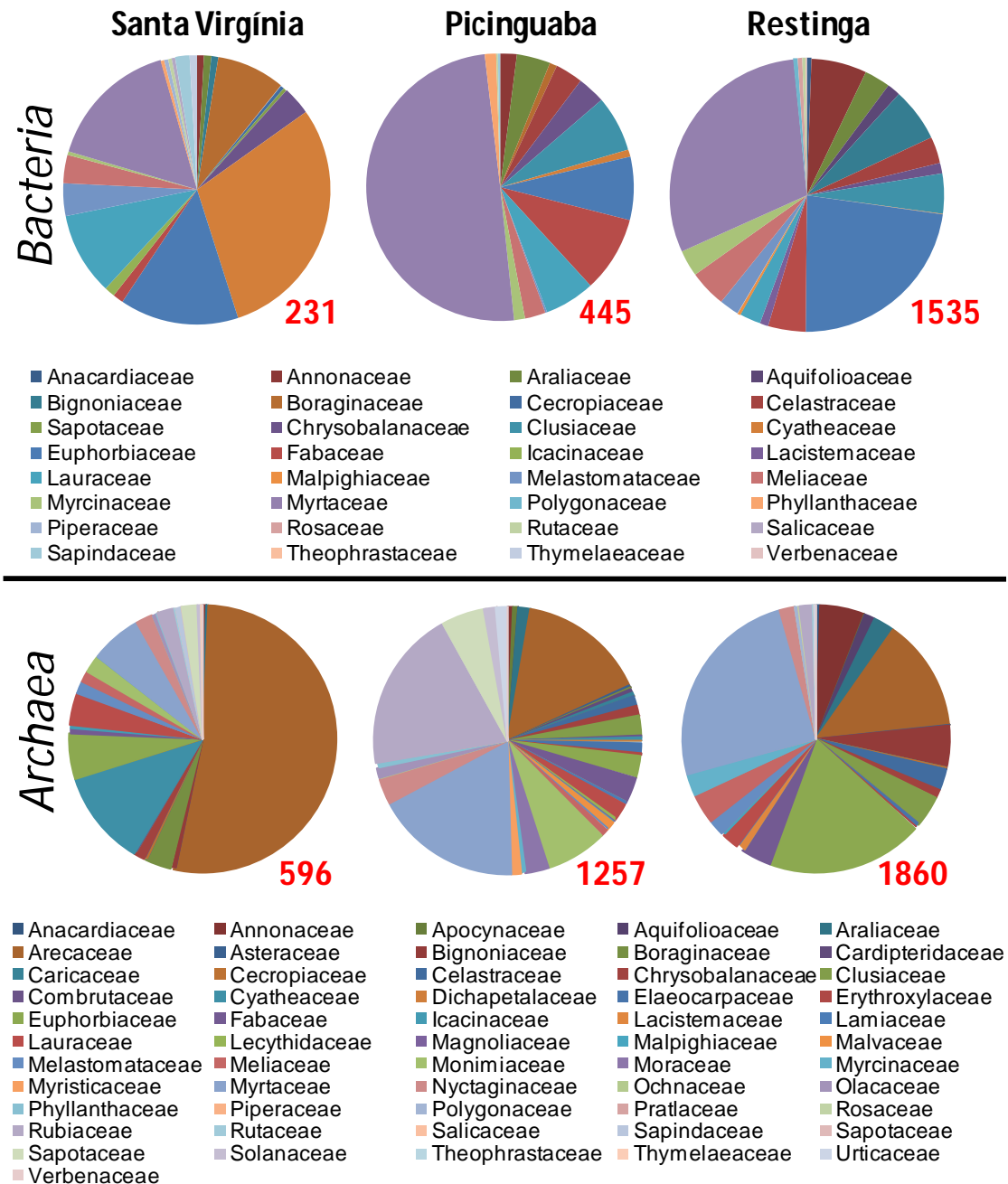


Figura 8 – Os gráficos mostram as famílias das plantas significativas nas três áreas de coleta para *Bacteria* e *Archaea*. Valores em vermelho representam o número de indivíduos de cada área

Dentro das frações que mostraram determinar de forma significativa as comunidades microbianas, as famílias mais abundantes foram Myrtaceae e Euphorbiaceae. No entanto, algumas famílias com baixa abundância de indivíduos nessas áreas também mostraram ser significativas, como por exemplo, as famílias

Cecropiaceaea e Sapotacea. Isto sugere que a capacidade de selecionar grupos específicos microbianos nem sempre está correlacionada com a abundância dos grupos vegetais nas áreas, mas pode estar relacionada a fatores que não puderam ser considerados neste trabalho, como a exuberância de indivíduos destes grupos, e sua dispersão dentro de cada uma das áreas amostrais.

Considerando as diferenças apresentadas nos gráficos da Figura 8, em termos visuais, a composição da vegetação na área de Picinguaba mostra-se mais similar àquela encontrada na área de Restinga, e mais distinta da observada na área de Santa Virgínia.

Dentre os principais fatores que diferenciam tais áreas, talvez o mais importante seja a altitude, sendo as áreas de Picinguaba e Restinga localizadas mais próximas ao nível do mar, enquanto que a área de Santa Virgínia está localizada a aproximadamente 1.000 metros de altitude. Dessa forma, uma vez que alterações na altitude remetem diretamente a alterações em outras condições climáticas, com destaque para a temperatura, pode-se sugerir que esta tenha papel fundamental na composição de espécies vegetais dentro de cada uma das áreas.

Correlacionando este resultado com os obtidos por outras metodologias, pode-se sugerir que a regência da composição das comunidades microbianas tenham dois parâmetros principais: a composição dos solos e a fisionomia vegetal de cada uma das áreas. Enquanto que as similaridades entre os solos é maior entre as áreas de Santa Virgínia e Picinguaba, a paisagem parece ser mais semelhante entre as áreas de Picinguaba e Restinga. Dessa forma, a correta estimativa de como estes parâmetros determinam a composição das comunidades microbianas de forma independente e combinatória, está ainda para ser determinado.

No entanto, sabe-se que grupos de plantas e microrganismos podem ocorrer de maneira diferencial em áreas de Mata Atlântica que por vezes são consideradas como homogêneas. Dessa forma, estes resultados demonstram a importância da preservação de um bioma por completo, evitando ao máximo a fragmentação da floresta, uma vez que padrões de paisagens florestais são determinantes também para a composição e a biodiversidade de comunidades microbianas. Desta forma, a retirada de partes

específicas deste bioma pode resultar numa progressiva erosão da diversidade biológica contida em seu solo (TILMAN et al., 1994).

Contextualizando, a análise da diversidade das comunidades microbianas através deste método independente de cultivo é importante para que se conheçam os verdadeiros componentes deste recurso genético microbiano encontrado em tal ambiente.

### **2.3.3.1 Análise taxonômica dos grupos de *Bacteria* e *Archaea* presentes em solos de Mata Atlântica**

Com o objetivo de confirmar a diferenciação entre as comunidades microbianas entre as áreas, foi realizado o pirosequenciamento da região V4 do gene 16S DNAr de duas amostras de cada uma das três áreas de estudo. Um total de 32.221 sequências foram classificadas usando o *RDP Classifier*, sendo que 25.610 sequências foram atribuídas a *Bacteria* e 6.611 sequências a *Archaea*.

Dentro deste total, porcentagens de 15,2 e 58,0% foram atribuídas como bactérias e arqueias não classificadas, respectivamente. Mais detalhadamente, este grupo foi composto nas amostras de Santa Virgínia, Picinguaba e Restinga em 16,1%, 14,3% e 15,6% de sequências de bactérias, respectivamente; enquanto que para arqueias, os valores para cada uma das áreas foram de 53,5%, 61% e 59,5%, respectivamente.

#### **2.3.3.1.1 Grupos de *Bacteria* que ocorrem em solos de Mata Atlântica**

A composição das comunidades bacterianas foi caracterizada pela classificação taxonômica das sequências (Figura 9), onde foram encontrados sequências afiliados a 29 filos bacterianos, sendo a maior parte da comunidade pertencente ao filo *Acidobacteria* (média de 55,9%). Este filo está presente em todas as amostras e sua dominância nos solos de Mata Atlântica estudados corrobora com a literatura, que mostra que ambientes como 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). Neste trabalho, além do filo



*Acidobacteria*, outros grupos foram abundantes, sendo eles o filo *Proteobacteria* (com média de 13,6%) e *Verrucomicrobia* (valor médio de 12% de sequências afiliadas) (Figura 9).

Além da descrição dos grupos mais abundantes, esta afiliação taxonômica permitiu observar diferenças entre as áreas estudadas. Sequências do filo *Acidobacteria* são as que estão em maior quantidade no solo das três áreas amostradas; no entanto, nas amostras de Picinguaba (50 a 100 m de altitude) elas representam 58,4%, enquanto que na área de Restinga estas ocorrem em uma menor frequência (53,7%) (Figura 9B). Estes valores são condizentes com a literatura, que descreve a frequência deste filo oscilando nos solos em valores entre 20% e 60%, dependendo das condições em que o solo se encontra (DUNBAR et al., 2002). Dentro do filo *Acidobacteria*, vinte subgrupos foram identificados, sendo os subgrupos *Gp1* e *Gp2* os mais frequentes, representando mais de 70% das sequências classificadas como *Acidobacteria*. Visualmente, os gráficos (Figura 9B) mostram a maior frequência de tais grupos na área de Restinga. Bruce e colaboradores (2010) fizeram um estudo similar em solos de Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro, descrevendo a abundância de *Acidobacteria* em tais solos. Atualmente, este filo é dividido em 26 classes, porém pouco se sabe sobre as capacidades fisiológicas e metabólicas destes subgrupos nos solos (BARNES et al., 2007). Pode-se inferir, no entanto, que devido a sua grande abundância, tais organismos possuam funções essenciais na manutenção do funcionamento do complexo sistema solo. Alguns trabalhos reportaram a importância destes microrganismos na degradação de polímeros derivados de plantas em áreas úmidas, ácidas e oligotróficas (DEDYSH, 2011). Adicionalmente, Ward e colaboradores (2009) sugerem que as *Acidobacteria* atuam na degradação de plantas, fungos, insetos e derivados da matéria orgânica. Genomas de bactérias pertencentes a este filo foram sequenciados, onde foram encontrados genes que codificam  $\beta$ -glicosidades, o que reforça a possibilidade da alta abundância de tais organismos no solo estar relacionada à sua capacidade na obtenção de nutrientes a partir da degradação de compostos orgânicos (EICHORST et al., 2011; PANKRATOV et al., 2011).

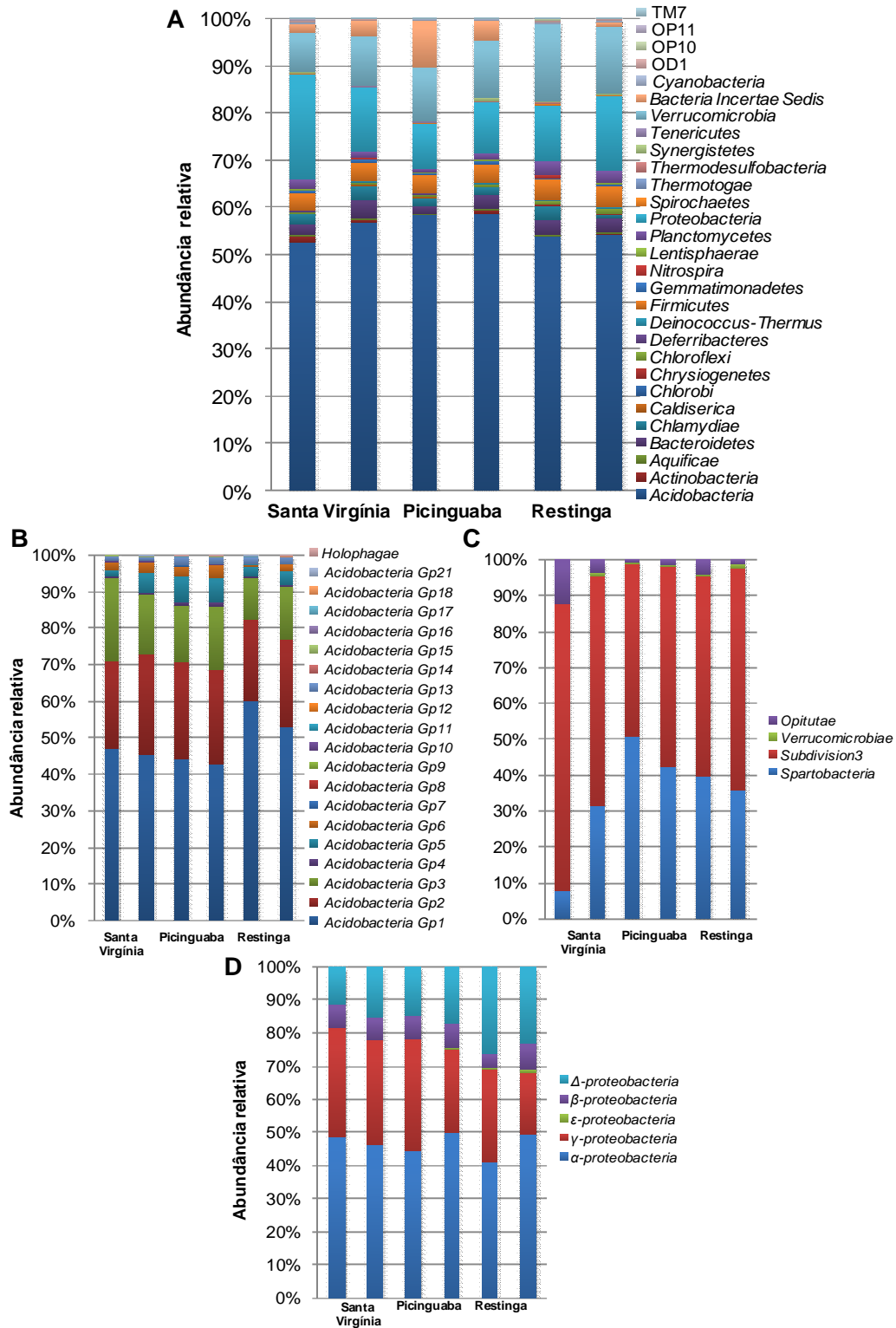


Figura 9 – Distribuição de *Bacteria* ao nível taxonômico de Filo (A); Classes dentro do filo *Acidobacteria* (B); Classes dentro do filo *Verrucomicrobia* (C) e classes dentro do filo *Proteobacteria* (D)

Na Mata Atlântica, o solo geralmente possui pH ácido, é sempre úmido e extremamente pobre, recebendo pouca luz devido à absorção dos raios solares pelo estrato arbóreo (SILVA et al., 2007). A umidade e a presença de grande quantidade de matéria orgânica tornam o solo favorável à ação de microrganismos decompositores que possibilitam o aproveitamento dos nutrientes e sais minerais. Esta combinação de fatores, pode portanto, dar origem ao ambiente ideal para o desenvolvimento de bactérias pertencentes ao filo *Acidobacteria*.

O segundo filo mais abundante foi *Proteobacteria* (17,4; 10,5 e 14% das sequências em Santa Virgínia, Picinguaba e Restinga, respectivamente). A classe predominante dentro deste filo foi a *Alphaproteobacteria*, representando em média 47,1% das sequências de *Proteobacteria* (Figura 9D). Esta classe é bem diversa, onde se aloca grupos microbianos com importantes funções biológicas, como patógenos e simbioses de plantas e animais (BATUT; ANDERSSON; CALLAGHAN, 2004). A alta incidência de sequências afiliadas a este grupo bacteriano foi reportada no solo, em análises similares por pirosequenciamento (WILL et al., 2010; NACKE et al., 2011). Adicionalmente, Axelrod e colaboradores (2002) descreveram *Alphaproteobacteria* como um grupo abundante em camadas superiores do solo, relacionando sua abundância com a quantidade de matéria orgânica existente nessas camadas.

Outras classes com grande abundância nos solos analisados foram *Gammaproteobacteria* e *Deltaproteobacteria*. Os valores médios para a frequência de sequências afiliadas a estes grupos foram de 28,1% e 17,5%, respectivamente. A ampla distribuição de organismos pertencentes a *Gammaproteobacteria* em solos foi previamente descrita (THOMSON et al., 2010) (Figura 9D). No entanto, este estudo mostra de maneira pioneira a ocorrência diferencial de sequências afiliadas ao grupo *Deltaproteobacteria* em solos de Mata Atlântica. Uma possível explicação para esta diferença é a maior taxa de umidade na área de Restinga, que é frequentemente inundada pelo mar, o que pode aumentar a ocorrência de anaerobiose em tais solos, favorecendo o grupo de bactérias anaeróbicas, como as *Deltaproteobacteria*. Tais organismos mostraram-se os mais abundantes em estudos de solos de manguezais, onde a condição de anaerobiose é predominante (ANDREOTE et al., 2011; *in press*)

O terceiro filo que foi mais abundante nas áreas foi *Verrucomicrobia*, com 12% das sequências de bactérias. Este filo está presente em comunidades microbianas do solo, água doce e marinha; e recentemente encontrados como extremófilos acidófilos em fontes termais (LEE et al., 2009) (Figura 9C). A ordem *Subdivision 3* de *Verrucomicrobia* foi a mais abundante nas amostras de solo, sendo que organismos pertencentes a esta ordem ainda não foram caracterizados (BIRKELAND et al., 2007). De maneira mais geral, num estudo de comunidades microbianas no solo, algumas colônias desenvolvidas em meios de cultura enriquecidos com carboidratos foram identificadas como compostas por células de organismos membros deste grupo (SANGWAN et al., 2005). Outro grupo de destaque dentro deste filo foi a classe *Spartobacteria* que representou 4,5% do total de sequências de bactérias e mostrou ser similar à frequência encontrada por Janssen (2006) que obtiveram de 4 a 9% deste grupo nos solos estudados por eles.

Estudos anteriores com o solo da Mata Atlântica mostraram diferenças interessantes relacionada com o grupo *Verrucomicrobia*. Faoro e colaboradores (2010) utilizaram amostras de solo da Mata Atlântica localizada no estado do Paraná e verificaram a ausência de sequências deste grupo. Adicionalmente, Bruce e colaboradores (2010) coletaram solo do mesmo bioma no Rio de Janeiro e identificaram valores entre 0,6 a 14% das sequências afiliadas a este grupo. Nas nossas amostras, que foram coletadas na área em São Paulo, obtivemos em média 12% de sequências de *Verrucomicrobia*. Sendo assim, estes resultados mostram que apesar de todas as áreas estudadas fazerem parte do mesmo bioma, a diversidade microbiana do solo pode variar biogeograficamente, levando a crer que este cenário está apenas começando a revelar o extraordinário reservatório inexplorado da biodiversidade bacteriana.

O restante das sequências foram atribuídas aos filos *Firmicutes* (4%), *Bacteria Incertae Sedis* (3,8%), *Bacteroidetes* (2,8%), *Chlamydiaea* (2,1%), *Planctomycetes* (1,8%), *Actinobacteria* (0,8%), *Chloroflexi* (0,7%), *Gemmatimonadetes* (0,6%), OD1 (0,3%) e *Synergistetes* (0,2%). Menos de 1,4% do total das sequências pertencem a outros grupos taxonômicos como *Nitrospira*, *Spirochaetes*, TM7, *Cyanobacteria*, *Aquificae*, *Deferribacteres*, OP10, *Deinococcus-Thermus*, *Chrysiogenetes*, *Caldiserica*,

*Chlorobi*, *Lentisphaerae*, *Thermodesulfobacteria*, *Thermotogae*, *Tenericutes* e OP11 (Figura 9A).

Vale destacar que as análises feitas com base na taxonomia das sequências condizem com os resultados previamente observado pela metodologia de PCR-DGGE, separando de forma um pouco mais clara a comunidade bacteriana encontrada na área de Restinga, e mostrando uma maior similaridade entre as comunidades deste grupo existentes nos solos de Santa Virgínia e Picinguaba.

#### **2.3.3.1.2 Grupos de *Archaea* que ocorrem em solos de Mata Atlântica**

Uma análise similar foi feita para as sequências afiliadas dentro do domínio *Archaea*. Os filos que foram encontrados representantes desta comunidade foram *Crenarchaeota* (média de 84%) e *Euryarchaeota* (média de 16%) (Figura 10A). Os valores de frequência de ocorrência de tais filos foram similares dentro das três áreas estudadas.

*Crenarchaeota* é um filo composto por organismos amplamente distribuídos em ambientes marinhos e terrestres (HERSHBERGER et al., 1996), o que o faz também bastante diverso filogeneticamente, incluindo microrganismos halofílicos e termofílicos (PESARO; WIDMER, 2002). Tem sido mostrado que estes microrganismos são os mais abundantes em ecossistemas terrestres (DeLONG, 1998), sendo os solos tipicamente dominados por alguns grupos deste filo (AUGUET et al., 2009), contendo membros possivelmente responsáveis pelo processo de nitrificação no solo (LEININGER et al., 2006; NICOL; SCHLEPER, 2006). Recentemente, foi proposto um desmembramento deste grupo, dando origem ao filo chamado *Thaumarchaeota*, caracterizado por englobar as arqueias amônio-oxidantes (SPANG et al., 2010). No entanto, a classificação usada neste trabalho ainda não usa a separação destes filos, o que limita a nossa inferência sobre a ocorrência de tais grupos nos solos estudados.

Os microrganismos do filo *Crenarchaeota* não-termofílicos estão presentes em muitos tipos de solos e rizosferas de plantas (OLINE; SCHMIDT; GRANT, 2006). Num estudo recente, Sliwinski e Goodman (2004) detectaram este grupo como o mais abundante em solos de 13 diferentes gêneros de plantas coletadas em seus habitats

naturais, incluindo pastagem, pradaria, solos agrícolas e florestais, todos localizados em regiões de clima temperado.

Todas as sequências classificadas como *Crenarchaeota* no presente estudo foram filiadas à classe *Thermoprotei* (Figura 10C). Apesar de muitos microrganismos desta classe serem encontrados em ambientes extremos (WOESE et al., 1990), foi relatado a presença destes em água doce e em sedimentos de lago (SCHLEPER; HOLBEN; KLENK, 1997; SCHLEPER; JURGENS; JONUSCHEIT, 2005). O metabolismo de tais organismos e suas possíveis funções no solo permanecem ainda sem serem descritas (SCHLEPER; JURGENS; JONUSCHEIT, 2005).

As ordens que compuseram essa única classe foram *Thermoproteales*, *Desulfurococcales*, *Acidilobales* e *Sulfolobales*. Dentre eles, *Thermoproteales* apresentou mais sequências (40%), seguido de *Desulfurococcales* (28%), *Acidilobales* (18%) e *Sulfolobales* (14%) (Figura 10C).

As sequências pertencentes ao filo *Euryarchaeota* representaram cerca de 16% das afiliadas a *Archaea*. Comumente esta representatividade baixa é encontrada em ambientes como manguezais (YAN; HONG; YU, 2006) e solos de floresta (KEMNITZ; CONRAD; KOLB, 2007). Este filo é composto por microrganismos halófilos extremos ou metanogênicos (WOESE et al., 1990), que são fundamentais na degradação anaeróbica de material orgânico resultando em metano (LUTON et al., 2002). Dentro deste filo, a classe *Halobacteria* foi a mais abundante (39,4%). As outras classes presentes em menor quantidade nos solos foram *Thermoplasmata* (28,9%), *Methanomicrobia* (16,5%), *Methanococci* (10,3%), *Methanobacteria* (4%) e *Methanopyri* (0,9%) (Figura 10B).

Em relação às separações entre as áreas, não foi possível estabelecer com base na ocorrência de grupos de *Archaea*, a mesma correlação feita com *Bacteria*. Neste caso, as separações entre as áreas não foram tão claras apenas comparando a afiliação taxonômica dos grupos de *Archaea*, mas pode ser de mais fácil observação numa análise com base na separação de tais sequências em UTOs.

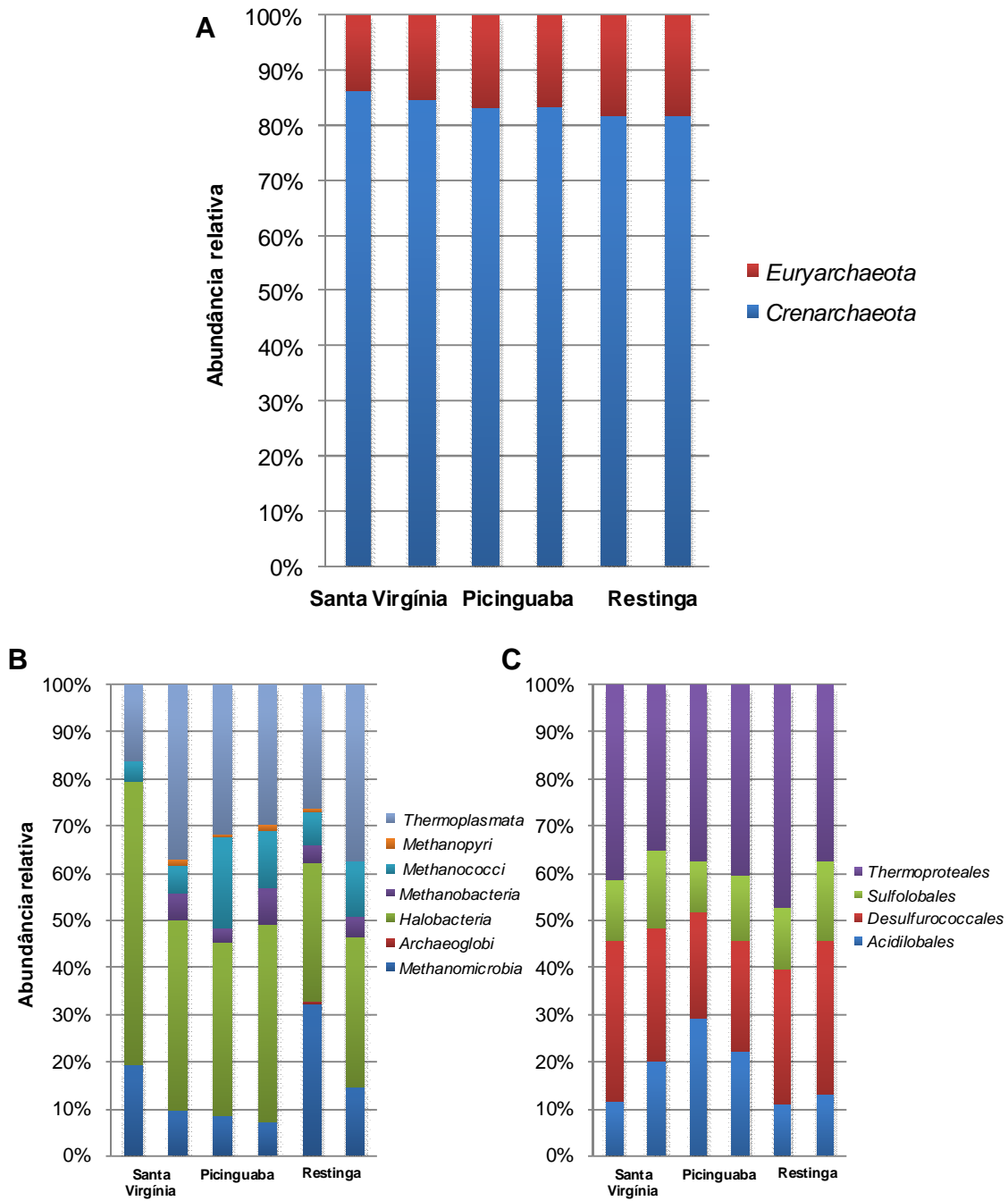


Figura 10 – Distribuição de *Archaea* avaliada a nível taxonômico de Filo (A); Filo *Euryarchaeota* e suas classes (B); Filo *Crenarchaeota*, classe *Thermoprotei* e suas ordens (C)

### 2.3.3.1.3 Análise das comunidades microbianas em solo de Mata Atlântica baseada em UTOs

Com base na boa repetibilidade das amostras de cada área, foram construídos pelo *RDP (Ribosomal Data Project)* através do *RDP Pyrosequencing Pipeline* (<http://pyro.cme.msu.edu/>) três *datasets* de *Bacteria* e três *datasets* para *Archaea*, sendo que cada *dataset* corresponde a uma área de coleta (Santa Virgínia, Picinguaba e Restinga). Portanto, para as análises baseadas em UTOs foram obtidas 3 matrizes de distância com os dados unificados das duas repetições de cada área.

As complexidades das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* foram calculadas pelos índices de Chao1, Shannon (Tabela 3) e pelas curvas de rarefação, usando para tanto a formação de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) com base numa distância máxima de agrupamento de 0,03 (Figura 11).

O índice de riqueza de Chao1 mostrou valores para as comunidades bacterianas de 3.280, 3.088 e 2.966, enquanto que os valores obtidos para as comunidades de arqueias foram 401, 406 e 382 nas áreas de Santa Virgínia, Picinguaba e Restinga, respectivamente (Tabela 3). O índice de Shannon calculado para cada uma das amostras mostrou valores similares para arqueias, variando entre 4,73 e 4,82, enquanto que para bactérias, um maior valor foi encontrado para a área de Santa Virgínia ( $H' = 6,31$ ) quando comparado as outras duas áreas de estudo (Tabela 3). 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 cobrem valores entre 95,7 e 96,4% da diversidade de arqueias, e valores entre 89,2 e 91,8% da diversidade de bactérias encontradas nas áreas estudadas. 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 (WILL et al., 2010; NACKE et al., 2011), enquanto que estudos que usam o método tradicional de clonagem e sequenciamento de genes de interesse dificilmente atingem altos valores de cobertura (HANSEL et al., 2008; ANDREOTE et al., 2009).



Tabela 3 – Estimativa de riqueza de UTOs e índice de diversidade calculados a partir da análise de sequências geradas pela técnica de pirosequenciamento no *software* MOTHUR 1.8.1

Domínio	Área	NS <sup>a</sup>	NU <sup>b</sup>	Estimativa de	Índice de	ICE (%) <sup>c</sup>
				riqueza de UTOs	diversidade	
				Chao1	Shannon ( <i>H'</i> )	
<i>Archaea</i>	Santa Virgínia	2.229	257	401 (340-505)	4,82 (4,78-4,87)	96,1
	Picinguaba	2.286	251	406 (337-530)	4,82 (4,78-4,86)	96,4
	Restinga	2.096	266	382 (334-462)	4,73 (4,68-4,78)	95,7
<i>Bacteria</i>	Santa Virgínia	7.945	1.586	3.280 (2.976-3.651)	6,31 (6,28-6,35)	89,5
	Picinguaba	10.243	1.528	3.088 (2.811-3.424)	5,88 (5,85-5,92)	91,8
	Restinga	7.422	1.448	2.966 (2.692-3.301)	5,97 (5,93-6,01)	89,2

Para identificação de UTOs utilizou-se  $D = 0,03$ ;

<sup>a</sup>Número de sequências;

<sup>b</sup>Número de UTOs determinado pelo MOTHUR 1.8.1;

<sup>c</sup>Índice de cobertura estimada

A grande cobertura que os dados apresentam sobre a diversidade microbiana presente nas áreas pode também ser observada por meio das curvas de rarefação, onde se verifica que as amostras estão próximas de alcançar sua assíntota, demonstrando que o esforço amostral foi satisfatório. Adicionalmente, não se observa grande diferença entre as curvas de rarefação das diferentes áreas estudadas, evidenciando a ocorrência de comunidades similares quanto aos valores de riqueza e diversidade.

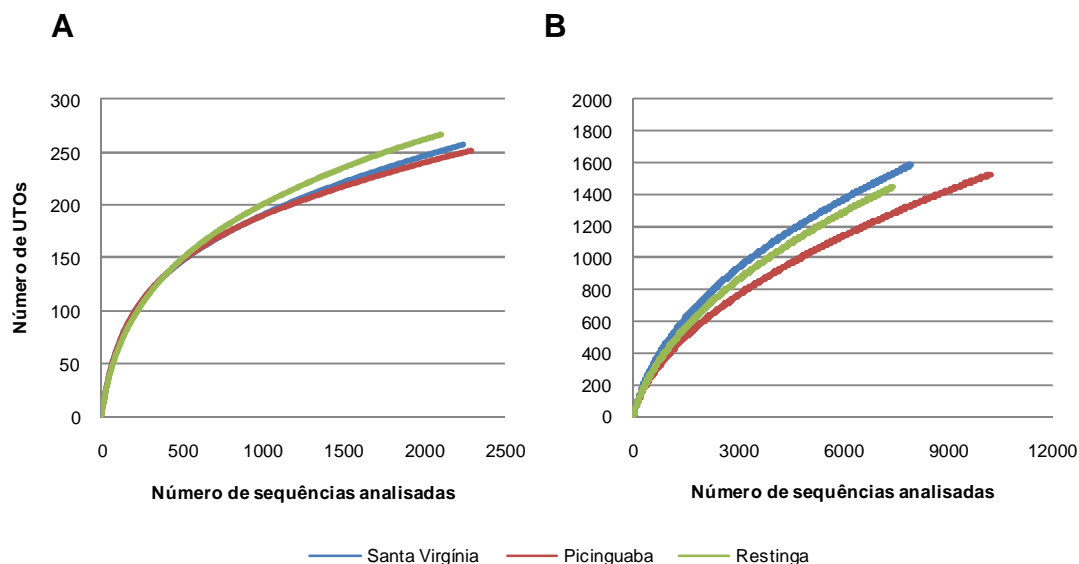


Figura 11 – Curvas de rarefação de *Archaea* (A) e *Bacteria* (B) indicando o número estimado de UTOs obtidos pelo pirosequenciamento do gene 16S DNAr do solo das três diferentes áreas da Mata Atlântica

Com o intuito de verificar a ocorrência diferencial de sequências dentro de cada área amostrada, foram construídos diagramas de Venn (FAUTH et al., 1996), o que evidenciou as intersecções e peculiaridades entre os ambientes, identificando o número de UTOs exclusivas e compartilhadas entre Santa Virgínia, Picinguaba e Restinga (Figura 12).

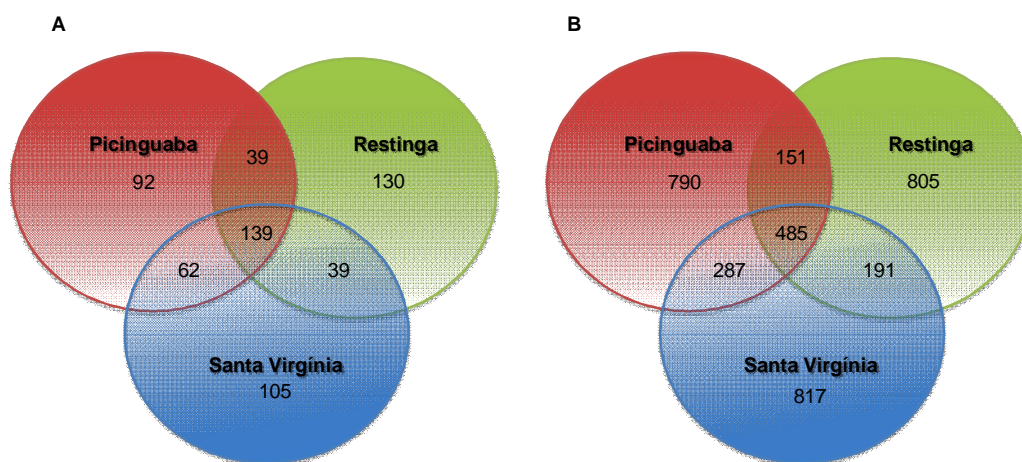


Figura 12 – Diagramas de Venn com a distribuição das UTOs de *Archaea* (A) e *Bacteria* (B) nas diferentes áreas de Mata Atlântica

Inicialmente, detecta-se a presença de um *core* microbiano, composto por grupos de arqueias e bactérias que ocorrem em todas as áreas amostradas. Este grupo é composto de 139 UTOs de *Archaea* e 485 UTOs de *Bacteria* (Figura 12). Além deste *core*, observa-se a ocorrência de UTOs que são verificadas apenas em duas das três áreas, ou então exclusivamente em uma das áreas estudadas. Dentre estes três grupos, observa-se uma tendência diferencial entre os grupos de *Archaea* e *Bacteria*; enquanto que para *Archaea*, o maior número de UTOs é encontrado na parte comum às três áreas (139 UTOs); para o grupo das bactérias, os maiores valores são encontrados como exclusivos de cada área (entre 790 e 817 UTOs). Isto pode indicar que a diferenciação entre as áreas estudadas seja mais acentuada para a comunidade bacteriana do que para a comunidade de *Archaea*.

Destaca-se de toda esta análise com base em UTOs, sua complementaridade com as demais análises realizadas. Enquanto o qPCR determinou que a abundância de *Bacteria* e *Archaea* são semelhantes entre as áreas, os valores similares de diversidade e riqueza mostram que as áreas atuam de forma parecida sobre a ecologia dos microrganismos que habitam estes solos; similarmente, enquanto que o DGGE mostra diferenças nas composições entre as áreas, as análises por Venn evidenciam a ocorrência diferencial de grupos específicos de *Archaea* e *Bacteria* em cada uma das áreas acessadas.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho acessou de maneira extensa e inovadora a diversidade microbiana existente em solos de Mata Atlântica no estado de São Paulo. Ao longo de seu desenvolvimento, foi possível gerar bases sólidas para importantes inferências sobre a composição de tais comunidades, como:

- foi determinado por meio da quantificação por PCR em tempo real, com base no gene 16S DNAr, que *Archaea* são menos abundantes do que *Bacteria* em todas as áreas amostradas; com valores de  $10^9$  cópias do gene 16S DNAr de bactérias por grama de solo, enquanto que arqueias possuem valores de  $10^8$  cópias deste mesmo gene por grama de solo;
- a comunidade de *Archaea* mostrou-se mais responsiva, com base nos perfis de DGGE, do que a comunidade de *Bacteria*, em relação a sua estruturação num gradiente altitudinal;
- dentre os fatores características do solo e composição florística, este último mostrou uma maior correlação pelo teste de Mantel, com a composição das comunidades de *Archaea* e *Bacteria* das áreas estudadas;
- o filo *Acidobacteria* mostrou ser o mais frequente nos solos analisados, com destaque para os grupos *Gp1* e *Gp2*;
- dentro do domínio *Archaea*, foi verificada uma maior frequência de sequências pertencentes ao filo *Crenarchaeota*;
- as análises ecológicas permitiram inferir de maneira robusta sobre tais comunidades, validando as inferências feitas com base em outras metodologias, e indicando a ocorrência diferencial de tais comunidades dentre as áreas acessadas.

Com base em tais conclusões, tem-se como principal mensagem deste trabalho, a ocorrência diferencial das comunidades microbianas dentro de uma área por vezes considerada como homogênea. Com isto, este trabalho demonstra que a fragmentação deste bioma gera diretamente perdas genéticas importantes de recursos genéticos resultantes da evolução microbiana desenvolvida dentro deste ecossistema.



## REFERÊNCIAS

- ACOSTA-MARTÍNEZ, V.; DOWD, S.; SUN, Y.; ALLEN, V. Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 2762–2770, 2008.
- ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, p. 417-432, 2009.
- ANDREOTE, F.D.; CARNEIRO, R.T.; SALLES, J.F.; MARCON, J.; LABATE, C.A.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Culture-independent assessment of rhizobiales-related Alphaproteobacteria and the diversity of *Methylobacterium* in the rhizosphere and rhizoplane of transgenic Eucalyptus. **Plant Microbe Interactions**, Kerala, v. 57, p. 82-93, 2009.
- ANDREOTE, F.D.; JIMENEZ, D.J.; CHAVES, D.; DIAS, A.C.F.; LUVIZZOTTO, D.M.; DINI-ANDREOTE, F.; FASANELLA, C.C.; BAENA, S.; TAKETANI, R.G.; MELO, D.I. The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. **The ISME Journal**, New York, 2011. In press.
- ANDREOTE, F.D.; ROCHA, U.N.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; VAN OVERBEEK, L.S. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen v. 97, p. 389-399, 2010.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. Redwood: Benjamin/Cummings, 1998. 694 p. (Publication, 4).
- AUGUET, J-C.; BARBERAN, A.; CASAMAYOR, E.O. Global ecological patterns in uncultured archaea. **ISME Journal**, New York, v. 4, p. 182–190, 2009.
- AXELROOD, P.E.; CHOW, M.L.; RADOMSKI, C.C.; McDERMOTT, J.M.; DAVIES, J. Molecular characterization of bacterial diversity from British Columbia forest soils subjected to disturbance. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, p. 655–674, 2002.
- AYRES, E.; STELTZER, H.; BERG, S.; WALLENSTEIN, M.D.; SIMMONS, B.L.; WALL, D.H. Tree species traits influence soil physical, chemical, and biological properties in high elevation forests. **PloS One**, Oxford, v. 4, n. 6, p. e5964, 2009.
- BARNS, S.; CAIN, E.; SOMMERVILLE, L.; KUSKE, C. Acidobacteria phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 3113–3116, 2007.

BATES, S.T.; BERG-LYONS, D.; CAPORASO, J.G.; WALTERS, W.A.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. **The ISME Journal**, New York, v. 5, n. 5, p. 908-917, 2011.

BATUT, J.; ANDERSSON, S.G.; O'CALLAGHAN, D. The evolution of chronic infection strategies in the alpha-proteobacteria. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, p. 933-945, 2004.

BERTRAND, H.; NALIN, R.; BALLI, R.; CLEYET-MAREL, J.C. Isolation and identification of the most efficient plant growth promoting bacteria associated with canola (*Brassica napus*). **Biology and Fertility of Soils**, Firenze, v. 33, p. 152-56, 2001.

BEVER, J.D.; WESTOVER, K.M.; ANTONOVICS, J. Incorporating the soil community into plant population dynamics: the utility of the feedback approach. **Journal of Ecology**, London, v. 85, n. 5, p. 561-573, 1997.

BIAVATTI, M.W.; MARENSI, V.; LEITE, S.N.; REIS, A. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential comeceutic species from Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, João Pessoa, v. 17, n. 4, p. 640-653, 2007.

BIRKELAND, N.; ISLAM, T.; JENSEN, S.; REIGSTAD, L.J.; LARSEN, O. Methane oxidation at 55°C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the Verrucomicrobia phylum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 105, n. 1, p. 300-304, 2008.

BRANNSTON, C. Conservation-with-development models in Brazil's agro- pastoral landscapes. **World Development**, Montreal, v. 29, n. 8, p. 1345-1359, 2001.

BROWN, K.S.; BROWN, G.G. Habitat alteration and species loss in Brazilian forests. In: WHITMORE, T.C.; SLAYER, J.A. **Tropical deforestation and species extinction**. London: Chapman and Hall, 1992. p. 129-142.

BRUCE, T.; MATINEZ, I.B.; MAIA NETO, O.; VICENTE, A.C.P.; KRUGER, R.H.; THOMPSON, F.L. Bacterial community diversity in the Brazilian Atlantic Forest Soils. **Microbial Ecology**, Cambridge, v. 60, n. 4, p. 840-849, 2010.

CAMPANILI, M.; WIGOLD, B.S. **Mata Atlântica: patrimônio nacional dos brasileiros**. Brasília: MMA, 2010. 408 p. (Biodiversidade, 34).

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

CHO, J.C.; TIEDJE, J.M. Biogeography and degree of endemism of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 5448-5456, 2000.

CLARKE, K.R.; GORLEY, R.N. **Primer 5:0 User Manual/Tutorial**. PRIMER-E, Plymouth, 2001.

CLEVELAND, C.C.; TOWNSEND, A.R.; TAYLOR, P.; ALVAREZ-CLARES, S.; BUSTAMANTE, M.M.C.; CHUYONG, G.; DOBROWSKI, S.Z.; GRIERSON, P.; HARMS, K.E.; HOULTON, B.Z.; MARKLEIN, A.; PARTON, W.; PORDER, S.; REED, S.C.; SIERRA, C.A.; SILVER, W.L.; TANNER, E.V.J.; WIEDER, W.R. Relationships among net primary productivity, nutrients and climate in tropical rain forest: a pan-tropical analysis. **Ecology Letters**, Davis, v. 14, n. 9, p. 939-947, 2011.

CONSERVAÇÃO INTERNACIONAL. Disponível em: <<http://www.conservation.org.br>>. Acesso em: 09 set. 2011

DANIEL, R. The metagenomics of soil. **Nature**, London, v.3, n. 6, p. 470-478, 2005.

DEDYSH, S.N. Cultivating uncultured bacteria from Northern Wetlands: knowledge gained and remaining gaps. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 2, n. 184, p. 1-15, 2011.

DeLONG, E.F. Everything in moderation: Archaea as 'non-extremophiles'. **Current Opinion in Genetics & Development**, Medford, v. 8, p. 649-654, 1998.

DIALLO, M.D.; MARTENS, M.; VLOEMANS, N.; COUSIN, S.; VANDEKERCK-HOVE, T.T.; NEYRA, M.; DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; GILLIS, M.; VYVERMAN, W.; VAN DER GUCHT, K. Phylogenetic analysis of partial bacterial 16S rDNA sequences of tropical grass pasture soil under *Acacia tortilis subsp. raddiana* in Senegal. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, n. 2, p. 238-252, 2004.

DONELLY, P.K., ENTRY, J.A., CRAWFORD, D.L., CROMACK, K. J. Cellulose and lignin degradation in forest soils: response to moisture, temperature, and acidity. **Microbial Ecology**, Cambridge, v. 20, n. 1, p. 289-295, 1990.

DUNBAR, J.; BARNES, S.; TICKNOR, L.; KUSKE, C. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 3035-3045, 2002.

DURIGAN, G., SIQUEIRA, M.F., FRANCO, G.A.D.C. Threats to the Cerrado remnants of the state of São Paulo, Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, p. 363-366, 2007.

EICHORST, S.A., KUSKE, C.R.; SCHMIDT, T.M. Influence of plant polymers on the distribution and cultivations of bacteria in the phylum *Acidobacteria*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, p.586-596, 2011.

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ" – ESALQ. Departamento de Ciência do Solo (LSO). Disponível em: <<http://www.solos.esalq.usp.br/labpesq.htm>>. Acesso em: 31 out. 2011.



FAORO, H.; ALES, A.C.; SOUZA, E.M.; RIGO, L.U.; CRUZ, L.M. 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.

FAUTH, J.E.; BERNARDO, J.; CAMARA, M.; RESETARITS Jr., W.J.; VAN BUSKIRK, J.; McCOLLUM, S.A. Simplifying the jargón of community ecology: a conceptual approach. **The American Naturalist**, Chicago, v. 147, n. 2, p. 282-286, 1996.

FREY, S.D.; KNORR, M.; PARRENT, J.L.; SIMPSON, R.T. Chronic nitrogen enrichment affects the structure and function of the soil microbial community in temperate hardwood and pine forests. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 196, p. 159–171, 2004.

GALINDO-LEAL, C.; CAMARA, I.G. **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook**. Washington: Island Press, 2003. 488 p.

GANTNER, S.; ANDERSSON, A.F.; ALONSO-SÁEZ, L.; BERTILSSON, S. Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 84, n. 1, p. 12-18, 2011.

GERMIDA, J.J.; SICILIANO, S.D.; FREITAS, J.R.; SEIB, A.M. Diversity of root-associated bacteria associated with field- grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 26, p. 43–50, 1998.

GIRVAN, M.S.; BULLIMORE, J.; PRETTY, J.N.; OSBORN, A.M.; BALL, A.S. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 1800–1809, 2003.

GOMES, N.C.M.; HEUER, H.; SCHÖNFELD, J.; COSTA, R.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, The Hague, v. 232, p. 167–180, 2001.

GRAYSTON, S.J.; WANG, S.; CAMPBELL, C.D.; EDWARDS, A.C. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 369–378, 1998.

GRIFFITHS, R.I.; BAILEY, M.J.; McNAMARA, N.P.; WHITELEY, A.S. The functions and components of the Sourhope soil microbiota. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 33, p. 114–126, 2006.

GRIFFITHS, R.I.; WHITELEY, A.S.; O'DONNELL, A.G.; BAILEY, M.J. Influence of depth and sampling time on bacterial community structure in an upland grassland soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 43, p. 35–43, 2003.

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

HANSEL, C.M.; FENDORF, S.; JARDINE, P.M.; FRANCIS, C.A. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 5, p. 1620-1633, 2008.

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

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

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

HORNER-DEVINE, M.C.; LAGE, M.; HUGHES J.B.; BOHANNAN, B.J.M. A taxa-area relationship for bacteria. **Nature**, London, v. 432, p. 750–753, 2004.

HU, S.; VAN BRUGGEN, A.H.C. Microbial dynamics associated with multiphasic decomposition of <sup>14</sup>C-labeled cellulose in soil. **Microbial Ecology**, Cambridge, v. 33, n. 2, p. 134-143, 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Ecossistemas brasileiros**. 2007. Disponível em: <[http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/mata\\_atlantica.htm](http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/mata_atlantica.htm)>. Acesso em: 05 set. 2011.

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

JESUS, E.D.; MARSH, T.L.; TIEDJE, J.M.; MOREIRA, F.M.D. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **The ISME Journal**, New York, v. 3, p. 1004–1011, 2009.

JONES, R.; ROBESON, M.; LAUBER, C.; HAMADY, M.; KNIGHT, R.; FIERER, N. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. **The ISME Journal**, New York, v. 3, p. 442–453, 2009.

KAISER, O.; PUHLER, A.; SELBITSCH, W. Phylogenetic analysis of microbial diversity in the rhizoplane of oilseed rape (*Brassica napus* cv. *Westar*) employing cultivation-dependent and cultivation-independent approaches. **Microbial Ecology**, New York, v. 42, p. 136–49, 2001.

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

KOWALCHUK, G.A.; BUMA, D.S.; De BOER, W.; KLINKHAMER, P.G.L.; VAN VEEN, J.A. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 81, p. 509–520, 2002.

LAIZ, L.; ROMANOWSKA-DESKINS, A.; SAIZ-JIMENEZ, C. Survival of a bacterial/aechael consortium on building materials as revealed by molecular methods. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Kidlington, v. 65, p. 1100-1103, 2011.

LAMBAIS, M.R.; CROWLEY, D.E.; CURY, J.C.; BÜLL, R.C.; RODRIGUES, R.R. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic forest. **Science**, Washington, v. 312, n. 5782, p. 1917-1917, 2006.

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, p. 5111–5120, 2009.

LEE, K.; WEBB, R.I.; JANSSEN, P.H.; SANGWAN, P.; ROMEO, T.; STALEY, J.T.; FUERST, J.A. Phylum Verrucomicrobia representatives share a compartmentalized cell plan with members of bacterial phylum Planctomycetes. **BMC Microbiology**, London, v. 9, n. 5, doi:10.1186/1471-2180-9-5, 2009.

LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. **Numerical ecology**. Amsterdam: Elsevier Science, 1998. 853 p.

LEININGER, S.; URICH, T.; SCHLOTTER, 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.

LEPS, J.; SMILAUER, P. **Multivariate analysis of ecological data using CANOCO**. Cambridge: Cambridge University Press, 2003. 267 p.

LIPSON, D.A.; SCHMIDT, S.K. Seasonal changes in an alpine soil bacterial community in the Colorado Rocky Mountains. . **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 2867–2879, 2004.

LUTON, P.E.; WAYNE, J.M.; SHARP, R.J.; RILEY, P.W. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the Phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. **Microbiology**, New York, v. 148, p. 3521-3530, 2002.

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

MENDES, R.; KRUIJT, M.; BRUIJIN, I.; DEKKERS, E.; VAN DER VOORT, M.; SCHNEIDER, J.H.M.; PICENO, Y.M.; DeSANTIS, T.Z.; ANDERSERN, G.L.; BAKKER, P.A.H.M.; RAAIJMAKERS, J.M. Deciphering the rhizosphere microbioma for disease-suppressive bacteria. **Science**, Washington, v. 332, p. 1091-1100, 2011.

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

MULLINS, T.D.; BRITSCHGI, T.B.; KREST, R.L.; GIOVANNONI, S.J. Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities. **Limnology and Oceanography**, Grafton, v. 40, p. 148-158, 1995.

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 ribosomal-RNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 695–700, 1993.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, p. 853-858. 2000.

NACKE, H.; THÜRMER, A., WOLLHHERR, A., 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**, Oxford, v. 6, n. 2, p. e17000, 2011.

NICOL, G.W.; SCHLEPER, C. Ammonia-oxidizing Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? **Trends in Microbiology**, Oxford, v. 14, p. 207–212, 2006.

OLINE, D.K.; SCHMIDT, S.K.; GRANT, M.C. Biogeography and landscape-scale diversity of the dominant *Crenarchaeota* of soil. **Microbial Ecology**, New York, v. 52, p. 480-490, 2006.

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

PANKRATOV, T.A.; IVANOVA, A.O.; DEDYSH, S.N.; LIESACK, W. Bacterial populations and environmental factors controlling cellulose degradation in an acidic *Sphagnum* peat. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 13, p. 1800-1814, 2011.

PARKER, M. A.; SPOERKE J. M. Geographic structure of lineage associations in a plant–bacterial mutualism. **Journal of Evolutionary Biology**, Scotland, v. 11, p. 549–562, 1998.

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

PONÇANO, W.L.; CARNEIRO, C.D.R.; BISTRICHI, C. A.; ALMEIDA, F.F.M.; PRADINI, F.L. **Mapa geomorfológico do estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, 1981. v. 1

PROSSER, J.I.; NICOL, G.W. Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 10, n. 11, p. 2931-2941, 2008.

RAMETTE, A. Multivariate analyses in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 62, p. 142-160, 2007.

RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M., The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, Barking, v. 142, p. 1141-1153, 2009.

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

SAIT, M.; HUGENHOLTZ, P.; JANSSEN, P.H. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 4, n. 11, p. 654-666, 2002.

SANGWAN, P.; KOVAC, S.; DAVIS, K.E.R.; SAIT, M.; JANSSEN, P.H. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 8402–8410, 2005.

SCHELEPER, 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, p. 479–488, 2005.

SCHLOSS, P.D.; WESTCOTT, S.L.; RYABIN, T.; HALL, J.R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E.B. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 7537-7541, 2009.

SCORTICHINI, M.; NATALINI, E.; MARCHESI, U. Evidence for separate origins of the two *Pseudomonas avellanae* lineages. **Plant Pathology**, Malden, v. 55, p. 451–457, 2006.

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

SETZER, J. **Atlas climatológico do estado de São Paulo**. São Paulo: CESP, Comissão Interestadual da Bacia do Paraná-Paraguai, 1966. 120 p.

SILVA, A.; GRAÇAS, D.A.; MIRANDA, P.R.; BARAÚNA, R.A.; MCCULLOCH, J.A.; GHILARDI Jr., R.; SCHNEIDER, M.P.C. Microbial diversity of an anoxic zone of a hydroelectric power station reservoir in brazilian Amazonia. **Environmental Microbiology**, Malden, v. 62, p. 853-861, 2011.

SILVA, R.C.; PEREIRA, J.M.; ARAUJO, Q.R.; PIRES, A.J.V.; DEL REI, A.J. Alterações nas propriedades químicas e físicas de um Chernossolo com diferentes coberturas vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.31, p.101-107, 2007.

SLIWINSKI, M.K.; GOODMAN, R.M. Comparison of crenarchaeal consortia inhabiting the rhizosphere of diverse terrestrial plants with those in bulk soil in native environments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 1821-1826, 2004.

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

SOS MATA ATLÂNTICA. INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica, período de 2000 a 2005. 2008**. Disponível em: <<http://www.sosmatatlantica.org.br>>. Acesso em: 09 set. 2011.

SPANG, A.; HATZENPICHLER, R.; BROCHIER-ARMANET, C.; RATTEI, T.; TISCHLER, P. Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum *Thaumarchaeota*. **Trends in Microbiology**, Oxford, v. 18, p. 331–340, 2010.

STUBNER, S. Quantification of gram-negative sulphate-reducing bacteria in rice field soil by 16S rRNA gene-targeted real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 57, p. 219–230, 2004.

TABARELLI, M.; MANTOVANI, W. Predação diferencial de ovos e diásporos em um fragmento de floresta Atlântica (ES-Brasil). **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 57, p. 699-707, 1997.

TABARELLI, M.; MANTOVANI, W.; PERES, C.A. Effects of habitat fragmentation on plant guild structure in the montane Atlantic forest of southeastern Brazil. **Biological Conservation**, Amsterdam, v. 91, n. 2-3, p. 119-127, 1999.

THOMSON, B.C.; OSTLE, N.; McNAMARA, N.; BAILEY, M.J.; WHITELEY, A.S.; GRIFFITHS, R.I. Vegetation affects the relative abundances of dominant soil bacterial taxa and soil respiration rates in an upland grassland soil. **Plant Microbe Interactions**, Kerala, v. 59, p. 335-343, 2010.

TILMAN, D.; MAY, R.M.; LEHMAN, C.L., NOWAK, M.A. Habitat destruction and the extinction debt. **Nature**, London, v. 371, p. 65-66, 1994.

VALENTINE, D.L. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, n. 4, p. 316-23, 2007.

VAN ELSAS, J.; GARBEVA, P.; VAN VEEN, J. Microbial diversity in soil: selection microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, Lawrence, v. 42, n. 29, p. 243-270, 2004.

VELOSO, H.P.; RANGEL FILHO, A.L.R.; LIMA, J.C.A. **Classificação da Vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, 1991. 124 p.

VIANA, V.M.; TABANEZ, A.J. Biology and conservation of forest fragments in the Brazilian Atlantic moist forest. In: CHELHAS, J.; GREENBERG, R. **Forest patches in tropical landscapes**. London: Island Press, 1995. p. 151-167.

WAKELIN, S.A.; MACDONALD, L.M.; ROGERS, S.L.; GREGG, A.L.; BOLGER, T.P. Habitat selective factors influencing the structural composition and functional capacity of microbial communities in agricultural soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 803–813, 2008.

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

WIELAND, G.; NEUMANN, R.; BACKHAUS, H. Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 5849–5854, 2001.

WILL, C.; THURMER, A.; WOLLHERR, A.; NACKE, H.; HEROL, N.; SCHRUMPF, M.; GUTKNECHT, J.; WUBET, T.; BUSCOT, F.; DANIEL, R. Horizon-specific bacterial community composition of German grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.76, n. 20, p. 6751-5759, 2010.

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

WUCHTER, C.; ABBAS, B.; COOLEN, M.J.L.; HERFORT, L.; BLEIJSWIJK, J.V.; 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 Sciences of the USA**, Washington, v. 103, n. 33, p. 12317-13322, 2006.

YAN, B.; HONG, K.; YU, Z.N. Archaeal communities in mangrove soil characterized by 16S rRNA gene clones. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 44, n. 5, p. 566-571, 2006.

YANG, C.H.; CROWLEY, D.E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 345–351, 2000.





## **ANEXOS**



Anexo A – Total de família de plantas encontradas nas parcelas de estuda da Mata Atlântica no estado de São Paulo

(continua)

Família	Número de indivíduos arbóreos		
	Santa Virgínia	Picinguaba	Restinga
Anacardiaceae	0	0	9
Annonaceae	2	9	100
Araliaceae	2	18	47
Arecaceae	315	196	254
Apocynaceae	0	7	1
Aquifolioaceae	0	0	24
Asteraceae	0	2	0
Bignoniaceae	2	0	98
Boraginaceae	19	4	0
Cardipteridaceae	0	6	0
Caricaceae	0	4	0
Cecropiaceae	1	0	0
Celastraceae	0	15	48
Chrysobalanaceae	8	19	4
Clusiaceae	0	30	72
Cyatheaceae	69	4	1
Combrutaceae	0	4	0
Dichapetalaceae	0	4	0
Elaeocarpaceae	0	18	10
Erythroxylaceae	0	1	0
Euphorbiaceae	33	34	351
Fabaceae	3	41	69
Icacinaceae	3	0	0
Lacistemaceae	0	0	15
Lauraceae	23	27	38
Lamiaceae	0	2	0
Lecythidaceae	0	4	0
Malpighiaceae	0	0	6
Magnoliaceae	0	1	0
Malvaceae	0	14	0
Melastomataceae	9	1	36
Meliaceae	8	11	67
Monimiaceae	12	94	0
Myrcinaceae	1	6	48
Myrtaceae	37	222	463
Moraceae	0	36	1

Anexo A – Total de família de plantas encontradas nas parcelas de estudo da Mata Atlântica no estado de São Paulo

(conclusão)

Família	Número de indivíduos arbóreos		
	Santa Virgínia	Picinguaba	Restinga
Myristicaceae	0	15	1
Nyctaginaceae	12	39	29
Olacaceae	2	15	0
Ochnaceae	0	2	0
Pratlaceae	0	2	0
Polygonaceae	0	0	8
Phyllanthaceae	1	6	0
Piperaceae	1	0	0
Rosaceae	0	0	8
Rubiaceae	11	245	24
Rutaceae	1	1	6
Salicaceae	1	0	0
Sapindaceae	4	1	0
Sapotaceae	10	65	0
Solanaceae	2	18	0
Theophrastaceae	0	0	1
Thymelaeaceae	2	0	0
Urticaceae	1	18	5
Verbenaceae	0	0	1

Anexo B – Total de gênero de plantas encontradas nas parcelas de estudo da Mata Atlântica no estado de São Paulo

(continua)

Família	Gênero	Número de indivíduos arbóreos		
		Santa Virgínia	Picinguaba	Restinga
Anacardiaceae	<i>Tapirira</i> sp.	0	0	9
	<i>Guatteria</i> sp.	1	8	100
Annonaceae	<i>Guapira</i> sp.	1	0	0
	<i>Rollinia</i> sp.	0	1	0
Apocynaceae	<i>Malouetia</i> sp.	0	3	0
Aquifoliaceae	<i>Ilex</i> sp.	0	0	24
Apocynaceae	<i>Tabernaemontana</i> sp.	0	4	1
	<i>Dendropanax</i> sp.	0	7	0
Araliaceae	<i>Oreopanax</i> sp.	0	1	1

Anexo B – Total de gênero de plantas encontradas nas parcelas de estudo da Mata Atlântica no estado de São Paulo

(continuação)

Família	Gênero	Número de indivíduos arbóreos		
		Santa Virgínia	Picinguaba	Restinga
Araliaceae	<i>Schefflera</i> sp.	2	10	46
Arecaceae	<i>Bactris</i> sp.	0	0	2
	<i>Euterpe</i> sp.	312	149	250
	<i>Astrocaryum</i> sp.	0	7	2
	<i>Syagrus</i> sp.	0	38	0
	<i>Vernonia</i> sp.	0	2	0
Bignoniaceae	<i>Jacaranda</i> sp.	2	0	98
Boraginaceae	<i>Cordia</i> sp.	19	4	0
Cardiopteridaceae	<i>Citronella</i> sp.	0	6	0
Caricaceae	<i>Jacaratia</i> sp.	0	4	0
Cecropiaceae	<i>Coussapoa</i> sp.	1	0	0
Celastraceae	<i>Maytenus</i> sp.	0	8	48
	<i>Salacia</i> sp.	0	7	0
Chrysobalanaceae	<i>Couepia</i> sp.	0	9	2
	<i>Hirtella</i> sp.	0	10	2
	<i>Licania</i> sp.	5	0	0
Clusiaceae	<i>Calophyllum</i> sp.	0	0	9
	<i>Kielmeyera</i> sp.	0	0	29
	<i>Garcinia</i> sp.	0	30	28
Combretaceae	<i>Buchenavia</i> sp.	0	1	0
	<i>Terminalia</i> sp.	0	3	0
Cyatheaceae	<i>Alsophila</i> sp.	0	2	0
Sapindaceae	<i>Matayba</i> sp.	3	0	0
Cyatheaceae	<i>Cyathea</i> sp.	12	2	1
	<i>Alsophila</i> sp.	7	2	0
Dichapetalaceae	<i>Stephanopodium</i> sp.	0	4	0
Euphorbiaceae	<i>Alchornea</i> sp.	30	14	86
	<i>Pera</i> sp.	0	0	256
	<i>Margaritaria</i> sp.	0	0	5
	<i>Hyeronima</i> sp.	1	0	4
	<i>Euphorbiaceae</i> sp.	0	1	0
	<i>Mabea</i> sp.	0	1	0
Elaeocarpaceae	<i>Slonea</i> sp.	0	0	8
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum</i> sp.	0	1	0
Euphorbiaceae	<i>Croton</i> sp.	2	0	0

Anexo B – Total de gênero de plantas encontradas nas parcelas de estudo da Mata Atlântica no estado de São Paulo

(continuação)

Família	Gênero	Número de indivíduos arbóreos		
		Santa Virgínia	Picinguaba	Restinga
Euphorbiaceae	<i>Pausandra</i> sp.	0	16	0
	<i>Sapium</i> sp.	0	2	0
Elaeocarpaceae	<i>Sloanea</i> sp.	0	18	0
Fabaceae	<i>Andira</i> sp.	0	0	37
	<i>Copaifera</i> sp.	0	3	0
	<i>Dalbergia</i> sp.	0	0	1
	<i>Dahlstedtia</i> sp.	0	2	0
	<i>Hymenaea</i> sp.	0	1	0
	<i>Inga</i> sp.	2	6	29
	<i>Myrocarpu</i> sp.s	0	1	0
	<i>Ormosia</i> sp.	0	0	2
	<i>Plastymiscium</i> sp.	0	1	0
	<i>Swartzia</i> sp.	0	15	4
Icacinaceae	<i>Tachigali</i> sp.	0	10	0
	<i>Zollernia</i> sp.	0	2	0
Lacistemaceae	<i>Citronella</i> sp.	3	0	0
Lamiaceae	<i>Lacistema</i> sp.	0	0	15
Lauraceae	<i>Aegiphila</i> sp.	0	2	0
	<i>Endlicheria</i> sp.	0	0	8
	<i>Cryptocarya</i> sp.	2	9	0
	<i>Nectandra</i> sp.	0	0	29
	<i>Licaria</i> sp.	0	6	0
	<i>Ocotea</i> sp.	4	10	1
Lecythidaceae	<i>Rhodostemonodaphne</i> sp.	0	1	0
	<i>Cariniana</i> sp.	0	4	0
Malpighiaceae	<i>Byrsonima</i> sp.	0	0	6
Melastomataceae	<i>Miconia</i> sp.	3	1	34
	<i>Miconia</i> sp.	0	1	0
	<i>Mollinedia</i> sp.	1	94	0
	<i>Tibouchina</i> sp.	1	0	1
Magnoliaceae	<i>Magnólia</i> sp.	0	1	0
Malvaceae	<i>Eriotheca</i> sp.	0	7	0
	<i>Quararibea</i> sp.	0	7	0
Meliaceae	<i>Trichilia</i> sp.	2	6	0
	<i>Cabralea</i> sp.	1	2	0

Anexo B – Total de gênero de plantas encontradas nas parcelas de estudo da Mata Atlântica no estado de São Paulo

(continuação)

Família	Gênero	Número de indivíduos arbóreos		
		Santa Virgínia	Picinguaba	Restinga
Meliaceae	<i>Guarea</i> sp.	4	2	67
Monimiaceae	<i>Miconia</i> sp.	1	1	0
	<i>Mollinedia</i> sp.	8	94	0
Moraceae	<i>Brosimum</i> sp.	0	11	0
	<i>Ficus</i> sp.	0	5	1
	<i>Sorocea</i> sp.	0	20	0
Myristicaceae	<i>Virola</i> sp.	0	15	0
	<i>Myrsine</i> sp.	0	0	48
Myrsinaceae	<i>Gomidesia</i> sp.	0	0	97
	<i>Ardisia</i> sp.	0	5	0
	<i>Rapanea</i> sp.	2	1	0
Myrtaceae	<i>Eugenia</i> sp.	2	105	78
	<i>Campomanesi</i> sp.a	1	8	1
	<i>Marlierea</i> sp.	2	40	35
	<i>Psidium</i> sp.	0	0	16
	<i>Calyptanthus</i> sp.	3	18	15
	<i>Myrcia</i> sp.	7	40	227
	<i>Myrciaria</i> sp.	0	10	0
	<i>Plinia</i> sp.	0	1	0
Nyctaginaceae	<i>Guapira</i> sp.	12	39	29
Polygonaceae	<i>Coccoloba</i> sp.	0	0	8
Phyllanthaceae	<i>Hieronyma</i> sp.	1	6	0
Piperaceae	<i>Piper</i> sp.	1	0	0
Proteaceae	<i>Euplassa</i> sp.	0	0	32
	<i>Roupala</i> sp.	0	2	3
Rosaceae	<i>Prunus</i> sp.	0	0	8
Rubiaceae	<i>Amaioua</i> sp.	0	0	8
	<i>Alseis</i> sp.	0	8	0
	<i>Bathysa</i> sp.	7	70	0
	<i>Chomelia</i> sp.	1	0	0
	<i>Coussarea</i> sp.	0	102	0
	<i>Faramea</i> sp.	0	7	0
	<i>Faramea</i> sp.	0	0	12
	<i>Ixora</i> sp.	0	1	0
<i>Genipa</i> sp.	0	0	4	



Anexo B – Total de gênero de plantas encontradas nas parcelas de estudo da Mata Atlântica no estado de São Paulo

(conclusão)

Família	Gênero	Número de indivíduos arbóreos		
		Santa Virgínia	Picinguaba	Restinga
Rubiaceae	<i>Posoqueria</i> sp.	0	1	0
	<i>Rubiaceae</i> sp..	0	1	0
	<i>Rudgea</i> sp.	0	6	0
	<i>Rustia</i> sp.	1	44	0
Rutaceae	<i>Zanthoxylum</i> sp.	0	1	6
Olacaceae	<i>Heisteria</i> sp.	1	1	0
Ochnaceae	<i>Ouratea</i> sp.	0	2	0
Olacaceae	<i>Tetrastylidium</i> sp.	0	14	0
Salicaceae	<i>Casearia</i> sp.	1	0	0
Sapindaceae	<i>Matayba</i> sp.	3	0	0
	<i>Cupania</i> sp.	1	1	0
Sapotaceae	<i>Chrysophyllum</i> sp.	0	45	0
	<i>Ecclinusa</i> sp.	0	10	0
	<i>Pouteria</i> sp.	2	0	0
	<i>Chrysophyllum</i> sp.	1	0	0
Solanaceae	<i>Solanaceae</i> sp..	0	1	0
	<i>Solanum</i> sp.	2	0	0
Theophrastaceae	<i>Clavija</i> sp.	0	0	2
Thymelaeaceae	<i>Daphnopsis</i> sp.	2	0	0
Urticaceae	<i>Cecropia</i> sp.	1	9	2
	<i>Coussapoa</i> sp.	0	4	0
	<i>Vitex</i> sp.	0	0	4

Anexo C – Dados químicos obtidos do solo das repetições das 3 áreas de estudo da Mata Atlântica

Áreas	pH	MO <sup>1</sup> (g.dm <sup>-3</sup> )	P (mg.dm <sup>-3</sup> )	S (mg.dm <sup>-3</sup> )	K	Ca	Mg (mmolc.dm <sup>-3</sup> )	Al <sub>t</sub>	H+Al <sup>2</sup>	Nitrato µg/g de solo seco	Amônia	B	Cu	Fe <sub>t</sub>	Mn	Zn
Santa Virginia	3,56	65	17	8,0	2,6	3,0	3	23,5	151	107,7	27,2	0,43	0,7	371	3,7	1,0
	3,52	86	13	11,0	1,6	2,0	2	24,4	166	100,4	23,3	0,39	0,3	347	2,3	1,3
	3,72	60	16	10,0	1,7	2,0	2	22,0	122	94,9	29,5	0,43	0,8	192	3,5	0,9
	3,60	70	15	9,7	2,0	2,3	2	23,3	146	101,0	26,7	0,42	0,6	303	3,2	1,1
Picinguaba	3,68	66	15	13,0	1,9	2,0	2	20,8	142	136,1	51,7	0,41	0,3	202	4,3	0,9
	3,52	56	8	14,0	1,3	2,0	2	21,1	143	110,3	42,9	0,39	0,2	197	2,7	0,8
	3,62	69	16	12,0	1,9	3,0	2	19,2	133	113,3	51,2	0,39	0,4	206	5,1	1,2
	3,61	64	13	13,0	1,7	2,3	2	20,4	139	119,9	48,6	0,43	0,8	192	3,5	0,9
Restinga	3,54	70	6	5,0	0,9	1,0	1	19,6	129	23,6	31,1	0,19	0,1	456	0,5	0,9
	3,59	57	5	5,0	0,9	1,0	1	15,7	97	31,4	20,0	0,17	0,1	402	0,6	0,5
	3,91	59	5	6,0	0,6	1,0	1	14,2	88	22,4	20,0	0,14	0,1	1336	1,0	0,7
	3,68	62	5	5,3	0,8	1,0	1	16,5	105	25,8	23,7	0,20	0,1	731	0,7	0,7

<sup>1</sup>MO – matéria orgânica; <sup>2</sup>H+Al – acidez potencial

## Anexo D – Dados físicos obtidos do solo das repetições das 3 áreas de estudo da Mata Atlântica

Áreas	Areia	Silte	Argilas
	%		
	900 a 100 m		
	53,6	11,4	35,0
Santa	59,0	10,9	30,1
Virgínia	55,2	14,7	30,1
	55,9	12,3	31,7
	50 a 100 m		
	55,5	11,9	32,6
Picinguaba	55,8	11,6	32,6
	59,2	10,6	30,2
	56,8	11,4	31,8
	0 a 5 m		
	87,9	20,0	10,1
Restinga	89,2	58,0	50,0
	86,3	62,0	75,0
	87,8	47,0	75,0

Anexo E – Primers reversos usados na técnica de pirosequenciamento

Domínio	Primer reverso	Sequência (5'→3')
Bacteria	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
Archaea	ArcR	CTA TGC GCC TTG CCA GCC CGC TCA GTT ACC GCG GCK GCT G

Anexo F – Forward primers usados na técnica de pirosequenciamento

Domínio	Amostra	Forward primer	Sequência (5'→3')	
Bacteria	Santa Virgínia	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
	Picinguaba	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
	Restinga	RE2	520FMID8	CGT ATC GCC TCC CTC GCG CCA TCA GAG ATC ATC AYT GGG YDT AAA GNG
		RE3	520FMID11	CGT ATC GCC TCC CTC GCG CCA TCA GCA TGC ATG AYT GGG YDT AAA GNG
Archaea	Santa Virgínia	SV2	ArcFMID4	CGT ATC GCC TCC CTC GCG CCA TCA GAG CAT GAG CCC TAC GGG GYG CAS CAG
		SV3	ArcFMID6	CGT ATC GCC TCC CTC GCG CAT CAG ATC AGA TCC CCT ACG GGG YGC ASC AG
Archaea	Picinguaba	PC2	ArcFMID1	CGT ATC GCC TCC CTC GCG CAT CAG AGA GAG AGC CCT ACG GGG YGC ASC AG
		PC3	ArcFMID8	CGT ATC GCC TCC CTC GCG CAT CAG AGA TCA TCC CCT ACG GGG YGC ASC AG
	Restinga	RE2	ArcFMID12	CGT ATC GCC TCC CTC GCG CAT CAG CTG AGC TGC CCT ACG GGG YGC ASC AG
		RE3	ArcFMID10	CGT ATC GCC TCC CTC GCG CAT CAG AGC AGA GCC CCT ACG CCC YGC ASC AG