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

Diversidade de bactérias e arqueias em solos cultivados com cana-de-açúcar: um enfoque biogeográfico

Ademir Durrer Bigaton

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

**Piracicaba
2014**

Ademir Durrer bigaton
Biólogo

**Diversidade de bactérias e arqueias em solos cultivados com cana-de-açúcar: um
enfoque biogeográfico**

Orientador:
Prof. Dr. **FERNANDO DINI ANDREOTE**

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

**Piracicaba
2014**

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

Bigaton, Ademir Durrer

Diversidade de bactérias e arqueias em solos cultivados com cana-de-açúcar:
um enfoque biogeográfico / Ademir Durrer Bigaton. - - Piracicaba, 2014.
94 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Manejo 2. Física e química do solo 3. Métodos independentes de cultivo 4.
Modelos de distribuição de abundância 5. Network I. Título

CDD 633.61
B592d

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

DEDICATÓRIA

A memória de minha avó Maria,

mesmo distante esta é mais uma conquista em um sonho que realizamos juntos

A memória de meu avô,

por me amar e introduzir a ciência. Mesmo com pouco tempo de convivência seus ensinamentos serão eternos, sendo sempre um exemplo pra mim.

A minha Mãe,

por me educar, auxiliar nos estudos e, acima de tudo, ensinar os verdadeiros valores de uma homem.

A Lillian,

por ser minha eterna companheira, vivendo ao meu lado todos os momentos alegres ou triste, me ensinando o verdadeiro significado da palavra AMOR.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Fernando Dini Andreote pela orientação e auxílio na minha formação científica, sendo muitas vezes mais do que um orientador e sim, um amigo.

Ao Dr. Rodrigo Taketani pela amizade e conselhos na elaboração deste trabalho.

Ao curso de pós-graduação da Microbiologia Agrícola, a FAPESP e a CAPES pelo apoio e bolsa concedida.

A todos os funcionários do departamento de Ciência do Solo e do curso de Microbiologia Agrícola sempre prestativos quando solicitados.

Aos técnicos do laboratório de Microbiologia do solo, Denise e Fernando, pela ajuda, ensinamentos e amizade nestes anos de convivência.

Aos amigos de laboratório: Armando, Cristiane, Danice, Danielle, Dorotéria, Diogo, Fábio, Felipe, German, Joelma, Júlia, Juliana, Luana, Lucas, Maryeime, Michele, Mylenne, Pedro, Polé, Simone. Um especial agradecimento ao Thiago Gumiere pela convivência e ajuda na elaboração deste trabalho.

A minha Mãe e minha família por simplesmente me amarem!

Por último, mas sempre em primeiro lugar, a DEUS e todos os bons espíritos que sempre me fortaleceram nos momentos difíceis.

EPÍGRAFE

“Se você quer ser bem sucedido, precisa ter dedicação total, buscar seu
último limite e dar o melhor de si.”

Aryton Senna

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Revisão Bibliográfica	16
1.1.1 O panorama da cana-de-açúcar.....	16
1.1.2 A microbiota do solo e suas perspectivas no cenário agrícola	18
1.1.3 A microbiologia do solo em canaviais	19
1.1.4 Metodologias independentes de cultivo no estudo da microbiologia do solo	21
1.1.5 Biogeografia microbiana	24
1.1.6 Modelos de distribuição da abundância.....	26
Referências	27
2 O MICROBIOMA BACTERIANO EM SOLOS CANAVIEIROS: COMPREENDENDO SUA ECOLOGIA E SEUS PRINCIPAIS MODULADORES	35
Resumo	35
Abstract.....	35
2.1 Introdução.....	36
2.2 Material e métodos	38
2.2.1 Descrição da área, análises físicas e químicas, e extração de DNA do solo	38
2.2.2 Quantificação da comunidade bacteriana por PCR quantitativo (qPCR).....	39
2.2.3 Análise da estrutura das comunidades bacterianas a partir do polimorfismo terminal do fragmento de restrição (T-RFLP)	39
2.2.4 Descrição da comunidade bacteriana por sequenciamento em larga escala da região V6 do gene 16S de rRNA.....	40
2.2.5 Análise das sequências obtidas.....	41
2.2.6 A análise de network	41
2.2.7 Correlação entre os dados microbiológicos com as matrizes de características dos solos, manejos adotados e coordenadas geográficas	42
2.2.8 Adequação da comunidade bacteriana dos solos estudados aos modelos de distribuição de espécies (species abundance distribution - SAD)	42
2.3 Resultados e discussão.....	43
2.3.1 Variação das características físicas e químicas dos solos estudados.....	43

2.3.2 Abundância, estrutura da comunidade bacteriana e classificação taxonômica com base no gene 16S RNAr	44
2.3.3 Interações bacterianas em solos cultivados com cana	50
2.3.4 Determinação das variáveis com maior correlação com a estrutura da comunidade bacteriana em solos cultivados com cana-de-açúcar.....	54
2.3.5 Comportamento da comunidade abundante e rara nos modelos de distribuição de espécies	60
2.4 Conclusões	63
Referências.....	63
3 BIOGEOGRAFIA DA COMUNIDADE DE ARQUEIAS EM SOLOS CULTIVADOS COM CANA-DE-AÇÚCAR.....	71
Resumo.....	71
Abstract	71
3.1 Introdução	72
3.2 Material e métodos.....	73
3.2.1 Descrição da área, análises físicas, químicas e extração de DNA do solo	73
3.2.2 Quantificação da comunidade de arqueias por PCR quantitativo (qPCR).....	74
3.2.3 Análise da estrutura da comunidade de arqueias por T-RFLP.....	74
3.2.4 A descrição da comunidade bacteriana por sequenciamento em larga escala do gene 16S de rRNA	75
3.2.5 Análise das sequências obtidas	76
3.2.6 Análises estatísticas dos resultados.....	76
3.3 Resultados e discussão	76
3.3.1 Quantificação e análise da estrutura da comunidades de arqueias nos solos estudados .	76
3.3.2 Descrição taxonômica da comunidade de arqueias.....	79
3.3.3 Efeito das práticas de manejo, características do solo e ocorrência de padrões biogeográficos na comunidade de arqueias	82
3.4 Conclusões	88
Referências.....	88
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93

RESUMO

Diversidade de bactéria e arqueias em solos cultivados com cana-de-açúcar: um enfoque biogeográfico

A cana-de-açúcar é atualmente a cultura de maior importância agrícola do Estado de São Paulo e tem papel de destaque entre as principais culturas do Brasil. Dentro de um contexto de maior produtividade unida a sustentabilidade, o papel da comunidade microbiana presente nos solos pode ter fundamental importância, auxiliando no melhor desenvolvimento da planta, suprimindo a mesma com nutrientes ou diminuindo a ocorrência de doenças e pragas. Contudo, pouco se sabe sobre a comunidade microbiana existente nos solos cultivados com cana-de-açúcar, sendo que um conhecimento da distribuição espacial desta comunidade pode auxiliar para uma melhor compreensão dos processos aos quais estes microrganismos estão envolvidos. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo estudar, em um enfoque biogeográfico, a diversidade de bactérias e arqueias existente em solos de cana-de-açúcar do Estado de São Paulo, focando nos grupos de arqueias e bactérias. Uma análise de 285 amostras de solos, obtidas em 10 regiões produtoras distintas, foi realizada utilizando técnicas independentes de cultivo como: quantificação da abundância total por meio da aplicação de PCR em tempo real (qPCR), análises da estrutura da comunidade por polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição terminal (T-RFLP), e determinação da sua afiliação filogenética por sequenciamento em larga escala de genes ribossomais. Os resultados obtidos demonstraram que o principal modulador destas comunidades foram as características física e química do solo (pH, granulometria, matéria orgânica). Além disso, a comunidade de arqueias demonstrou ser influenciada por práticas de manejo (colheita mecanizada e adição de vinhaça e torta de filtro). Adicionalmente, foi observada uma relação inesperada da estruturação destas comunidades com a distribuição geográfica das amostras analisadas. Os resultados demonstram a complexidade da comunidade de bactérias e arqueias ao longo de um gradiente espacial, sugerindo que estudos posteriores devem considerar uma amostragem mais ampla em distintas regiões. Este trabalho é embasador de estudos futuros que visem desenvolver práticas agrícolas baseadas na exploração da funcionalidade dos microbiomas dos solos.

Palavras-chave: Manejo; Física e química do solo; Métodos independentes de cultivo; Modelos de distribuição de abundância; *Network*

ABSTRACT

The diversity of bacteria and archaea in soils cultivated with sugarcane: a biogeographic approach

Sugarcane is currently the most important culture of the State of São Paulo and has a prominent role among the crops in Brazil. Into the context of a better productivity with greater sustainability, the role of the microbial community present in the soil could have huge importance, aiding a better plant development, supplying it with nutrients or reducing the occurrence of diseases and pests. However, little is known about the microbial community existing in soils cultivated with sugarcane, where a knowledge of the spatial distribution of this community could be helpful to a better understanding of the processes that these organisms are involved. This project aimed to study in a biogeographic approach, the bacteria and archaea diversity in soils of sugarcane in the São Paulo State, focusing on the groups of archaea and bacteria. Analyses of a total of 285 soil samples, obtained in 10 producing distinct regions was performed using independent cultivation techniques such as quantification of total abundance by applying quantitative PCR (qPCR), analysis of the community structure by terminal restriction of length polymorphism (T-RFLP) and determination of its phylogenetic affiliation by high-throughput sequencing of 16S ribosomal genes. The results showed that the main drivers of these communities were the physical and chemical characteristics of the soil (pH, granulometry and organic matter). In addition, the results have shown that archaea community was influenced by management practices (mechanical harvest, vinasse and filter cake adding). Additionally, an unexpected relationship between the structures of these communities with the geographic distribution of the samples was observed. The results demonstrate the complexity of the community of bacteria and archaea along a spatial gradient, suggesting that future studies should consider a broader sampling of the distinct regions. This work supports upcoming studies that aim at developing agricultural practices exploring the soil microbiomes functionality.

Keywords: Management; Physical and chemical soil; Culture-independent approaches; Species distribution abundance; Network

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, sendo esta cultura responsável por 2% do PIB nacional com uma movimentação de R\$ 600 bilhões na safra de 2012-2013 (<http://ciagri.iaea.sp.gov.br/nia1/cadeia/cadeiaCana.aspx> - acesso em: 15-09-2014). Atualmente, a produtividade desta cultura é crescente a cada safra, principalmente devido a necessidade de abastecimento do mercado interno com a produção de etanol e o mercado externo com a exportação de açúcar. Como consequência desta crescente demanda, a cultura canavieira vem sofrendo uma crescente expansão agrícola, especialmente na região Centro-Sul, na qual destaca-se o Estado de São Paulo como seu maior produtor.

Esta elevada importância socioeconômica da cana-de-açúcar gera uma importante discussão de questões ambientais e sustentáveis, conduzindo a novos desafios na busca de uma maior produção com uma menor expansão agrícola, evitando assim desmatamentos, ao mesmo tempo em que não comprometa sua rentabilidade. Neste aspecto, diversos trabalhos científicos tiveram como objetivos compreender melhorias nas práticas de manejo e fertilidade do solo, sempre almejando aumentar a sua produtividade (e.g. utilização de vinhaça, torta de filtro e manejo da palhada) (FRAVET et al., 2010; LANDELL et al., 2003; ROBERSON; THORBURN, 2007; SOUZA et al., 2005; UMO, 2011). Outros trabalhos tiveram como foco uma melhor compreensão sobre os possíveis impactos ambientais ocasionados, como por exemplo a emissão de gases do efeito estufa (OLIVEIRA, 2010).

Contudo, apesar da inquestionável importância econômica da cultura para o país, e dos diversos estudos objetivando melhorias na produção juntamente com a minimização de seus impactos ambientais, relatos mais detalhados sobre as comunidades microbianas presentes neste ambiente de produção são necessários. Este ponto se faz presente uma vez que os benefícios da microbiota do solo na ciclagem e disponibilização de nutrientes, e desenvolvimento da própria planta, já foram relatados anteriormente, inclusive demonstrando que algumas bactérias podem atuar como promotoras de crescimento para a cultura canavieira.

Portando, visando contribuir com um melhor conhecimento da comunidade de procariotos no sistema agrícola da cana-de-açúcar, este trabalho objetivou identificar e mapear a diversidade de bactérias e arqueias presentes nos solos de canaviais do Estado de São Paulo, relacionando os dados da estrutura de comunidade microbiana, diversidade e identificação taxonômica com os fatores físicos e químicos do solo, práticas de manejo e produtividade. Seu pioneirismo deve-se a uma ampla exploração desta comunidade

microbiana no Estado, com um enfoque biogeográfico, fazendo uso de uma grande escala espacial. Dentre suas contribuições científicas, podem-se destacar a descrição destas comunidades presentes nestes solos a partir de metodologias independentes do cultivo, o que permitiu traçar importantes correlações ecológicas entre a microbiota dos solos estudados com fatores ambientais intrínsecos de cada região de cultivo da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo.

1.1 Revisão Bibliográfica

1.1.1 O panorama da cana-de-açúcar

O cultivo da cana-de-açúcar ocorre tradicionalmente entre as latitudes 35°N e 35°S. Atualmente, esta cultura enfrenta grandes desafios tecnológicos na busca de aumentar sua produtividade para atender as demandas dos mercados de açúcar e álcool, além de suprir os emergentes programas de bioenergia (BRUNINI, 2008). Sua produtividade anual no Brasil é crescente, com valores aproximados indo de 569 milhões de toneladas na safra de 2008/09 para 659 milhões de toneladas nesta última safra de 2013/14 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2011, 2014). O Estado de São Paulo apresenta-se o maior produtor nacional desta cultura, atingindo valores de 373 milhões de toneladas na safra de 2013/2014, com uma área total de cultivo de aproximadamente 4,6 milhões de hectares plantados (51,31% da área total cultivada no país) e uma expansão agrícola de cerca de 92,5 mil hectares (CONAB, 2014)

Portanto, devido a esta crescente expansão, a cultura canavieira apresenta hoje uma elevada importância socioeconômica, com a criação de novas usinas e áreas de cultivo (especialmente na região Centro- Sul), gerando diversos empregos na forma direta ou indireta. Dentre os crescentes mercados associados à cana-de-açúcar destacam-se: *a)* etanol - devido a sua possibilidade de substituir combustíveis fósseis e, por consequência, diminuir a emissão de gases responsáveis pelo efeito estufa; *b)* açúcar – devido a sua importância na balança comercial brasileira, com a sua exportação; *c)* a cogeração de energética – suprimindo esta demanda do mercado interno a partir da queima do bagaço e da palha; *d)* a utilização dos resíduos provenientes do seu processamento (e.g. vinhaça para a fertilização do solo e bagaço para a produção de plástico entre outros derivados) e; *e)* novas perspectivas industriais com a possível criação do etanol de segunda geração.

Para este cenário, muitos fatores são preponderantes para formação ideal do ambiente de produção canavieiro, como: edáfico climáticos, características físicas e químicas do solo e práticas de manejo (e.g. adição de vinhaça, torta de filtro, calagem, adubação, presença/ausência de palha no campo) (PRADO et al., 2008; MARCHIORI, 2004), as quais podem influir direta e/ou indiretamente na produtividade da cana-de-açúcar. Contudo, mesmo com as constantes melhorias nas práticas de manejo, as quais tem como objetivo minimizar os déficits nutricionais da planta e aumentar a sua produtividade no campo, esta cultura ocupa o segundo lugar no consumo nacional de fertilizantes (aproximadamente 15%) (ROSSETTO; DIAS; VITTI, 2008), apresentando como principais gastos em insumos: fósforo (P), magnésio (Mg), cálcio (Ca), nitrogênio (N) e o potássio (K) (MARCHIORI, 2004).

Os estudos sobre as condições edáfico climáticas para o cultivo da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, na qual as áreas são demarcadas de acordo com a seu potencial de exploração e riscos climáticos (principalmente temperatura e regime hídrico), apontam a existência de basicamente três regiões, sendo a primeira adequada, a segunda adequada com restrições e a terceira com limitações para o plantio desta cultura (Figura 1.1). Portanto, com a expansão da fronteira canavieira, o surgimento de novas práticas de manejo e a constante busca por uma maior produtividade associada a melhores níveis de sustentabilidade desta cultura impulsiona a necessidade de maiores estudos que auxiliem a determinar os fatores limitantes da sua produção, evitando sua expansão para novas áreas (limitando assim o impacto por desmatamentos), sem o comprometimento de sua rentabilidade econômica.

Figura 1.1 - Zoneamento agroambiental para o setor sucroalcooleiro no Estado de São Paulo. Fonte: http://www.ciiagro.sp.gov.br/Zoneamento_Agroambiental/mapas/ZoneamentoAgroambiental.jpg (acessado em: 15-09-2014)

1.1.2 A microbiota do solo e suas perspectivas no cenário agrícola

Os microrganismos representam uma das maiores fontes de biodiversidade do planeta, estando presente nos três domínios da árvore da vida e de forma ubíqua nos mais distintos habitats. O solo é um dos ambientes mais densamente colonizados por esta microbiota, no qual, estima-se que em um grama existam aproximadamente 10^9 células microbianas e cerca de 10^4 (ROESCH et al., 2007) a 10^6 (GANS et al., 2005) espécies bacterianas.

A elevada abundância e diversidade da microbiota nos solo esta diretamente correlacionada a sua funcionalidade, podendo esta, devido as suas complexas interações ecológicas (e.g. mutualismo, parasitismo e competição), exercer um impacto sobre a produtividade das plantas no ambiente agrícola (ELSAS; VAN et al., 2012; SCHNITZER; KLIRONOMOS, 2011; SUÊLDO et al., 2011). Além disso, microrganismos de vida livre, podem influenciar na disponibilidade de nutrientes neste ambiente, participando da decomposição da matéria orgânica e de ciclos biogeoquímicos (carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre), promovendo o crescimento vegetal, suprimindo doenças em plantas, imobilizando/mineralizando nutrientes, degradando os contaminantes do solo e estabilizando a estrutura do solo, sendo estes processos essenciais para o seu desenvolvimento e de outros vegetais que sobrevivem neste ambiente (GARBEVA et al., 2004; GRIFFITHS et al., 2006;

HEIJDEN; BARGETT; STRAALLEN, 2008; MENDES et al., 2011; WAKELIN et al., 2008). Contudo, a comunidade microbiana no solo também pode influenciar de forma negativa sobre a produtividade dos vegetais, competindo por nutrientes do solo e atuando como patógeno para muitas culturas agrícolas (HEIJDEN; BARGETT; STRAALLEN, 2008; MANSFIELD et al., 2012). Portanto, uma melhor compreensão da dinâmica destas comunidades é fundamental para prever as consequências de futuras alterações ambientais e o quanto elas são importantes para o funcionamento dos ecossistemas, sejam eles em ambientes naturais ou agrícolas (CHAPARRO et al., 2012; KONOPA, 2009).

Dentro do contexto agronômico, os estudos buscam constantemente compreender quais os benefícios e malefícios que esta microbiota pode propiciar para cada cultura, assim como, as práticas de manejo e suas correlações com os atributos dos solos que podem modular a estrutura e a funcionalidade desta microbiota. Trabalhos voltados aos efeitos destas práticas sobre a sua comunidade microbiana vêm demonstrando que alguns fatores podem ter papel determinante, como por exemplo a quantidade de matéria orgânica (GARCÍA-ORENES et al., 2013; ŠTURSOVÁ; BALDRIAN, 2010), a adição de quitina (CRETOIU et al., 2013), a incorporação de carvão mineral (KOLTON et al., 2011; LEHMANN et al., 2011), as condições climáticas (BRU et al., 2011), entre outros. Contudo, ainda é distante uma completa compreensão entre toda esta complexa dinâmica de comunidades que colonizam o solo, e também são influenciadas pelas próprias plantas. Neste sentido, um ponto ainda menos explorado em solos agrícolas, se refere a distribuição espacial (enfoque biogeográfico) das comunidades microbianas.

1.1.3 A microbiologia do solo em canaviais

Devido a elevada importância econômica da cultura de cana-de-açúcar e a comprovada eficácia da microbiota associada a este sistema em alguns aspectos, são crescentes os novos estudos sobre a diversidade microbiana associada a esta cultura, especialmente no Brasil. Dentro deste contexto, bactérias associadas às plantas, como por exemplo endófitos (colmo e raiz), ou em associação com as raízes (rizosfera), já foram isoladas e relatadas como benéficas para promoção de crescimento, antagonismo contra patógenos e solubilização de fosfato inorgânico (MENDES et al., 2007; MAGNANI et al., 2010; LUVIZOTTO et al., 2010). Recentemente, Beneduzi et al. (2013) isolou bactérias endofíticas de colmo e raiz e bactérias associadas de rizosfera, em seis locais distintos do Rio Grande do Sul, e avaliou a capacidade das mesmas em promoverem o crescimento vegetal,

atuando na fixação biológica do nitrogênio e na solubilização de fosfato inorgânico. Dentre os resultados, os autores revelam que a comunidade bacteriana avaliada desempenha estas atividades, e que os isolados de cada uma das regiões são distintos, sendo esta ocorrência diferencial atribuída às variações de pH e quantidades de argila nos diferentes solos estudados (BENEDUZI et al., 2013). Portanto, estes resultados sugerem que a comunidade microbiana em solos cultivados com cana-de-açúcar é complexa, podendo apresentar distintos padrões biogeográficos na distribuição de sua estrutura.

Além disso, estudos pontuais (em apenas um região) e com metodologias independentes de cultivo, também demonstraram a complexidade deste sistema microbiano nos solos sob cultivo de cana-de-açúcar. Dini-Andreote e colaboradores (2010) estudando os efeitos da transgenia e da aplicação de herbicida sobre a comunidade de bactérias presentes nestes solos, não encontraram diferenças significativas entre os tratamentos, contudo, descreveram a presença dos filos: *Proteobacteria* (34,7%), *Actinobacteria* (28,1%), *Firmicutes* (16,2%) e *Acidobacteria* (9,7%); e concluíram a necessidade de estudos em outras áreas para compreender quais os fatores ambientais são preponderantes na modulação na estrutura e funcionalidade destas comunidades. Esta conclusão condiz com outros trabalhos posteriores, os quais constataram que práticas de manejo como queimadas e fertilização por nitrogênio podem influenciar na comunidade bacteriana dos solos cultivados com cana-de-açúcar (PISA et al., 2012; RACHID et al., 2013; WALLIS et al., 2011). Portanto, de maneira geral, o intenso uso do solo para o cultivo da cana-de-açúcar, resulta na seleção de grupos microbianos mais adaptados, seja esta exercida por algum dos fatores envolvidos nas práticas culturais ou apenas pela presença da planta, por meio da liberação de exsudatos radiculares. Assim sendo, um amplo estudo da comunidade microbiana em uma escala espacial pode auxiliar a obter uma robusta visualização da mesma; permitindo correlacionar suas alterações com as variações climáticas, ambientais (física e química do solo) e práticas de manejo, afim de compreender quais os principais “*drivers*” (moduladores) destes organismos onipresentes nas áreas de cultivo canavieiro.

Num momento em que diferentes processos vêm sendo atribuídos como desempenhados pelos microbiomas de diferentes ambientes ou de diferentes hospedeiros, seu uso só será possível num incremento da produtividade agrícola se melhor compreendermos as variáveis responsáveis por seu funcionamento.

1.1.4 Metodologias independentes de cultivo no estudo da microbiologia do solo

O cultivo de microrganismos e as técnicas moleculares independentes de cultivos são as metodologias comumente utilizadas para explorar a diversidade microbiana presente no solo. Contudo, o estudo a partir do isolamento de microrganismos em placas, apesar de ser mais tradicional, abrange apenas valores entre 1% a 10% da comunidade microbiana do solo, visto que, selecionam apenas os organismos capazes de sobreviverem a esta condição (NANNIPIERI et al., 2003; TORVISK et al., 2002). Deste modo, esta metodologia acaba fazendo com que muitas informações sobre estas comunidades não sejam obtidas, principalmente devido a alta variabilidade dos ambientes naturais, que contrapõe as condições homogêneas de incubação empregadas neste procedimento (e.g. condições ótimas de nutrientes, temperatura e pH constantes). Portanto, esta subestimativa da diversidade acarreta no comprometimento da capacidade de correlacionar os dados obtidos com as variáveis ambientais, fato que por muito tempo limitou inferências mais robustas sobre possíveis moduladores das estruturas das comunidades microbianas.

Com o advento das metodologias independentes de cultivo ocorreu um grande avanço no estudo da ecologia microbiana (MARTINY et al., 2006). Estas são baseadas na detecção e análise da variabilidade na composição dos ácidos nucleicos (e.g. DNA ou RNA) em amostras ambientais. Atualmente, muitas destas metodologias são fundamentadas na amplificação de um gene ou região alvo por PCR, seja este um dos componentes do *operon* ribossomal (e.g. 16S RNAr para bactérias e arqueias, ou ITS para fungos) para estudos ecológicos e taxonômicos; ou uma região relacionada a uma função específica no ambiente (*nifH* – fixação biológica de nitrogênio; *amoA* – nitrificação; *nirK*, *nosZ* – desnitrificação; *dsrB* – redução de sulfato; *aprA* – redução e oxidação do enxofre; *mcrA* – metanogênese, *pmoA* - metanotrofia) (BERNHARD et al., 2007; GEETS et al., 2006, HANSON; HANSON, 1996; HENCKEL et al., 2000; HENRY et al, 2006; LEININGER et al., 2006).

Posteriormente a escolha do gene alvo, diversas são as metodologias a serem adotadas a fim de responderem as hipóteses do trabalho. Metodologias conhecidas como *fingerprinting* resultam em informações sobre a estrutura da comunidade a partir de um perfil de produtos de amplificação, os quais podem ser diferenciados a partir de alterações nas concentrações de guanina (G) e citosina (C), por meio da metodologia intitulada de gel de eletroforese em gradiente desnaturante (DGGE) (MUYZER et al., 1993); ou por restrição com endonucleases específicas destes *amplicons*, utilizando a técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição terminal (T-RFLP) (LIU et al., 1997). Outra metodologia amplamente

difundida é a de PCR quantitativo (qPCR) (WEIS et al., 1992), na qual fragmentos alvos do DNA/RNA estudados são amplificados e quantificados ao mesmo tempo, obtendo-se ao final valores de número de cópias do gene por grama de solo amostrado em cada ambiente, ou seja, uma estimativa de abundância. Para maiores detalhes, uma revisão sobre estas ferramentas e sua aplicação para a análise da diversidade de comunidades microbianas foi abordada por Andreote et al. (2009).

Contudo, as metodologias de *fingerprint* e qPCR não permitem a identificação taxonômica dos microrganismos, limitando responder a questão: “Quem está no ambiente estudado?”. Para isso, o sequenciamento de genes alvos e/ou da amostra total de DNA/ RNA (metagenômica/metatranscriptômica) é fundamental. Este tipo de análise foi feita por muito tempo baseando-se no sequenciamento de clones, pela metodologia de *Sanger*. Contudo, com o desenvolvimento das metodologias de sequenciamento de segunda geração, e a consequente diminuição dos custos desta técnica, pode-se trabalhar com números mais representativos de sequências, variando de milhares a milhões por amostras, fato que permitiu a melhor exploração da diversidade e funcionalidade de microrganismos nos mais distintos nichos (HALL, 2007).

Um dos primeiros trabalhos sobre a microbiologia do solo aplicando a metodologia de sequenciamento em larga escala no estudo, comparou amostras de solo dos EUA, Canadá e Sul do Brasil, obtendo entre 23.000 a 56.000 sequências do gene 16S ribossomal para cada ambiente estudado (ROESCH et al., 2007). Este e outros trabalhos que empregaram tecnologia semelhante demonstram a presença de um grande número de espécies raras ou desconhecidas nas amostras avaliadas, sendo estes grupos anteriormente não detectados por outras metodologias de sequenciamento (LAUBER et al., 2009; ROESCH et al., 2007; SOGIN et al., 2006). Hoje, o sequenciamento em larga escala vem sendo amplamente utilizado para estudar a ecologia microbiana e para identificar bactérias, arqueias e fungos presentes em diversos ambientes (BUÉE et al., 2009; PORAT et al., 2010). Estudando a comunidade bacteriana em 88 amostras de solos de diferentes ambientes (deserto, floresta e tundras), Lauber et al. (2009) obtiveram 1.501 sequências por amostra e demonstraram que a variabilidade genética apresenta íntima relação com alterações no pH destes ambientes.

Alem das análises focadas em um gene específico, existem metodologias baseadas no sequenciamento do DNA/ RNA total (metagenômica/metatranscriptômica) das amostras. Estas são consideradas como metodologias mais amplas para a obtenção de resultados, visto que permitem contemplar o levantamento da diversidade taxonômica e da funcionalidade do ambiente alvo de estudo, respectivamente. Estas estratégias oferecem também uma alternativa

para a exploração do potencial metabólico de microrganismos que também não são recuperados por métodos baseados em cultivo. Um dos primeiros trabalhos que utilizou esta metodologia reconstruiu genomas bacterianos por meio do sequenciamento do DNA diretamente extraído de amostras de uma mina ácida, a qual é representada por poucos genomas microbianos distintos (TYSON et al., 2004). Em outro exemplo, a composição taxonomica e funcional da comunidade microbiana presente nas amostras de gelo glacial foi descrita, correlacionando os resultados do metabolismo microbiano neste ambiente com a adaptação à psicofilia (SIMON et al., 2009). Em solos, este tipo de análise apresentou como um dos primeiros trabalhos, a comparação da microbiota, suas funcionalidades e potencial biotecnológico com base no sequenciamento do DNA diretamente retirado do solo (TRINGE et al., 2005). Mais recentemente, este tipo de análise vem sendo empregada na descrição de novas enzimas e na identificação da resposta da microbiota do solo a eventos de contaminação (SANGWAN et al., 2012; FIERER et al., 2013). No Brasil, o microbioma presente nos solos de manguezais foi descrito por este tipo de análise (ANDREOTE et al., 2012), no qual os principais microrganismos componentes desta comunidade foram identificados, e a descrição das principais transformações metabólicas envolvidas nos ciclos biogeoquímicos do nitrogênio, carbono e enxofre também foram demonstradas. Além disso, outros biomas brasileiros foram explorados com base neste tipo de metodologia, sendo estes, resumidos em um artigo recentemente publicado por Pylro et al. (2014).

Portanto, as metodologias independentes de cultivos são cada vez mais uma ferramenta robusta para se estudar a ecologia microbiana e a sua funcionalidade nos mais distintos ambientes. Contudo, é importante destacar que não existe uma metodologia perfeita, a qual forneça todo tipo de informação sobre as comunidades microbianas do solo, mas formas mais ou menos adequadas para responder as distintas hipóteses dos trabalhos, focados no tema da ecologia microbiana. Comparativamente, é possível verificar a vantagem de metodologias baseadas em PCR, devido ao melhor detalhamento no acesso ao grupo alvo (maior cobertura de análise, por exemplo), enquanto que as ômicas (metagenômica/metatranscriptômica) geram dados mais completos sobre taxonomia e funções microbianas, porém com uma cobertura menor da comunidade (normalmente representando principalmente os grupos mais abundantes), assim como os maiores custos para a obtenção dos dados e a análises dos mesmos, os quais requerem habilidades específicas e na grande maioria das vezes recursos computacionais de grande capacidade de processamento e tempo de análise.

1.1.5 Biogeografia microbiana

A biogeografia é definida como estudo da distribuição espacial e/ou temporal da diversidade. Esta área do conhecimento é amplamente aplicada a estudos de organismos eucariotos mais complexos (*e.g.* animais e plantas), nos quais distintos padrões biogeográficos de distribuição das espécies são constantemente observados (HAWKINS et al., 2003). Por décadas os estudos na área de biogeografia veem auxiliando a maior compreensão dos conceitos ecológicos, principalmente, dos mecanismos que mantem e geram a diversidade, como: especiação, dispersão, interação e evolução entre as espécies (FIERER, 2008). Contudo, estes padrões biogeográficos de comportamentos distintos para a comunidade microbiana ainda são controversos, o que os coloca atualmente sob intenso debate pela comunidade científica (MAZARIS et al., 2010). O principal fator que possibilitou o estudo da distribuição espaço-temporal da comunidade microbiana foi o desenvolvimento das técnicas independentes de cultivo (*e.g.* DGGE, T-RFLP e sequenciamento em larga escala), as quais, permitiram representar de maneira confiável as comunidades microbianas (MARTINY et al., 2006). Atualmente, a comunidade científica busca avaliar possíveis variações na estrutura da comunidade dos microrganismos abrangendo grandes escalas espaciais ou temporais, a partir do estudo destas diferenças filogenéticas e/ou funcionais, as quais, permitem correlacioná-las com as variações ambientais e históricas, auxiliando assim, a elucidar mecanismos na área da ecologia microbiana (MARTINY et al., 2006; RAMETTE; TIEDJE, 2007). Portanto, essa compreensão da biogeografia microbiana e suas correlações com fatores como: atributos físicos e químicos do solo, propriedades climáticas, manejo do solo, cobertura vegetal; são fundamentais não apenas para compreender a funcionalidade dos microrganismos no ecossistema, mas também, os impactos causados pelo uso da terra entre outras atividades humanas (RANJARD et al., 2010).

Recentemente, Martiny e colaboradores (2006) propuseram um conjunto de quatro hipóteses que podem explicar os possíveis comportamentos biogeográficos de uma comunidade microbiana. Neste trabalho, os autores englobam em seus conceitos um gradiente de fatores abióticos e bióticos (habitats) e/ou um legado de variações históricas (províncias). Na primeira hipótese, nomeada de nula, os microrganismos apresentam uma distribuição uniforme, existindo apenas um habitat e uma província, ou seja, não apresentam distintos padrões biogeográficos na comunidade estudada. A segunda chamada de hipótese de Baas-Becking (*“ everything is everywhere, but the environment selects ”*), reflete a existência de múltiplos habitats e uma única província, ou seja, os microrganismos estão em todos os

lugares devido a sua capacidade de dispersão e colonização, porém as variações ambientais selecionam, tornando alguns grupos mais abundantes e ativos em cada ambiente. A terceira hipótese baseia-se na existência de um único habitat e múltiplas províncias, sendo os padrões encontrados nesta comunidade provenientes exclusivamente de fatores históricos que levaram a uma limitação na dispersão das comunidades microbianas, estando isto normalmente correlacionado ao efeito da distância sobre a beta-diversidade. Por último, a quarta hipótese adota que tanto os fatores bióticos e abióticos (habitats), como o legado histórico da área (províncias) podem influenciar na biogeografia microbiana (MARTINY et al., 2006).

Dentro deste contexto, cabe ressaltar que a hipótese nula é rejeitada por diversos autores na comunidade científica, visto que, diversos trabalhos demonstraram que a estrutura da comunidade microbiana pode diferir ao longo do espaço (CHO; TIEDJE, 2000; FULTHORPE et al., 2008; ODA et al., 2003). Uma das hipóteses mais aceitas é a de *Baas-Becking*, na qual, características ambientais como: pH (FIERER; JACKSON, 2006), disponibilidade de água no solo (ANGEL et al., 2010), cobertura vegetal (HOSSAIN; SUGIYAMMA, 2010) entre outros fatores, já foram correlacionados como moduladores da estrutura da comunidade microbiana. Contudo, outros autores consideraram que a variabilidade microbiana ao longo de um gradiente espacial seja resultado não apenas de fatores ambientais, mas também, de questões históricas, a qual é representada diretamente por limites de dispersão; ou seja, uma correlação negativa entre a distância geográfica e a beta diversidade (GREEN; BOHANNAN; WHITAKER, 2008).

Devido a esta elevada importância dos estudos na área de ecologia microbiana, a França criou recentemente programas para monitorar a biodiversidade dos solos (*“Réseau de Mesures de la Qualité des Sols”* (RMQS) e o ECOMIC-RMQS), sendo estes, destinados a compreender os distintos padrões de distribuição biogeográfica da comunidade microbiana (RANJARD et al., 2010). Estudos prévios deste grupo originaram mapas de intensidade sobre a ocorrência de grupos específicos componentes da comunidade bacteriana, demonstrando a sua distribuição espacial nos solos, e correlacionando as mesmas com flutuações nas características físicas e químicas do solo, na cobertura vegetal e também com a distância geográfica entre as amostras, limitante para a distribuição de alguns grupos microbianos. Bru e colaboradores (2010) efetuaram estudos nestes solos franceses, abrangendo uma área de 31.500 Km², e observaram diferenças na abundância da comunidade microbiana relacionada ao ciclo do nitrogênio, e que a comunidade total de bactérias e arqueias foram influenciadas por fatores como pH, K, Mg e distância espacial. Além disso, como resultados destes grupos de estudo na França, outro trabalho efetuou uma análise de 2.085 amostras de solos, e

demonstrou que a comunidade microbiana é regida de forma similar a comunidade de macrorganismos, onde os fatores de dispersão e extinção são preponderantes para manter esta diversidade espacial na comunidade (RANJARD et al., 2013). Trabalhos sobre biogeografia abrangendo solos agrícolas demonstraram diferenças entre os sistemas de uso da terra e ambientes florestais (JESUS et al., 2009; HOSSAIN; SUGIYAMA, 2011) relacionando como fatores preponderam para modular estas comunidades o pH e a textura do solo (representada pelo teor de argila) (LAUBER et al., 2008).

Portanto, o conhecimento da diversidade microbiana, a partir de estudos com um enfoque biogeográfico, pode propiciar um mapeamento da diversidade microbiana e sua correlação com os principais fatores ambientais e históricos que podem modular a ocorrência diferencial de grupos. Assim sendo, estes conhecimentos dentro de um cenário agrícola podem contribuir para o desenvolvimento de melhores práticas agrícolas no futuro, contribuindo para uma maior eficiência e sustentabilidade na produção, além de servir como um modelo de estudo eficiente para novos conhecimentos na área da ecologia microbiana.

1.1.6 Modelos de distribuição da abundância

O conceito de distribuição de abundâncias das espécies (*species abundance distribution-SAD*) trata da descrição da abundância de indivíduos dentro de cada uma das distintas espécies encontradas em uma comunidade, sendo este uma das bases mais antigas aplicadas a estudos de ecologia (MCGILL et al., 2007). O resultado final deste tipo de análise é representado por uma distribuição hiperbólica das frequências das espécies, onde os organismos raros constituem uma longa cauda, com seu conjunto representando uma elevado números de indivíduos; e os mais abundantes aparecem graficamente como uma curva descendente. Estes conhecimentos são fundamentais para a área da ecologia, visto que possibilitam compreender a comunidade, fato que permitiu o surgimento de diversos modelos. Dentre estes, os principais na área de ecologia microbiana são relacionados com as teorias de distribuição determinista ou neutra da comunidade. No modelo neutro a distribuição das espécies ocorre em função das suas taxas de imigração e todos os organismos possuem a mesma chance de ocupação dos nichos presentes no ambiente (HUBBELL, 2001). O modelo determinista é fundamentado na variação da composição das espécies devido a ocupação de nichos específicos (FEINSTEIN; BLACKWOOD, 2012a). Portanto, para trabalhos com enfoque biogeográfico, os estudos de modelos de distribuição da abundância podem auxiliar a

elucidar quais das principais suposições nesta área são mais adequadas para explicar a variação na estrutura das comunidades (MCGILL et al., 2007).

Referências

- 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.; JIMENEZ, D.J.; CHAVES, D.; DIAS, A.C.F.; LUVIZOTTO, D.M.; DINI-ANDREOTE, F.; FASANELLA, C.C.; LOPEZ, M.V.; BAENA, S.; TAKETANI, R.G.; SOARES, I.M. The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 6, p. 1-14, 2012.
- ANGEL, R.; SOARES, M.I.M.; UNGAR, E.D.; GILLOR, O. Biogeography of soil archaea and bacteria along a steep precipitation gradient. **ISME Journal**, New York, v. 4, p. 553-563, 2010.
- BENEDUZI, A.; MOREIRA, F.; COSTA, P.B.; VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; FAVRETO, R.; BALDANI, J.I.; PASSAGLIA, L.M.P. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil, **Applied Soil Ecology**, Amesterdam, v. 63, p. 94–104, 2013.
- BERNHARD, A.E.; TUCKER, J.; GIBLIN, A.E.; STAHL, D.A. Functionally distinct communities of ammonia-oxidizing bacteria along an estuarine salinity gradient. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 9, p. 1439-1447, 2007.
- BRU, D.; RAMETTE, A.; SABY, N.P.A.; DEQUIEDT, S.; RANJARD, L.; JOLIVET, C.; ARROUAYS, D.; PHILIPPOT, L. Determinants of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities at the landscape scale. **The ISME Journal**, New York, v. 5, n. 3, p. 532–542, 2011.
- BRUNINI, O. Ambientes climáticos e exploração agrícola da cana-de-açúcar. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. **Cana-de- açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. v. 1, p. 205-220.
- BUÉE, M.; REICH, M.; MURAT, C.; MORIN, E.; NILSSON, R.H.; UROZ, S.; MARTIN, F. 454 pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. **New Phytologist**, Cambridge, v. 184, p. 449-456, 2009.
- CHAPARRO, J.M.; JACQUELINE M.; SHEFLIN, A.M.; MANTER, D.K.; VIVANCO, J.M. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 48, n. 5, p. 489–499, 2012.
- CHO, J.C.; TIEDJE, J.M. Biogeography and degree of edemicity of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 1494-1505, 2000.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. Brasília, 2011. p. 1-14. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. Brasília, 2014. p. 1-14.

CRETOIU, M.S.; KORTHALS, G.W.; VISSER, J.H.M.; ELSAS, J.D. Chitin amendment increases soil suppressiveness toward plant pathogens and modulates the actinobacterial and oxalobacteraceal communities in an experimental agricultural field. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 79, n. 17, p. 5291–301, 2013.

DINI-ANDREOTE, F.; ANDREOTE, F.D.; COSTA, R.; TAKETANI, R.G.; ELSAS, J. D.; ARAÚJO, W.L. Bacterial soil community in a Brazilian sugarcane field. **Plant and Soil**, London, v. 336, n. 1/2, p. 337–349, 2010.

ELSAS, J.D. van; CHIURAZZI, M.; MALLON, C.; ELHOTTOVA, D.; KRISTUFEK, V.; SALLES, J.F. Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 4, p. 1159–1164, 2012.

FEINSTEIN, L.M.; BLACKWOOD, C.B. Taxa-area relationship and neutral dynamics influence the diversity of fungal communities on senesced tree leaves. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 14, n. 6, p. 1488–1499, 2012.

FIERER, N. Microbial biogeography: patterns in microbial diversity across space and time. In: ZENGLER, K. (Ed.). **Accessing uncultivated microorganisms: from the environment to organisms and genomes and back**. Washington: ASM Press, 2008. p. 95-115.

FIERER, N.; JACKSON, R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. Biogeography and degree of endemism of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 103, n. 3, p. 626-631, 2006.

FIERER, N.; LADAU, J.; CLEMENTE, J.C.; LEFF, J.W.; OWENS, S.M.; POLLARD, K.S.; KNIGHT, R.; GILBERT, J.A.; MCCULLEY, R.L. Reconstructing the microbial diversity and function of pre-agricultural tallgrass prairie soils in the United States. **Science**, New York, v. 342, n. 6158, p. 621-624, 2013.

FRAVET, P.R.F.; SOARES, A.B.; LANA, R.M.Q.; LANA, A.M.Q.; KORNDÖRFER, G.H. Efeito de doses de torta sobre a produtividade e qualidade tecnológica da soqueira de cana-de-açúcar. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 3, p. 618–624, 2010.

FULTHORPE, R.R.; ROESCH, L.F.W.; RIVA, A.; TRIPLETT, E.W. Distantly sampled soils carry few species in common. **The ISME Journal**, New York, v. 2, p. 901-910, 2008.

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

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

- GARCÍA-ORENES, F.; MORUGÁN-CORONADO, A.; ZORNOZA, R.; SCOW, K. Changes in soil microbial community structure influenced by agricultural management practices in a mediterranean agro-ecosystem. **PloS one**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. e80522, 2013.
- GEETS, J.; BORREMANS, B.; DIELS, L.; SPRINGAEL, D.; VANGRONSVELD, J.; LELIE, D.; VANBROEKHOVEN, K. DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 66, p. 194–205, 2006.
- GREEN, J.L.; BOHANNAN, B.J.M.; WHITAKER, R.J. Microbial biogeography: from taxonomy to traits. **Science**, New York, v. 320, n. 5879, p. 1039–1043, 2008.
- 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.
- HALL, N. Advanced sequencing technologies and their impacts in microbiology. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 209, p. 1518–1525, 2007.
- HANSON, R.S.; HANSON, T.E. Methanotrophic bacteria. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 60, p. 439–471, 1996.
- HAWKINS B.A.; FIELD, R.; CORNELL, H.V.; CURRIE, D.J.; GUEGAN, J.F.; KAUFMAN, D.M.; KERR, J.T.; MITTELBAACH, G.G.; OBERDORFF, T.; O'BRIEN, E.M.; PORTER, E.E.; TURNER, R.G. Energy, water, and broad- scale geographic patterns of species richness. **Ecology**, New York, v. 84, p. 3105–3117, 2003.
- HEIJDEN, M.G.A.; BARDGETT, R.D.; STRAALENY, N.M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. **Ecology Letters**, New York, v. 11, p.296–310, 2008.
- HENCKEL, T.; ROSLEV, P.; CONRAD, R. Effects of O₂ and CH₄ on presence and activity of the indigenous methanotrophic community in rice field soil. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 2, p. 666–679, 2000.
- HENRY, S.; BRU, D.; STRES, B.; HALLET, S.; PHILIPPOT, L. Quantitative detection of the nosZ gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, narG, nirK, and nosZ genes in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 5181–5189, 2006.
- HOSSAIN, Z.; SUGIYAMA, S. Geographical structure of soil microbial communities in northern Japan: effects of distance, land use type and soil properties. **European Journal of Soil Biology**, Oxford, v. 47, p. 88–94, 2011.
- HUBBELL, S.P. **The unified neutral theory of biodiversity and biogeography**. Princeton: Princeton University Press, 2001. 102 p.

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

KOLTON, M.; MELLER HAREL, Y.; PASTERNAK, Z.; GRABER, E.R.; ELAD, Y.; CYTRYN, E. Impact of biochar application to soil on the root-associated bacterial community structure of fully developed greenhouse pepper plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 14, p. 4924–4930, doi:10.1128/AEM.00148-11, 2011.

KONOPKA, A. What is microbial community ecology? **ISME Journal**, New York, v. 3, p. 1-8, 2009.

LANDELL, M.G.A.; PRADO, H.; VASCONCELOS, A.C.M.; PERECIN, D.; ROSSETO, R.; BIDOIA, M.A.P.; SILVA, M.A.; XAVIER, M.A. Oxisol subsurface chemical attributes. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 4, p. 741–745, 2003.

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

LAUBER, C.L.; STRICKLAND, M.S.; BRADFORD, M.A.; FIERER, N. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 9, p. 2407–2415, 2008.

LEHMANN, J.; RILLIG, M.C.; THIES, J.; MASIELLO, C.A.; HOCKADAY, W.C.; CROWLEY, D. Biochar effects on soil biota: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 43, n. 9, p. 1812–1836, 2011.

LIU, W.; MARSH, T.L.; CHENG, H.; FORNEY, L.J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n. 11, p. 4516–4522, 1997.

LUVIZOTTO, D.M.; MARCON, I.; ANDREOTE, F.D.; DINI-ANDREOTE, F.; NEVES, A.A.C.; ARAÚJO, W.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Genetic diversity and plant-growth related features of *Burkholderia spp.* from sugarcane roots. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, London, v. 26, p. 1829–1836, 2010.

MAGNANI, G.S.; DIDONET, C.M.; CRUZ, L.M.; PICHETH, C.F.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 1, p. 250-258, 2010.

MANSFIELD, J.; GENIN, S.; MAGORI, S.; CITOVSKY, V.; SRIARIYANUM, M.; RONALD, P.; DOW, M.; VERDIER, V.; BEER, S.V.; MACHADO, M.A.; TOTH, I.; SALMOND, G.; FOSTER, G.D. Top 10 plant pathogenic bacteria im molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 13, n. 6, p. 614–629, 2012.

MARCHIORI, L.F.S. **Influência da época de plantio e corte na produtividade da cana-de-açúcar**. 2004. 273 p. Tese (Doutorado em Fitotecnica) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

MARTINY, J.B.H.; BOHANNAN, B.J.; BROWN, J.H.; COLWELL, R.K.; FUHRMAN, J.A.; GREEN, J.L.; HORNER-DEVINE, M.C.; KANE, M.; KRUMINS, J.A.; KUSKE, C.R.; MORIN, P.J.; NAEEM, S.; OVREAS, L.; REYSENBACH, A.; SMITH, V.H.; STALEY, J.T. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, p. 102-112, 2006.

MAZARIS, A.D.; MOUSTAKA-GOUNI, M.; MICHALOUDI, E.; BOBORI, D.C. Biogeographical patterns of freshwater micro- and macroorganisms: a comparison between phytoplankton, zooplankton and fish in the eastern Mediterranean. **Journal of Biogeography**, Oxford, v.37, p. 1341–1351, 2010.

MCGILL, B.J.; ETIENNE, R.S.; GRAY, J.S.; ALONSO, D.; ANDERSON, M.J.; BENECHA, H.K.; DORNELAS, M.; ENQUIST, B.J.; GREEN, J.L.; HE, F.; HURLBERT, A.H.; MAGURRAN, A.E.; MARQUET, P.A.; MAURER, B.A.; OSTLING, A.; SOYKAN, C.U.; UGLAND, K.I.; WHITE, E.P. Species abundance distributions: moving beyond single prediction theories to integration within an ecological framework. **Ecology Letters**, Oxford, v. 10, n. 10, p. 995–1015, 2007.

MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; ARAÚJO, W.L.; RAAIJMARKERS, J.M. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 22, p. 7259-7267, 2007.

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

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

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

OLIVEIRA, B.G. **Vinhaça da cana-de-açúcar: fluxos de gases de efeito estufa e comunidades de archaea presente no sedimento do canal de distribuição**. 2010. 96 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PISA, G.; MAGNANI, G.S.; WEBER, H.; SOUZA, E.M.; FAORO, H.; MONTEIRO, R.A.; DAROS, E.; BAURA, V.; BESPALHOK, J.P.; PEDROSA F.O.; CRUZ, L.M. Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 44, n. 12, p. 1215– 1221, 2011.

PORAT, I.; VISHNIVETSKAYA, T.A.; MOSHER, J.J.; BRANDT, C.C.; YANG, Z.; BROOKS, S.C.; LIANG, L.; DRAKE, M.M.; PODAR, M.; BROWN, S.D.; PALUMBO, A.V. Characterization of archaeal community in contaminated and uncontaminated surface stream sediments. **Microbial Ecology**, New York, v. 60, p. 784-795, 2010.

PRADO, H.; JUNIOR, A.L.P.; GARCIA, J.C.; MORAES, F.L.; CARVALHO, J.P.; DONZELI, P.L. Solos e ambientes de produção. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. **Cana-de-açúcar**. Ribeirão Preto: Instituto Agrônômico, 2008. v. 1, p. 179-204.

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

RACHID, C.T.C.C.; SANTOS, A.L.; PICCOLO, M.C.; BALIEIRO, F.C.; COUTINHO, H.L.C.; PEIXOTO, R.S.; TIEDJE, J.M.; ROSADO, A.S. Effect of sugarcane burning or green harvest methods on the Brazilian Cerrado soil bacterial community structure. **PloS one**, San Francisco, v. 8, n. 3, p. e59342, 2013.

RAMETTE, A.; TIEDJE, J.M. Biogeography: an emerging cornerstone for understanding prokaryotic diversity, ecology, and evolution. **Microbial Ecology**, New York, v. 53, p. 197-207, 2007.

RANJARD, L.; DEQUIEDT, S.; CHEMIDLIN PRÉVOST-BOURÉ, N.; THIOULOUSE, J.; SABY, N.P.A.; LELIEVRE, M.; MARON, P.A.; MORIN, F.E.R.; BISPO, A.; JOLIVET, C.; ARROUAYS, D.; LEMANCEAU, P. Turnover of soil bacterial diversity driven by wide-scale environmental heterogeneity. **Nature Communications**, New York, v. 4, p. 1434, 2013.

RANJARD, L.; DEQUIEDT, S.; JOLIVET, C.; SABY, N.P.A.; THIOULOUSE, J.; HARMAND, J.; LOISEL, P.; RAPAPORT, A.; FALL, S.; SIMONET, P.; JOFRE, R.; BOURÉ, N.C.; MARON, P.; MOUGEL, C.; MARTIN, M.P.; TOUTAIN, B.; ARROUAYS, D.; LEMANCEAU, P. Biogeography of soil microbial communities: a review and description of the ongoing French national initiative. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 30, p. 359-365, 2010.

ROBERSON, F.A.; THORBURN, P.J. Management of sugarcane harvest residues : consequences for soil carbon and nitrogen. **Australian Journal of Soil Research**, B. Sing, v. 45, p. 13–23, 2007.

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

ROSSETTO, R.; DIAS, F.L.F.; VITTI, A.C. Fertilidade do solo, nutrição e adubação. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. **Cana-de-açúcar**. Ribeirão Preto: Instituto Agrônômico, 2008. v. 1, p. 221-238.

SANGWAN, N.; LATA, P.; DWIVEDI, V.; SINGH, A.; NIHARIKA, N.; KAUR, J.; ANAND, S.; MALHOTRA, J.; JINDAL, S.; NIGAM, A.; LAL, D.; DUA, A.; SAXENA, A.; GARG, N.; VERMA, M.; KAUR, J.; MUKHERJEE, U.; GILBERT, J.A.; DOWD, S.E.; RAMAN, R.; KHURANA, P.; KHURANA, J.P.; LAL, R. Comparative metagenomic analysis of soil microbial communities across three hexachlorocyclohexane contamination levels. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 9, e46219, 2012.

SCHNITZER, S.; KLIRONOMOS, J. Soil microbes drive the classis plant diversity-productivity pattern. **Ecology**, New York, v. 92, n. 2, p. 296–303, 2011.

SIMON, C.; WIEZER, A.; STRITTMATTE, A.W.; DANIEL, R. Phylogenetic diversity and metabolic potential revelead in a glacier ice metagenome. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 7519–7526, 2009.

SOGIN, M.L.; MORRISON, H.G.; HUBER, J.A.; MARK WELCH, D.; HUSE, S.M.; NEAL, P.R.; ARRIETA, J.M.; HERNDL, G.J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 32, p. 12115–121120, 2006.

SOUZA, Z.M. de; PRADO, R.M.; CLARET, A.; PAIXÃO, S.; CESARIN, G. Sistemas de colheita e manejo da palhada de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 3, p. 271–278, 2005.

ŠTURSOVÁ, M.; BALDRIAN, P. Effects of soil properties and management on the activity of soil organic matter transforming enzymes and the quantification of soil-bound and free activity. **Plant and Soil**, The Hague, v. 338, n. 1/2, p. 99–110, 2010.

TORSVIK, V.; DAAE, F.L.; SANDAA, R.-A.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v. 5, p. 240–245, 2002.

TRINGE, S.G.; VON MERING, C.; KOBAYASHI, A.; SALAMOV, A.A.; CHEN, K.; CHANG, H.W.; PODAR, M.; SHORT, J.M.; MATHUR, E.J.; DETTER, J.C.; BORK, P.; HUGENHOLTZ, P.; RUBIN, E.M. Comparative metagenomics of microbial communities. **Science**, New York, v. 308, n. 5721, p. 554-557, 2005.

TYSON, G.W.; CHAPMAN, J.; HUGENHOLTZ, P.; ALLEN, E.E.; RAM, R.J.; RICHARDSON, P.M.; SOLOVYEV, V.V.; RUBIN, E.M.; ROKHSAR, D.S.; BANFIELD, J.F. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. **Nature**, London, v. 428, n. 6978, p. 37-43, 2004.

UMO, R.E.S. Estudo explanatório do uso da vinhaça ao longo do tempo. I. Características do solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 15, n. 1, p. 22–28, 2011.

WAKELIN, S.A.; MACDONALD, L.M.; ROGERS, S.L.; GREGG, A.L.; BOLGER, T.P.; BALDOCK, J.A. 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.

WALLIS, P.D.; HAYNES, R.J.; HUNTER, C.H.; MORRIS, C.D. Effect of land use and management on soil bacterial biodiversity as measured by PCR-DGGE. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 46, p. 147-150, 2010.

WEIS, J.H.; TAN, S.S.; MARTIN, B.K.; WITTEWER, C.T. Detection of rare mRNAs via quantitative RT-PCR. **Trends in Genetics**, London, v. 8, p. 263–264, 1992.

2 O MICROBIOMA BACTERIANO EM SOLOS CANAVIEIROS: COMPREENDENDO SUA ECOLOGIA E SEUS PRINCIPAIS MODULADORES

Resumo

A cultura da cana-de-açúcar é de extrema importância para o Brasil devido principalmente aos crescentes mercados de açúcar e etanol. A elevada demanda por esses produtos resulta em uma expansão crescente de áreas cultivadas e um aumento na utilização de insumos para esta cultura, onde há uma busca constante por alternativas mais sustentáveis para o seu cultivo. Atualmente, sabe-se que os microrganismos são de extrema importância em processos biogeoquímicos do solo e participam de importantes interações benéficas com as plantas. Portanto, o conhecimento das comunidades microbianas em solos agrícolas apresenta-se como uma questão central e com grande potencial de inovação para o desenvolvimento de novas práticas agrícolas. O objetivo deste trabalho foi acessar, numa análise de biogeografia, o microbioma bacteriano em 10 áreas de cultivo de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo. No total, 285 amostras de solo tiveram seu bacterioma descritos, e posteriormente correlacionados com as propriedades físicas e químicas destes solos; e suas práticas agrícolas. A abundância de bactérias nesses solos revelou ser similar (entre 10^9 e 10^{10} cópias do gene 16S rRNA/g de solo), enquanto que a sua estrutura da comunidade foi altamente variável como indicado pelas análises de T-RFLP e sequenciamento em larga escala (ambos abrangendo o gene 16S do rRNA como alvo). A análise de interações biológicas, realizadas por meio de *network*, indicaram correlação positiva entre *Proteobacteria* e *Acidobacteria*, os quais se correlacionaram negativamente com *Actinobacteria*. Além da análise de interações biológicas, a análise de redundância parcial indicou que características de solo (como pH e granulometria) se sobrepõem aos efeitos de práticas de manejo e distância na estruturação das comunidades bacterianas. Contudo, os efeitos da distância geográfica foram significativos para as comunidades raras, sugerindo que estas são mais susceptíveis aos fatores relacionados ao limite de dispersão bacteriana em solos. Estes resultados constituem uma primeira avaliação profunda das comunidades bacterianas em canaviais, descrevendo os principais moduladores que atuam sobre as comunidades bacterianas em solos agrícolas, apoiando o desenvolvimento das tecnologias baseadas microbioma.

Palavras-chave: Biogeografia; Modelos de distribuição de abundância; *Network*

Abstract

Sugarcane is an economically important crop in Brazil, because of the growing market of sugar and ethanol. The increasing demand for these products is leading to the expansion of the sugarcane plantations and agricultural traits, where there is a constant search for more suitable alternatives for its cultivation. Currently, it is known that microorganisms are extremely important for biogeochemical processes on the soil and are involved in important interactions that are beneficial for the plants. Therefore, the knowledge of the microbial communities present in agricultural soils is a central question and constitutes one of the pillars for innovations in agricultural practices. This work aimed to deeply describe the structure of bacteriomes across 10 areas of sugarcane cultivation the São Paulo State (Southeast Brazil). In total, 285 samples have their bacteriome depicted, and further correlated with physical and chemical properties of these soils, and their agricultural practices adopted in each area. The abundance of bacteria in these soils revealed to be similar (10^9 to

10^{10}), while its structure was highly variable, as indicated by T-RFLP and sequence-based analyses (both targeting the 16S rRNA gene). Interactions of most abundant bacterial phyla, indicated by network analysis, showed a positive correlation between *Proteobacteria* and *Acidobacteria*, and a negative correlation of these groups with *Actinobacteria*. Besides biological interactions, partial redundancy analysis stated that soils characteristics (pH and granulometry) outpaced agricultural practices and geographic distance effects. However, the effects of the geographic distance were more significant for rare communities, suggesting that they are more susceptible to dispersal limitation. These results constitute a first deep assessment of bacterial communities in sugarcane fields, describing dominant effectors acting upon bacterial communities in agricultural soils, supporting further development of microbiome-based technologies.

Keywords: Biogeography; Species abundance distribution; Network

2.1 Introdução

A cana-de-açúcar é importante economicamente principalmente para os países em desenvolvimento, visto que cerca de 80% do açúcar produzido no mundo provem desta cultura (PINHEIRO et al., 2010). Além disso, esta serve como matéria-prima para outros produtos, como por exemplo a produção de etanol, o qual tem um papel de destaque devido à sua perspectiva de substituir os combustíveis fósseis (HIRA, 2011). Portanto, as linhas de pesquisa nesta área buscam constantemente compreender os mecanismos que possam elevar a produtividade desta cultura de forma sustentável.

Neste sentido, a comunidade microbiana do solo pode desempenhar um papel essencial, uma vez que contribui para o melhor desenvolvimento da planta, auxiliando no suprimento nutricional e inibindo a ocorrência de doenças (GARBEVA et. al, 2004). Atualmente, estima-se que cerca de 10^9 células microbianas estejam presentes em um grama de solo, sendo que, existem aproximadamente 10^4 a 10^7 espécies distintas neste ambiente (GANS; WOLINSKY; DUNBAR, 2005; MARTINY et al., 2006; ROESCH et al., 2007). Sabe-se que esta complexidade da comunidade microbiana tem papel crucial para a funcionalidade do sistema, propiciando benefícios como a ciclagem de nutrientes, participando ativamente nos ciclos biogeoquímicos (carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre), degradação de contaminantes no solo, supressão de patógenos e produção hormônios promotores de crescimento vegetal (GARBEVA et. al, 2004; GRIFFITHS et al., 2006). Não obstante, em solos de canaviais, pesquisas recentes vêm demonstrado que a comunidade bacteriana esta correlacionada com importantes características relacionadas a melhorarias do desenvolvimento da planta, como a promoção do seu crescimento, fixação de nitrogênio e o

controle biológico de patógenos (BENEDUZI et al., 2013; FISCHER et al., 2012; MEHNAZ, 2013; MENDES et al., 2007). No entanto, os conhecimentos desta microbiota em solos agrícolas são em grande parte não compreendidos, com destaque para um melhor conhecimento sobre as principais características deste ambiente que se correlacionam intimamente com a estruturação das comunidades microbianas ali presentes (ANDREOTE; AZEVEDO; ARAÚJO, 2009; BHATTACHARJEE; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2008; SANTI FERRARA et al., 2011).

Visando contribuir para maiores esclarecimentos sobre a ecologia microbiana, estudos recentes na área de biogeografia demonstraram que a comunidade bacteriana do solo se diferencia ao longo de um gradiente espacial (GREEN; BOHANNAN; WHITAKER, 2008; RANJARD et al., 2013). Alguns trabalhos determinaram que fatores ambientais como: o pH (BRU et al., 2011; FIERER; JACKSON, 2006; LANDESMAN; NELSON; FITZPATRICK, 2014; LAUBER et al., 2008); distância geográfica (BRU et al., 2011; GREEN; BOHANNAN, 2006; LANDESMAN; NELSON; FITZPATRICK, 2014; RECHE et al., 2005; WHITAKER; GROGAN; TAYLOR, 2003); teores de argila e carbono no solos (DEQUIEDT et al., 2011; LAUBER et al., 2008); clima e uso da terra (BRU et al., 2011; DRENOVSKY et al., 2010); e práticas de manejo (SAYER et al., 2013) foram os atributos que mais se correlacionaram com a variação da comunidade microbiana.

Portanto, uma abordagem de estudo sobre o bacterioma em uma escala espacial (ênfase biogeográfico) para os solos canavieiros, é fundamental para uma visão robusta dos principais atributos que modulam esta comunidade. Neste contexto, este trabalho está baseado numa ampla amostragem de um gradiente espacial, onde se apresentam áreas de cultivo com as mais distintas variáveis ambientais e práticas de manejo. Tem-se com este desenho experimental os seguintes objetivos: (I) descrever a comunidade bacteriana nos solos canavieiros, (II) inferir sobre interações ecológicas que ocorrem entre os componentes desta comunidade; (IV) identificar as principais variáveis que contribuem na estrutura da comunidade bacteriana em tais solos e (IV) avaliar a adequação desta comunidade aos modelos de distribuição de espécies (estocástico e determinista).

2.2 Material e métodos

2.2.1 Descrição da área, análises físicas e químicas, e extração de DNA do solo

A amostragem foi realizada no ano de 2011, em 10 regiões distintas produtoras de cana-açúcar no Estado de São Paulo, Brasil. Um total de 95 pontos (talhões), com distintas práticas de manejo e propriedades físicas e químicas do solo foram coletados (aproximadamente 10 por região). Em cada talhão foram coletadas três repetições (cada amostra sendo composta por cinco sub-amostras), em uma profundidade de 0 a 20 cm, resultando em um total de 285 amostras (Figura 2.1).

Figura 2.1 - Local das 10 regiões produtoras de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo e seus 95 talhões amostrados

A caracterização das propriedades químicas e físicas dos solos foram avaliadas por meio da análise de granulometria (silte, argila e areia), pH, cátions trocáveis (Ca, Mg, K), fósforo solúvel (P), H + Al e Capacidade de Troca Catiônica (CTC) (RAIJ et al., 2001). As

práticas de manejo foram avaliadas na forma de variáveis qualitativas, sendo estas: adição de vinhaça, carvão vegetal e torta de filtro; mecanismo de colheita (mecanizada ou manual com queima); histórico de cultivo anterior na área; número de corte da cultura e adubação química ou orgânica. Com o intuito de avaliar os parâmetros físicos e químicos de amostras de solo, foi realizado um gráfico de *boxplot* em estilo “violino” (pacote "vioplot"), na plataforma estatística R.

Para a extração do DNA, alíquotas de 0,4 g de solo foram pesadas e extraídas com *PowersoilTM Soil DNA Kit* (Mobio Laboratories, EUA) de acordo com instruções do fabricante.

2.2.2 Quantificação da comunidade bacteriana por PCR quantitativo (qPCR)

A quantificação do número de cópias de genes bacterianos de 16S rRNA em cada amostra de solo foi estimada por meio de reações de PCR quantitativo, utilizando o aparelho *IQ5* (BioRad, EUA), com o sistema *SYBR Green I*. As reações foram realizadas em um volume final de 25 μ L, contendo: 12,5 μ L de *Platinum[®] Quantitative PCR Supermix-UDG* (Invitrogen, Brasil), 0,2 mM de iniciadores *P1* (5'-CCT ACG GGA GCG AGC AG-3') e *P2* (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') (MUYZER, 1993) e 1 μ L (cerca de 50 ng) de DNA molde. As reações foram realizadas com as seguintes condições de ciclo: desnaturação inicial a 98 °C durante 2 min, seguido por 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, 57 °C durante 30 s e 72 °C durante 90 s. Para verificar a especificidade da amplificação, as curvas de desnaturação (*melting*) foram realizadas com temperaturas crescentes, a partir de 72 °C e chegando a 96 °C. As estimativas do log do número de cópias do gene 16S de rRNA por grama de solo foram calculados comparando os valores de *Ct* obtidos com os da curva padrão previamente construídas, a qual foi realizada utilizando de 10^2 a 10^{10} cópias do molde por ensaio ($R^2 = 0,99$). A eficiência do qPCR (E) foi calculado de acordo com a equação $E = [10^{(-1/\text{slope})} - 1]$ e determinada em 90%.

2.2.3 Análise da estrutura das comunidades bacterianas a partir do polimorfismo terminal do fragmento de restrição (*T-RFLP*)

A análise da estrutura da comunidade bacteriana foi realizada com base no *T-RFLP* do gene 16S de rRNA. A amplificação do gene alvo foi realizada usando os iniciadores *8-FM* e *926r* (SCHÜTTE et al., 2009), onde o iniciador 8FM foi marcado com o fluoróforo *6-FAM*.

As reações foram realizadas em um volume final de 50 µl, contendo: 1X Tampão de PCR, 3 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP, 0,2 µM de cada primer, 0,04 U/ µL de Taq DNA polimerase (Fermentas, São Paulo, Brasil) e 1 µL do DNA molde, sendo as condições dos ciclos as seguintes: desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min, seguido por 30 ciclos de 95 °C durante 30 s, 53 °C durante 30 s e 72 °C durante 30 s, com uma extensão final de 72 °C por 10 min. Posteriormente, todas as amostras foram purificadas com isopropanol 75% e aproximadamente 100 ng dos produtos foram clivados com 5 U da enzima *HhaI* (Fermentas, São Paulo, Brasil), segundo recomendações do fabricante. Por fim, estes produtos foram precipitados com acetato de sódio 3 M e EDTA 125 mM, ressuspensos em formamida *Hi-DI* com o marcador *LIZ 600* (Applied Biosystems) e analisados em um sequenciador *ABI 3500* (Applied Biosystems). Para a análise dos picos (*TRFs*) obtidos, foi adotado uma linha de corte de 50 unidades de fluorescência, para remover o “background” das amostras e os resultados transformados e uma matriz de abundância relativa.

2.2.4 Descrição da comunidade bacteriana por sequenciamento em larga escala da região V6 do gene 16S de rRNA

A abordagem taxonômica utilizada para caracterizar as comunidades bacterianas baseou-se no sequenciamento em larga escala utilizando os iniciadores *Bac967fF* (5' - CGC CAA GAA GAA TAC CCT C-3) e *Bac1046R* (5'-CGA CAG CCA TGC ANC ACC T-3) (SOGIN et al., 2006). As sequências de cada amostra foram identificadas pelo uso de marcadores adicionais (barcodes), composto por cinco nucleotídeos, incluídos nos iniciadores *Bac967fF* (<http://vamps.Mbl.edu/>). As reações de *PCR* foram realizadas como propostas anteriormente (SOGIN et al., 2006). Posteriormente, as três repetições de cada amostra (provenientes das repetições dos talhões) foram misturadas de maneira equimolar. Estes produtos foram purificados com *ChargeSwitch® PCR Clean-Up Kit* (Life Technologies), quantificados utilizando o aparelho *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Life Technologies) e submetidos ao sequenciamento usando a plataforma *Ion Torrent Personal Genome Machine System (PGM)* com três chips *Ion 316TM Chip* (Life Technologies) de acordo com (KAVAMURA et al., 2013).

2.2.5 Análise das sequências obtidas

A qualidade das sequências foram verificada usando o programa *CLC Workbench* (CLC Bio, Qiagen), no qual foi adotada como qualidade média o valor de Q20 e as sequências com valores inferiores ou bases não-identificados (NS) foram descartadas. Para remover os iniciadores reversos, foi utilizado o comando de *clip adapters* da plataforma *Galaxy* (BLANKENBERG et al., 2010). O restante das análises foram efetuadas com o programa *Quantitative Insights Into Microbial Ecology – QIIME* (CAPORASO et al., 2010). Resumidamente, os arquivos *FastQ* foram separados em arquivos *.fasta e *.qual a partir do comando *convert_fastaqual_fastq.py*. A separação das amostras de acordo com seus marcadores (*barcodes*) foi feita a partir do comando *split_libraries.py*. Posteriormente, as sequências foram alocadas em um matriz de *OTUs*, usando uma de similaridade de 97%, com o algoritmo *uclust*. A classificação taxonômica foi atribuída usando como comparativo o banco de dados do *Greengenes*. A árvore filogenética foi construída utilizando o algoritmo *FastTree*. Para minimizar os efeitos *bias* de amostragem na análise, o número de sequências foi padronizado a partir da tabela original de *OTUs*, sendo consideradas 4.500 sequências por amostras (DINI-ANDREOTE et al., 2014) para as análises posteriores. Em seguida, um gráfico de abundância taxonômica foi construído e a alfa diversidade foi calculada utilizando o algoritmo *Phylogenetic Distance (PD)*.

2.2.6 A análise de *network*

As relações de co-ocorrência e co-exclusão na comunidade bacteriana foram avaliadas numa análise com todas as amostras sequenciadas, submetidas a análise de *network* realizada no programa *Cytoscape* 3.01 (SAITO et al., 2012), com o pacote *Conet* 1.02b (<http://psbweb05.psb.ugent.be/conet>). A matriz de abundância de todas as *OTUs*, obtidas pelo programa *QIIME*, foi usada como dado de entrada e a análise foi realizada com o tutorial de Lauber (com modificações) a partir do site *Conet* (<http://psbweb05.psb.ugent.be/conet/tutorial4.php>). Basicamente, os parâmetros utilizados foram: pré-processamento e filtragem com o mínimo de 30 sequências por *OTUs*, quatro medidas de similaridade (*Spearman*, *Pearson*, *Kullbackleibler* e *Bray Curtis*) e 1.000 permutações. Os resultados obtidos foram unificados com base na opção de intersecção e *Benjamini-Hochberg*, sendo a correção adotada a partir da taxa de “falsa descoberta” (*false discovery rate* - FDR) com um ajustes de significância de $p < 0,05$. Como resultado, os nós

representam a *OTUs* significativas e as linhas correspondem às correlações positivas (co-ocorrência) ou negativas (co-exclusão).

2.2.7 Correlação entre os dados microbiológicos com as matrizes de características dos solos, manejos adotados e coordenadas geográficas

Cinco matrizes foram adotadas para estas análises; as duas primeiras compostas pelos dados biológicos, ou seja, composição da comunidade bacteriana a partir da abundância relativa do pico de *T-RFLP* (*TRFs*) ou matriz de *OTUs* provenientes da análise de sequenciamento; a terceira composta pelas variáveis do solo, com a descrição física e química dos solos (dados ambientais), a quarta com variáveis qualitativas de práticas agrícolas (manejo); e a quinta obtida a partir das coordenadas geográficas das amostras (matriz de distância). Antes das análises, os dados biológicos foram transformados utilizando o índice de distância de *Bray-Curtis*; as variáveis ambientais foram transformados em *Z-scores*, para reduzir as diferenças entre as unidades (RAMETTE, 2007); e as coordenadas geográficas foram transformadas em *principal coordinates of neighbor matrices* (PCNM) (BORCARD; LEGENDRE, 2002). Todos esses procedimentos foram realizados na plataforma estatística do R, com emprego do pacote "*vegan*".

As variações na estrutura da comunidade bacteriana foram visualizadas a partir da Análise de Coordenadas Principais (*PCoA*), a qual demonstra a distância relativa entre as amostras, permitindo uma visão robusta da distribuição destas, com base na heterogeneidade na composição destas comunidades (beta diversidade) (LEGENDRE; LEGENDRE, 2012). A correlação das variáveis explicativas com os dados biológicos foi obtida com a análise de redundância parcial (*pRDA*), resultando na explicação das variáveis puras (particionadas), sendo a significância testada por 1.000 permutações aleatórias a partir do teste de *forward selection*, usando a plataforma estatística R com o pacote "*vegan*".

2.2.8 Adequação da comunidade bacteriana dos solos estudados aos modelos de distribuição de espécies (*species abundance distribution - SAD*)

Com a finalidade de melhor compreender a distribuição da abundância das ‘espécies’ componentes das comunidades bacterianas no ambiente canavieiro, duas teorias (estocástico e determinista) de modelos foram avaliadas. Primeiramente foi feito um estudo da comunidade bacteriana total, e posteriormente, esta foi fracionada de acordo com a abundância dos grupos,

formando grupos sob distintos valores de segmentação: 5%, 10% e 20% mais abundante e 50%, 40% e 30% mais raros. A avaliação destas comunidades quanto ao modelo estocástico ocorreram testando-se a adequação ao modelo *Zero Sum Model* – ZSM a partir do programa TeTame (<http://www.edb.ups-tlse.fr/equipe1/chave/tetame.htm>) (CHAVE; ALONSO; ETIENNE, 2006; ETIENNE et al., 2006). Para avaliar a adequação das comunidades quanto ao modelo determinista, estas foram avaliadas utilizando-se os modelos *Broken-Stick* e *Lognormal*, pelo pacote “*radifit*” da plataforma estatística R. O ajuste dos dados obtidos, para comparação entre os modelos, foi realizado utilizando *Akaike information criterion (AIC)* definido como $2(K - \ln(L))$, em que K é o número de parâmetros e L é a estimativa de probabilidade máxima do modelo (CHAVE; ALONSO; ETIENNE, 2006; FEINSTEIN; BLACKWOOD, 2012b). A comparação entre os (AIC) foi realizada pelo delta $AIC (\Delta_i)$, indicando as diferenças entre os valores obtidos para com o menor deles. Posteriormente, o número do modelo mais adequado (menor valor de AIC) de cada amostra foi somado e apresentado em uma Tabela.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Variação das características físicas e químicas dos solos estudados

Para uma melhoria na produtividade, os sistemas agrícolas buscam corrigir as variações na propriedades físicas e químicas do solo a fim de que este apresente um estado nutricional ótimo e uniforme para o desenvolvimento da planta. No entanto, os dados obtidos no presente estudo mostram uma elevada variabilidade nas características dos solos, indicando a complexidade do sistema agrícola usado para o cultivo de cana-de-açúcar, e possivelmente corroborando a hipótese de uma ocorrência diferencial na estrutura da comunidade bacteriana ao longo deste gradiente (Figura 2.2).

Dentre as principais variações dos atributos avaliados, a granulometria (areia, silte e argila) pode estar correlacionada com os locais amostrados. Não obstante, a utilização de algumas práticas agrícolas pode influenciar diretamente sobre algumas características químicas específicas, como: a aplicação da vinhaça, a qual pode elevar os valores de potássio; ou a colheita mecanizada de cana-de-açúcar, a qual aumenta o teor de matéria orgânica, devido à palhada deixada nos campos (LIAO et al., 2013; LIMA et al., 2013).

Portanto, a elevada variabilidade observada dos atributos de física e química do solo, ao longo de uma gradiente espacial, gera um ambiente adequado para quantificar as

contribuições das mais diferentes variáveis na estruturação das comunidades bacterianas dos solos.

Figura 2.2 - Variação dos atributos de física e química dos solos coletados, demonstrando os valores máximos, mínimos e a média. M.O – representa os valores de matéria orgânica

2.3.2 Abundância, estrutura da comunidade bacteriana e classificação taxonômica com base no gene 16S RNAr

A quantificação por PCR quantitativo (qPCR) revelou que a abundância do gene 16S rRNA bacteriano variou entre 10^9 e 10^{10} cópias por grama de solo, com uma baixa

variabilidade entre as regiões produtoras avaliadas (Tabela 2.1). Rachid et al. (2013) comparando os efeitos das estratégias de colheita mecanizada e colheita manual com queima, encontraram valores inferiores para a abundância bacteriana em solos cultivados com cana-de-açúcar. Contudo, estas diferenças entre os estudos podem ser atribuídas a uma maior variabilidade de práticas de manejo e a quantidade de amostras ao longo de um gradiente espacial, as quais foram abordadas neste trabalho.

Tabela 2.1 - Média de quantificação de bactérias das regiões produtoras de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo. Valores apresentados em *log* do numero de copias do gene alvo por grama de solo, seguidos dos valores de desvio

Regiões produtoras	16S RNAr
Área A	9,7 (0,2)
Área B	10,1 (0,14)
Área C	9,9 (0,2)
Área D	9,8 (0,1)
Área E	9,8 (0,15)
Área F	9,8 (0,13)
Área G	10,1 (0,08)
Área I	9,4 (0,18)
Área J	9,6 (0,5)
Área K	9,7 (0,26)
Total	9,8 (0,2)

A variação na estrutura das comunidades bacterianas em 95 talhões de cana-de-açúcar (285 amostras com três repetições), foram comparados pela análise de *T-RFLP*, obtendo-se um total de 683 picos distintos (*TRFs*). Ao avaliar as amostras em uma análise *PCoA* (Figura 2.3), observou-se uma alta variabilidade dentro e entre as regiões produtoras avaliadas. Os resultados demonstraram que algumas unidades produtoras tendem a se agrupar, como por exemplo as áreas G, I e K; e C, D e E; enquanto que as demais (A, B, F e J) mostraram-se distribuídas ao longo do gráfico, ou seja, apresentaram uma maior variabilidade na estrutura da comunidade de bactérias.

Estes resultados demonstram que o ambiente agrícola estudado (cultura de cana-de-açúcar) apresenta uma elevada variação na sua beta diversidade, indicando a existência de padrões biogeográficos em solos agrícolas, assim como relatado anteriormente em outros solos de ambientes naturais ou com distintas culturas agrícolas (KURAMAE et al., 2012; LANDESMAN; NELSON; FITZPATRICK, 2014). Além disso, os resultados desta análise não mostraram diferenças significativas entre as repetições coletadas nos mesmos campos de

cultivo, fato que propiciou a eliminação das réplicas nos talhões para as análises de sequenciamento em larga escala (Figura 2.3).

Figura 2.3 - Análise de coordenadas principais (*PCoA*) baseada nos TRFs das comunidade bacteriana presente nos solos cultivados com cana-de-açúcar. Os valores dos eixos indicam a porcentagem de variação explicada em cada um deles

A afiliação taxonômica das sequências 16S rRNA de bactérias foi realizada por sequenciamento em larga escala utilizando a plataforma *Ion Torrent*. Esta análise foi baseada em 4.500 sequências por amostra (apos o processo de rarificação), num total de 427.500 sequências de alta qualidade (oriundas de um total original de 1.913.328), distribuídas em 60.980 *OTUs* que hospedam sequências com similaridade mínima de 97%.

Analisando conjuntamente todas as amostras, foi observado um valor médio de 15,3% de sequências não classificadas em filos (bactérias não classificadas), enquanto o restante foi afiliado aos filos *Proteobacteria* (23,1%), *Acidobacteria* (21,9%), *Actinobacteria* (19,6%), *Verrucomicrobia* (5,1%), *Gemmatimonadetes* (4,8%), *Nitrospirae* (2,1%), *Chloroflexi* (2,1%), *Planctomycetes* (1,5%), *Firmicutes* (1,4%) e *Bacteroides* (1,0%), além de outros 55 filos, representando 1,9%. Embora os grupos dominantes sejam os mesmos em todas as amostras, a predominância do filo mais abundante variou em algumas áreas. *Proteobacteria* foi o grupo mais abundante na maioria das regiões produtoras (E, F, I e K), mas em alguns caso, este

grupo foi sobreposto por *Acidobacteria* (regiões B, C e G) ou *Actinobactéria* (regiões A, D e J) (Figura 2.4 e Tabela 2.2). Em uma análise mais detalhada, a afiliação das sequências a nível taxonômico de classe revelou como mais abundantes as classes *Alphaproteobacteria* (9,3%), *Betaproteobacteria* (5,8%), *Deltaproteobacteria* (4,9%) e *Gammaproteobacteria* (3,7%) para o filo *Proteobacteria*; *Acidobacteria Gp 6* (6,5%), *Chloracidobacteria* (5,8%) e *Acidobacteria* (5,3%) para o filo *Acidobacteria*; e *Actinobactérias* (11,0%) e *Thermoleophilia* (6,9%) para o filo *Actinobacteria*.

Estes resultados são similares a estudos anteriores feitos em solos cultivados por cana de açúcar. Por exemplo, Dini-Andreote et al. (2010) encontraram como mais abundantes os mesmos filos, sendo que este autores utilizaram a metodologia de sequenciamento por bibliotecas de clones. Não obstante, Rachid et al. (2013) compararam os efeitos de práticas de queima em canaviais, e descreveram, em ordem decrescente de abundância, os filos *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Planctomyces*, *Gemmatimonades* e *Bacteroidetes*, sendo observadas variações nas frequências relativas destes grupos dependendo do manejo agrícola adotado. Trabalhos realizados com outros solos indicam que estes grupos bacterianos (filos e classes) são os mais abundantes na maioria dos casos, o que confere robustez aos dados aqui obtidos (JANSSEN, 2006; KURAMAE et al., 2012; ROESCH et al., 2007). Portanto, pela primeira vez, demonstrou-se a partir de uma análise abrangendo um elevado número de variáveis, a composição e a alteração do microbioma bacteriano em solos cultivados com cana-de-açúcar ao longo de uma gradiente espacial.

Tabela 2.2 - Porcentagem de abundância dos principais filos encontrados em cada uma das regiões produtoras estudadas

	A	B	C	D	E	F	G	I	J	K	Total
<i>Acidobacteria</i>	21,0	24,6	28,7	18,5	22,9	22,8	28,1	23,4	18,6	20,1	22,9
<i>Actinobacteria</i>	25,4	18,1	14,0	31,9	14,4	17,5	15,2	14,2	25,1	20,4	19,6
<i>Bacteroidetes</i>	0,8	1,6	1,1	0,8	0,9	0,8	0,7	1,0	1,2	1,3	1,0
<i>Chloroflexi</i>	2,2	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	2,1	2,3	2,4	2,2	2,1
<i>Firmicutes</i>	0,9	1,4	0,8	1,1	1,7	1,1	0,9	1,3	1,7	2,8	1,4
<i>Gemmatimonadetes</i>	4,3	5,6	4,4	3,6	6,0	7,5	4,8	6,0	3,3	2,7	4,8
<i>Nitrospirae</i>	1,7	1,8	2,0	1,6	3,1	1,9	2,1	3,1	1,5	1,8	2,1
<i>Planctomycetes</i>	1,3	1,3	1,5	1,4	1,6	1,4	1,5	1,8	1,9	1,6	1,5
<i>Proteobacteria</i>	20,6	22,8	22,4	18,4	26,3	21,9	22,4	23,6	20,9	24,2	22,3
<i>Verrucomicrobia</i>	4,4	4,6	6,6	5,0	3,8	5,0	5,0	5,4	5,2	5,9	5,1
Não Classificados	15,5	14,7	14,7	14,4	15,3	16,0	15,1	15,4	16,6	15,5	15,3
Outros	1,8	1,6	2,0	1,4	2,2	2,2	2,1	2,6	1,5	1,6	1,9

Figura 2.4 - Frequências relativas dos principais filos bacterianos encontrados em cada uma das 95 talhões de cana-de-açúcar avaliados neste estudo. Os dados são oriundos da classificação de sequências representativas de cada uma das OTUs obtidas (97% de similaridade) com a distribuição de 4.500 sequências por amostra

Além da afiliação taxonômica, a análise das sequências originou valores de alfa diversidade (*Phylogenetic Distance*) dos solos, que indicaram elevada variância nos valores obtidos entre as regiões produtoras de cana-de-açúcar (Figura 2.5). As amostras das regiões D e G apresentam os valores mais baixos (110,8 e 109,1, respectivamente), enquanto que os

maiores valores são apresentados pelas áreas J e K (130,6 e 128,4, respectivamente) (Figura 2.5). Rodrigues et al. (2013) encontraram uma maior variabilidade da alfa diversidade e menor da beta diversidade em solos de pastagem quando comparado com solos florestais, sugerindo uma homogeneização da comunidade bacteriana causada por práticas agrícolas. Contudo, nossos resultados sugerem que o ambiente agrícola pode ser mais complexo do que se imaginava anteriormente, visto que, a alfa e a beta diversidade apresentaram variações, e indicando que em uma escala maior, pode-se encontrar padrões biogeográficos associados a estes solos.

Figura 2.5 - Valores de alfa diversidade (*Phylogenetic Distance*) obtidos em cada uma das regiões produtoras estudadas. As letras apresentadas nas barras representam as diferenças nas comparações das médias por teste de Tukey, a uma significância de 5% ($p < 0,05$)

2.3.3 Interações bacterianas em solos cultivados com cana

A opção de utilizar a análise de *network* para estudos de co-ocorrência apresenta-se como uma forma eficaz para avaliar gradientes espaciais ou temporais, detectando associações positivas e negativas entre microrganismos, oferecendo novas descobertas sobre as interações ecológicas da comunidade microbiana (BATES; CASAMAYOR; FIERER, 2012). Neste intuito, este trabalho empregou esta análise na tentativa de correlacionar a ocorrência diferencial de grupos bacterianos nos solos de diferentes áreas, e também na

tentativa de atribuir um peso a este fator na estruturação das comunidades de bactérias nos solos analisados.

Os resultados indicaram o comportamento positivo (co-ocorrência) entre os filos *Proteobacteria* e *Acidobacteria*, e a correlação negativa (co-exclusão) destes com OTUs afiliadas ao filo *Actinobacteria* (Figura 2.6). Dentre as correlações negativas do filo *Actinobacteria*, este apresentou 58 e 48 interações com *Acidobacteria* e *Proteobacteria*, respectivamente. Em contraste, as OTUs afiliadas a *Proteobacteria* apresentaram 82 correlações positivas, sendo a maioria delas com *Acidobacteria*, *Nitrospira*, *Planctomycetes* e *Verrucomicrobia*. Avaliando ao nível taxonômico de classe, os grupos mais frequentemente encontrados como correlacionados a demais grupos, dentro do filo *Proteobacteria*, foram *Alphaproteobacteria* e *Betaproteobacteria*, apresentando 44 e 23 correlações positivas e 5 e 12 correlações negativas, respectivamente. Para o filo *Actinobacteria*, as classes *Actinobacteria* e *Thermoleophilia* apresentaram os maiores números de correlações negativas (63 e 68, respectivamente) (Tabela 2.3).

Figura 2.6 - Análise de *Network* por co-ocorrência de OTUs componentes da comunidade de bactéria nos 95 talhões de cana-de-açúcar amostrados. Cada ponto representa uma *OTU* significativa; e as linhas verdes e vermelhas representam as correlações positivas e negativas, estatisticamente significativas ($p < 0,05$), respectivamente

Tabela 2.3 - Número de nós e ocorrências positivas e negativas encontrada nas principais classes

Filos	Classes	<i>OTUs</i>			
		positivo	negativo	total	(nós)
<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteria-5</i>	4	0	4	2
	<i>Acidobacteria-6</i>	19	2	21	11
	<i>Acidobacteriia</i>	0	11	11	4
	<i>Chloracidobacteria</i>	0	12	12	4
	<i>Solibacteres</i>	21	0	21	5
	<i>TMI</i>	6	6	12	2
<i>Actinobacteria</i>	<i>Acidimicrobiia</i>	21	8	29	5
	<i>Actinobacteria</i>	35	63	98	27
	<i>Thermoleophilia</i>	32	68	100	12
<i>ADE3</i>	<i>ABS-6</i>	0	6	6	2
<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineae</i>	0	6	6	2
<i>Gemmatimonadetes</i>	<i>Gemmatimonadetes</i>	3	2	5	2
<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospira</i>	6	6	12	4
<i>Planctomycetes</i>	<i>Phycisphaerae</i>	11	0	11	3
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	44	5	49	16
	<i>Betaproteobacteria</i>	23	12	35	13
	<i>Deltaproteobacteria</i>	15	5	20	7
	<i>Gammaproteobacteria</i>	1	15	16	6

Resultados semelhantes foram descritos em solos de deserto e floresta, nos quais o filo *Actinobacteria* apresentou uma correlação negativa com *Proteobacteria* (XU et al., 2014), o que corrobora os resultados obtidos no presente estudo, e indicam a correlação negativa de

Actinobacteria a outros grupos dominantes, inicialmente observados em solos de áreas naturais, e agora encontrado também em solos utilizados para a atividade agrícola.

Uma das possíveis explicações para isto, baseia-se no fato que as bactérias pertencentes a este filo são conhecidos por serem produtoras de antibióticos que inibem outros grupos bacterianos (GEORGE et al., 2012), podendo esta característica se correlacionar com a competitividade destes organismos, sendo os mesmos eficientes na colonização do solo por meio da inibição de outros grupos abundantes neste ambiente. Outra justificativa possível seria que este grupo prevalece em solos sob condições ambientais mais estressantes para a maioria dos organismos, uma vez que estas bactérias podem formar esporos, como sugerido anteriormente nos solos do semiárido brasileiro (KAVAMURA et al., 2013). Neste caso, esta resistência seria proveniente de características seletivas do ambiente, e não de competição. Em contrapartida, os demais grupos bacterianos com interações positivas (*Proteobacteria* e *Acidobacteria*) podem apresentar interações de sinergismo para a colonização de solos.

Portanto, estes resultados revelaram que a conectividade entre as *OTUs* nestes solos elegem as interações biológicas como um componente chave para a composição e funcionalidade da comunidade bacteriana no solo. Contudo, é necessário ressaltar que estudos mais específicos nesta área são necessários para confirmar a hipótese levantada aqui neste trabalho.

2.3.4 Determinação das variáveis com maior correlação com a estrutura da comunidade bacteriana em solos cultivados com cana-de-açúcar

Além das interações biológicas, fatores ambientais podem ter papel de destaque na estruturação diferencial das comunidades bacterianas. Neste trabalho, a classificação destas variáveis foi realizada por meio da correlação das matrizes de *TRFs* ou *OTUs* com atributos físicos e químicos do solo (dados ambientais), práticas agrícolas (manejo) e distância geográfica das amostras (matriz de PCNM).

A partir da análise de *pRDA* pode-se constatar que as características ambientais (física e química do solo) foram predominantes sobre as práticas de manejo e distância geográfica, sendo portanto, neste contexto, os maiores responsáveis pela variância na estrutura de comunidades bacterianas dos solos analisados (Figura 2.7). Os atributos que mais contribuíram para a variação na explicação da física e química do solo foram: pH, granulometria (argila, areia e silte), fósforo (P), potássio (K), magnésio (Mg), matéria

orgânica e capacidade de troca catiônica (CTC). Para as práticas de manejo, destacaram-se como mais relevantes os fatores: adição de vinhaça, carvão vegetal e torta de filtro, seguidos da colheita mecanizada; e para o efeito de distância, a longitude demonstrou ser mais importante (Tabela 2.4).

Tabela 2.4 - Análise de *forward selection* das matrizes de *OTUs* e *TRFs*, demonstrando a porcentagem de contribuição das variáveis significativas ($p < 0,05$), dentro dos grupos de variáveis: física e química do solo, práticas de manejo e distância

	<i>OTUs</i>	<i>TRFs</i>
Física e química do solo		
pH	5,1	8,9
P	3,9	-
K	3,8	-
Ca	-	-
Mg	3,2	-
CTC	-	6,1
Matéria orgânica	3,8	-
Areia	3,6	1,0
Silte	-	2,6
Argila	1,2	7,1
Práticas agrícolas		
Adubação mineral	-	3,7
Adição de vinhaça	0,5	5,5
Adição de torta de filtro	0,3	5,0
Adição de carvão mineral	0,7	1,9
Estágio de corte do talhão	0,9	-
Colheita mecanizada	1,0	4,3
Colheita com queima	-	-
Distância		
Latitude	0,2	0,5
Longitude	0,7	1,5

Figura 2.7 - Diagrama de Venn demonstrando a contribuição individual das variáveis ambientais (física e química do solo), manejo (práticas agrícolas) e distância, na explicação da variação na estrutura da comunidade de bactérias, como observadas pelas análises de sequenciamento e *T-RFLP*. A significância de cada um dos valores foi obtida a partir de um teste de permutação com 1000 repetições. A letra *a* representam a análise a partir da matriz de *OTUs*, obtidos no sequenciamento; e *b* representa a matriz de *TRFs*, obtidos a partir do *T-RFLP*.

Estudos anteriores indicaram que características físicas e químicas do solo são mais importantes do que as práticas agrícolas para a estrutura das comunidades bacterianas (KURAMAE et al., 2012; LAUBER et al., 2008). No entanto, estudos pontuais observaram o efeito das práticas agrícolas onde por exemplo, em solos cultivados com cana-de-açúcar, foi demonstrado que a adição de palha ao solo, ou a colheita baseada em queima, levou a mudanças na comunidade de bactérias (LIAO et al., 2013; RACHID et al., 2013). Contudo, estes trabalhos não avaliaram diversas áreas de cultivo ao mesmo tempo, e não focaram a distribuição espacial das amostras, fatos que podem ter comprometido a ordenação de forma robusta das principais variáveis correlacionadas (possivelmente moduladoras) da comunidade bacteriana em solos cultivados com cana-de-açúcar.

Não obstante, o amplo conjunto de dados gerados também permitiu inferir sobre o papel da distância geográfica na beta diversidade da comunidade bacteriana, demonstrando a longitude como o fator predominante. Trabalhos anteriores confirmam os resultados obtidos neste estudo, visto que, relataram a importância dos efeitos da distância geográfica em outros ambientes (LIU et al., 2014; MARTINY et al., 2011; ZINGER et al., 2011).

Buscando uma visão mais detalhada, análises de *pRDA* foram elaboradas também para cada um dos 10 filos mais abundantes, e agrupando os demais 55 filos raros em um grupo de sequências nomeada de ‘Outros’, os quais continuaram a demonstrar os efeitos da física e química como o principal modulador destes grupos (Figura 2.8), sendo que: pH (com exceção de *Firmicutes*) e a granulometria (com exceção de *Bacteroidetes* e *Planctomycetes*) foram os atributos mais significativos para todos os grupos avaliados. Além destes, algumas variáveis foram significativas para apenas um dos filos mais abundantes, como exemplo: magnésio para *Nitrospira* e matéria orgânica para *Gemmatimonadetes* (Tabela 2.5). Não obstante, a análise dos 55 mais raros (Outros) demonstrou que o efeito de distância, explicado pela longitude, foi significativo na explicação da variação da estrutura desta fração da comunidade. Isto não apenas demonstra a importância da comunidade rara, fato anteriormente relatado em outros estudos (GALAND et al., 2009; MENDES et al., 2014; SOGIN et al., 2006), mas também sugere que estas estejam sujeitas a uma maior influência dos fatores que levam a ocorrência de biogeografia, como por exemplo, limites de dispersão.

Os dados obtidos demonstram que as bactérias presentes em solos cultivados com cana-de-açúcar são influenciadas por características ambientais (práticas de manejo e física e química do solo), que ainda se somam aos menores, porém de maneira alguma desprezíveis, efeitos de distância, o que caracteriza estas comunidades dentro de uma das hipotetizadas por Martiny et al. (2006), a qual sugere que a variação na estrutura da comunidade microbiana é proveniente de múltiplos habitats (composição biótica é uma reflexo de variáveis ambientais) e diversas províncias (composição biótica é uma reflexo dos acontecimentos históricos medidos pelo efeito da distância).

Tabela 2.5 - Análise de *forward* selection das matrizes de filotaxia demonstrando a porcentagem de contribuição significativa ($p < 0,05$) de cada atributo de física e química do solo, práticas de manejo e distância

	<i>Acid.</i>	<i>Actin.</i>	<i>Bact.</i>	<i>Chlor.</i>	<i>Firm.</i>	<i>Gemm.</i>	<i>Nitro.</i>	<i>Planct.</i>	<i>Proteo.</i>	<i>Verruc.</i>	Outros
Física e química do solo											
pH	22,4	29,9	3,0	13,8		18,6	11,5	5,7	7,9	9,6	13,1
P											
K					4,8				8,2		10,0
Ca	17,6	17,7		11,4	2,9			1,7		6,7	9,8
Mg							2,7				8,3
CEC	16,2	10,9		9,5					7,6		9,3
Matéria Orgânica						20,9					
Areia	18,7	16,9				21,7					8,9
Silte				10,4	2,1						
Argila		6,7				19,8	8,2		7,0	7,7	3,9
Práticas de manejo											
Adubação mineral				1,1							
Adição de vinhaça		2,5			0,7	3,7				1,3	
Adição de torta de filtro		1,3			1,2	5,4			1,4		0,5
Adição de carvão	1,2	3,4		2,7				0,7	0,8		1,4
Corte do talhão	2,2			2,0							0,9
Colheita mecanizada											
Colheita com queima										2,8	
Distância											
Latitude											0,4
Longitude											2,1

Acid. – Acidobacteria, *Actin.* – Actinobacteria, *Bact.* – Bacteroidetes, *Chlor.* – Chloroflexi, *Firm.* – Firmicutes, *Gemm.* – Gemmatimonadetes, *Nitro* – Nitrospirae, *Planct.* – Planctomycetes, *Proteo.* – Proteobacteria, *Verruc.* – Verrucomicrobia.

Figura 2.8 - Diagrama de Venn demonstrando a contribuição individual dos valores, ambientais (física e química do solo), manejo (práticas agrícolas) e distância, para explicar a variação na estrutura da comunidade dos principais filos. A significância de cada um dos valores individuais, foi obtida a partir de um teste de permutação com 1000 repetições

2.3.5 Comportamento da comunidade abundante e rara nos modelos de distribuição de espécies

Os resultados obtidos nestes estudo demonstram que a comunidade de bactérias é modulada tanto por efeitos ambientais como pela distância geográfica entre as amostras (por exemplo, influenciada pelo limite de dispersão das espécies). Além disso, a análise por filtros demonstrou que os efeitos de distância foram mais claros, com maiores níveis de significância, para os grupos bacterianos mais raros (Figura 2.8). Estes resultados permitiram formular uma hipótese de que os grupos bacterianos abundantes e raros apresentam distintos processos dominantes em sua estruturação, o que poderia ser observado por meio de comportamentos distintos nos modelos de distribuição das espécies deterministas ou estocásticos.

Dentre os modelos de distribuição de abundância (*SAD*), os determinísticos se baseiam no fato de que as espécies entram em competição por nichos específicos, sendo esta distribuição correlacionada a variações ambientais; enquanto que os modelos estocásticos se baseiam na teoria de que as espécies apresentam a mesma capacidade de ocupação dos nichos, sendo a sua distribuição modulada por taxas de nascimento e mortalidade, especiação e dispersão, estando portanto, o modelo correlacionado a variações na distância geográfica (FERREIRA; PETREVE-JR, 2008; MCGILL et al., 2007). A partir da análise de *pRDA* proveniente de divisão da comunidade por abundância (Figura 2.9), pode-se observar que as frações mais abundantes sempre apresentaram uma maior correlação com dados ambientais, do que quando comparada com a comunidade contendo as espécies raras. Além disso, esta última também apresentou valores significativos para o efeito de distância, semelhantes ao encontrado na comunidade total, e a medida que frações mais raras eram avaliadas o efeito do ambiente decaiu (Figura 2.9).

Figura 2.9 - Diagrama de Venn demonstrando a contribuição individual dos valores, ambientais (física e química do solo), manejo (práticas agrícolas) e distância, para explicar a variação na estrutura da comunidade fragmentada de acordo com a abundância. A significância de cada um dos valores individuais, foi obtida a partir de um teste de permutação com 1000 repetições

Buscando confirmar os padrões encontrados na análise anterior, as comunidades fragmentas de acordo com a sua abundância foram submetidas a análise de modelos de distribuição das espécies. Os dados foram analisados em 3 modelos (*Broken-Stick*, *Lognormal*

e ZSM), onde as comunidades 5% e 10% mais abundantes apresentaram distribuição mais relacionada a modelos determinísticos, representados pelos modelos *Broken-Stick* e *Lognormal*. O restante dos dados, incluindo a avaliação da comunidade total, ou suas frações representadas por grupos mais raros foram melhor explicadas pelo modelo neutro ZSM (Tabela 2.6). Cabe ressaltar que o modelo *Lognormal* é considerado como um modelo puramente estatístico por alguns autores (MCGILL et al., 2007), enquanto que outros trabalhos sugerem que a adequação da curva de distribuição de abundância (SAD) a este modelo, pode ocorrer devido a interações biológicas entre as espécies, fato que, poderia representar uma competição por nichos, adequando o modelo a teoria determinística (FEINSTEIN; BLACKWOOD, 2012; FERREIRA; PETREVE-JR, 2008; MAGURRAN; HENDERSON, 2003; ULRICH; ZALEWSKI, 2006).

Tabela 2.6 - Número de amostras, de um total de 95, que se adequaram aos modelos de SAD avaliados a partir do cálculo de Δ AIC

	Lognormal	Broken-Stick	ZSM
Abundante 5%	30	25	18
Abundante 10%	50	13	6
Abundante 20%	0	3	92
Raro 50%	0	0	95
Raro 40%	0	0	95
Raro 30%	0	0	95
Total	0	0	95

Trabalhos anteriores com a comunidade de procariotos em ambientes marinhos também demonstram a adequação da comunidade mais abundante ao modelo *Lognormal*. O autores sugerem também que a comunidade rara mesmo quando submetida a alterações ambientais continua com valores baixos de abundância, confirmando um padrão biogeográfico distinto para este grupo microbiano (GALAND et al., 2009). Analisando o comportamento da comunidade microbiana com os padrões de distribuição determinista ou neutro, trabalhos anteriores concluíram que os microrganismos se adéquam a distribuição de algum destes modelos, ou podem ainda apresentar estruturas explicadas por ambos modelos (CARUSO et al., 2011; DUMBRELL et al., 2010; OFITERU et al., 2010; WANG et al., 2013). Recentemente, avaliando a comunidade bacteriana de rizosfera e *bulk soil* de soja, Mendes et al. (2014) observaram que a rizosfera é um ambiente que hospeda uma comunidade bacteriana com distribuição melhor explicada pelos modelo *Lognormal*, enquanto que no solo a estruturação da comunidade bacteriana é melhor explicada por

modelos estocásticos. Neste caso, os autores correlacionam o determinismo da rizosfera com a capacidade da planta em modular as variações ambientais.

Portanto, este trabalho sugere que a distribuição de bactérias ao longo de um gradiente espacial se adéqua a ambos os modelos. Adicionalmente, a análise fracionada de grupos raros e abundantes demonstra pela primeira vez que os grupos abundantes tendem a ser mais relacionados a processos determinísticos no solo, enquanto que grupos raros podem ter comportamento predominantemente estocástico neste ambiente.

2.4 Conclusões

O presente trabalho teve como objetivo introduzir os estudos de biogeografia e microbioma bacteriano em solos agrícolas. Dentre os resultados obtidos pode-se concluir que, em canaviais: as comunidades bacterianas são principalmente influenciadas por características de solo (com prevalência para o conteúdo de pH e argila) em vez de práticas agrícolas; as principais comunidades bacterianas (*Proteobacteria*, *Acidobacteria* e *Actinobacteria*) estão ligados por interações biológicas importantes e que a comunidade abundante e rara apresentam distintos comportamentos de distribuição ecológica, sendo esta importante para a compreensão e manutenção deles no sistema. Portanto, fica determinado que o microbioma bacteriano de solos cultivados com cana-de-açúcar apresentam uma variação no perfil de sua comunidade ao longo de uma distribuição espacial, sugerindo que estudos futuros nesta área sejam abordados mais de uma região, a fim de que suas conclusões sejam mais robustas, resultando em uma sólida base para o desenvolvimento de tecnologias baseadas num sistema de cultivo sustentável, onde as práticas agrícolas possam explorar melhor os recursos microbianos residentes no sistema solo-planta.

Referências

- 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.
- BARBERÁN, A.; BATES, S.T.; CASAMAYOR, E.O.; FIERER, N. Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. **The ISME Journal**, New York, v. 6, n. 2, p. 343–351, 2012.
- BATES, S.T.; CASAMAYOR, E.O.; FIERER, N. Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. **The ISME Journal**, New York, v. 2, p. 343–351, 2012.

BENEDUZI, A.; MOREIRA, F.; COSTA, P.B.; VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; FAVRETO, R.; BALDANI, J.I.; PASSAGLIA, L.M.P. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil, **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 63, p. 94–104, 2013.

BHATTACHARJEE, R.B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S.N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 80, n. 2, p. 199–209, 2008.

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

BORCARD, D.; LEGENDRE, P. All-scale spatial analysis of ecological data by means of principal coordinates of neighbour matrices. **Ecological Modelling**, Amsterdam, v. 153, n. 1/2, p. 51–68, 2002.

BRU, D.; RAMETTE, A.; SABY, N.P.A.; DEQUIEDT, S.; RANJARD, L.; JOLIVET, C.; ARROUAYS, D.; PHILIPPOT, L. Determinants of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities at the landscape scale. **The ISME Journal**, New York, v. 5, n. 3, p. 532–542, 2011.

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; COSTELLO, E.K.; FIERER, N.; PEÑA, A.G.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J.I.; HUTTLEY, G.A.; KELLEY, S.T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J.E.; LEY, R.E.; LOZUPONE, C.A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B.D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.R.; TURNBAUGH, P.J.; WALTERS, W.A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. Correspondence QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. **Nature**, London, v. 7, n. 5, p. 335–336, 2010.

CARUSO, T.; CHAN, Y.; LACAP, D.C.; LAU, M.C.Y.; MCKAY, C.P.; POINTING, S.B. Stochastic and deterministic processes interact in the assembly of desert microbial communities on a global scale. **The ISME Journal**, New York, v. 5, n. 9, p. 1406–1413, 2011.

CHAVE, J.; ALONSO, D.; ETIENNE, R.S. Theoretical biology: comparing models of species abundance. **Nature**, London, v. 441, n. 7089, p. E1–2, 2006.

DEQUIEDT, S.; SABY, N.P.A.; LELIEVRE, M.; JOLIVET, C.; THIOULOUSE, J.; TOUTAIN, B.; ARROUAYS, D.; BISPO, A.; LEMANCEAU, P.; RANJARD, L. Biogeographical patterns of soil molecular microbial biomass as influenced by soil characteristics and management. **Global Ecology and Biogeography**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 641–652, 2011.

DINI-ANDREOTE, F.; ANDREOTE, F.D.; COSTA, R.; TAKETANI, R.G.; ELSAS, J.D.; ARAÚJO, W.L. Bacterial soil community in a Brazilian sugarcane field. **Plant and Soil**, The Hague, v. 336, n. 1/2, p. 337–349, 2010.

DINI-ANDREOTE, F.; DE CÁSSIA PEREIRA E SILVA, M.; TRIADÓ-MARGARIT, X.; CASAMAYOR, E.O.; ELSAS, J.D.; SALLES, J.F. Dynamics of bacterial community succession in a salt marsh chronosequence: evidences for temporal niche partitioning. **The ISME Journal**, New York, v. 8, n. 4, p. 1–13, 2014.

DRENOVSKY, R.E.; STEENWERTH, K.L.; JACKSON, L.E.; SCOW, K.M. Land use and climatic factors structure regional patterns in soil microbial communities. **Global Ecology and Biogeography**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 27–39, 2010.

DUMBRELL, A.J.; NELSON, M.; HELGASON, T.; DYTHAM, C.; FITTER, A.H. Relative roles of niche and neutral processes in structuring a soil microbial community. **The ISME Journal**, New York, v. 4, n. 3, p. 337–345, 2010.

ETIENNE, R.S.; LATIMER, A.M.; SILANDER, J.A.; COWLING, R.M. Comment on “neutral ecological theory reveals isolation and rapid speciation in a biodiversity hot spot”. **Science**, New York, v. 311, n. 5761, p. 610, 2006.

FEINSTEIN, L.M.; BLACKWOOD, C.B. Taxa-area relationship and neutral dynamics influence the diversity of fungal communities on senesced tree leaves. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 14, n. 6, p. 1488–1499, 2012.

FERREIRA, F.; PETREVE-JR, M. Comments about some species abundance patterns: classic, neutral, and niche partitioning models. **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, v. 68, p. 1003–1012, 2008.

FIERER, N.; JACKSON, R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 3, p. 626–631, 2006.

FISCHER, D.; PFITZNER, B.; SCHMID, M.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; REIS, V.M.; PEREIRA, W.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; HAI, B.; HOFMANN, A.; SCHLOTER, M.; MARTINEZ-ROMERO, E.; BALDANI, J.I.; HARTMANN, A. Molecular characterisation of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum sp.*). **Plant and Soil**, The Hague, v. 356, n. 1/2, p. 83–99, 2012.

GALAND, P.E.; CASAMAYOR, E.O.; KIRCHMAN, D.L.; LOVEJOY, C. Ecology of the rare microbial biosphere of the Arctic Ocean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, n. 52, p. 22427–22432, 2009.

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

GARBEVA, P.; VEEN, J.A. van; ELSAS, J.D. van. Microbial diversity in soil: selection microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of phytopathology**, Palo Alto, v. 42, n. 29, p. 243–270, 2004.

GEORGE, M.; ANJUMOL, A.; GEORGE, G.; HATHA, A.A.M. Distribution and bioactive potential of soil actinomycetes from different ecological habitats. **African Journal of Microbiology Research**, Amsterdam, v. 6, n. 10, p. 2265–2271, 2012.

- GREEN, J.; BOHANNAN, B.J.M. Spatial scaling of microbial biodiversity. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 21, n. 9, p. 501–507, 2006.
- GREEN, J.L.; BOHANNAN, B.J.M.; WHITAKER, R.J. Microbial biogeography: from taxonomy to traits. **Science**, New York, v. 320, n. 5879, p. 1039–1043, 2008.
- 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, n. 2, p. 114–126, 2006.
- HIRA, A. Sugar rush: prospects for a global ethanol market. **Energy Policy**, Surrey, v. 39, n. 11, p. 6925–6935, 2011.
- JANSSEN, P. H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 3, p. 1719–1728, 2006.
- KAVAMURA, V.N.; TAKETANI, R.G.; LANÇONI, M.D.; ANDREOTE, F.D.; MENDES, R.; SOARES, M.I. Water regime influences bulk soil and Rhizosphere of *Cereus jamacaru* bacterial communities in the Brazilian Caatinga biome. **PloS one**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. e73606, 2013.
- KURAMAE, E.E.; YERGEAU, E.; WONG, L.C.; PIJL, A.S.; VAN VEEN, J.A.; KOWALCHUK, G.A. Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 12–24, 2012.
- LANDESMAN, W.J.; NELSON, D.M.; FITZPATRICK, M.C. Soil properties and tree species drive β -diversity of soil bacterial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, New York, v. 76, p. 201–209, 2014.
- LAUBER, C.L.; STRICKLAND, M.S.; BRADFORD, M.A.; FIERER, N. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. **Soil Biology and Biochemistry**, New York, v. 40, n. 9, p. 2407–2415, 2008.
- LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. **Numerical ecology**. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2012. 853 p.
- LIAO, Q.; WEI, G.; CHEN, G.; LIU, B.; HUANG, D.; LI, Y. Effect of trash addition to the soil on microbial communities and physico-chemical properties of soils and growth of sugarcane plants. **Sugar Tech**, Amsterdam, v. 16, n. 4, p. 400–404, 2013.
- LIU, J.; SUI, Y.; YU, Z.; SHI, Y.; CHU, H.; JIN, J.; LIU, X.; WANG, G. High throughput sequencing analysis of biogeographical distribution of bacterial communities in the black soils of northeast China. **Soil Biology and Biochemistry**, New York, v. 70, p. 113–122, 2014.
- MAGURRAN, A.E.; HENDERSON, P.A. Explaining the excess of rare species in natural species abundance distributions. **Nature**, London, v. 422, n. 4, p. 714–716, 2003.

- MARTINY, J.B.H.; BOHANNAN, B.J.M.; BROWN, J.H.; COLWELL, R.K.; FUHRMAN, J.A.; GREEN, J.L.; HORNER-DEVINE, M.C.; KANE, M.; KRUMINS, J.A.; KUSKE, C.R.; MORIN, P.J.; NAEEM, S.; OVREÅS, L.; REYSENBACH, A.; SMITH, V.H.; STALEY, J.T. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 4, n. 2, p. 102–112, 2006.
- MARTINY, J.B.H.; EISEN, J.A.; PENN, K.; ALLISON, S.D.; HORNER-DEVINE, M.C. Drivers of bacterial β -diversity depend on spatial scale. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, n. 7, p. 7850–7854, 2011.
- MCGILL, B.J.; ETIENNE, R.S.; GRAY, J.S.; ALONSO, D.; ANDERSON, M.J.; BENECHA, H.K.; DORNELAS, M.; ENQUIST, B.J.; GREEN, J.L.; HE, F.; HURLBERT, A.H.; MAGURRAN, A.E.; MARQUET, P.A.; MAURER, B.A.; OSTLING, A.; SOYKAN, C.U.; UGLAND, K.I.; WHITE, E.P. Species abundance distributions: moving beyond single prediction theories to integration within an ecological framework. **Ecology Letters**, Oxford, v. 10, n. 10, p. 995–1015, 2007.
- MEHNAZ, S. Microbes: friends and foes of sugarcane. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 53, n. 12, p. 954–971, 2013.
- MENDES, L.W.; KURAMAE, E.E.; NAVARRETE, A.A.; VAN VEEN, J.A.; TSAI, S.M. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. **The ISME Journal**, New York, v. 8, n. 8, p. 1–11, 2014.
- MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; ARAÚJO, W.L.; RAAIJMARKERS, J.M. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 22, p. 7259–7267, 2007.
- MUYZER, G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 3, p. 695–700, 1993.
- OFITERU, I.D.; LUNN, M.; CURTIS, T.P.; WELLS, G.F.; CRIDDLE, C.S.; FRANCIS, C.A.; SLOAN, W.T. Combined niche and neutral effects in a microbial wastewater treatment community. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 35, p. 15345–15350, 2010.
- PINHEIRO, É.F.M.; LIMA, E.; CEDDIA, M.B.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. Impact of pre-harvest burning versus trash conservation on soil carbon and nitrogen stocks on a sugarcane plantation in the Brazilian Atlantic forest region. **Plant and Soil**, The Hague, v. 333, n. 1/2, p. 71–80, 2010.
- RACHID, C.T.C.C.; SANTOS, A.L.; PICCOLO, M.C.; BALIEIRO, F.C.; COUTINHO, H.L.C.; PEIXOTO, R.S.; TIEDJE, J.M.; ROSADO, A.S. Effect of sugarcane burning or green harvest methods on the Brazilian Cerrado soil bacterial community structure. **PloS one**, San Francisco, v. 8, n. 3, p. e59342, 2013.

RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas, 2001. 202 p.

RAMETTE, A. Multivariate analyses in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 62, n. 2, p. 142–160, 2007.

RANJARD, L.; DEQUIEDT, S.; CHEMIDLIN PRÉVOST-BOURÉ, N.; THIOULOUSE, J.; SABY, N.P.A.; LELIEVRE, M.; MARON, P.A.; MORIN, F.E.R.; BISPO, A.; JOLIVET, C.; ARROUAYS, D.; LEMANCEAU, P. Turnover of soil bacterial diversity driven by wide-scale environmental heterogeneity. **Nature Communications**, New York, v. 4, p. 1434, 2013.

RECHE, I.; PULIDO-VILLENA, E.; MORALES-BAQUERO, R.; CASAMAYOR, E.O. Does ecosystem size determine aquatic bacterial richness? **Ecology**, Tempe, v. 86, n. 7, p. 1715–1722, 2005.

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

SAITO, R.; SMOOT, M.E.; ONO, K.; RUSCHEINSKI, J.; WANG, P.; LOTIA, S.; PICO, A.R.; BADER, G.D.; IDEKER, T. A travel guide to cytoscape plugins. **Nature Methods**, London, v. 9, n. 11, p. 1069–1076, 2012.

SANTI FERRARA, F.I.; OLIVEIRA, Z.M.; GONZALES, H.H.S.; FLOH, E.I.S.; BARBOSA, H.R. Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. **Plant and Soil**, The Hague, v. 353, n. 1/2, p. 409–417, 2011.

SAYER, E.J.; WAGNER, M.; OLIVER, A.E.; PYWELL, R.F.; JAMES, P.; WHITELEY, A.S.; HEARD, M.S. Grassland management influences spatial patterns of soil microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, New York, v. 61, p. 61–68, 2013.

SCHÜTTE, U.M.E.; ABDO, Z.; BENT, S.J.; WILLIAMS, C.J.; SCHNEIDER, G.M.; SOLHEIM, B.; FORNEY, L.J. Bacterial succession in a glacier foreland of the High Arctic. **The ISME Journal**, New York, v. 3, n. 11, p. 1258–1268, 2009.

SOGIN, M.L.; MORRISON, H.G.; HUBER, J.A.; MARK WELCH, D.; HUSE, S.M.; NEAL, P.R.; ARRIETA, J.M.; HERNDL, G.J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 32, p. 12115–12120, 2006.

ULRICH, W.; ZALEWSKI, M. Abundance and co-occurrence patterns of core and satellite species of ground beetles on small lake islands. **Oikos**, Buenos Aires, v. 2, p. 338–348, Jan. 2006.

WANG, J.; SHEN, J.; WU, Y.; TU, C.; SOININEN, J.; STEGEN, J.C.; HE, J.; LIU, X.; ZHANG, L.; ZHANG, E. Phylogenetic beta diversity in bacterial assemblages across

ecosystems: deterministic versus stochastic processes. **The ISME Journal**, New York, v. 7, n. 7, p. 1310–1321, 2013.

WHITAKER, R.J.; GROGAN, D.W.; TAYLOR, J.W. Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. **Science**, New York, v. 301, n. 8, p. 2002–2004, 2003.

XU, Z.; HANSEN, M.A.; HANSEN, L.H.; JACQUIOD, S.; SØRENSEN, S.J. Bioinformatic approaches reveal metagenomic characterization of soil microbial community. **PloS one**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. 1-11, 2014.

ZINGER, L.; AMARAL-ZETTLER, L.A.; FUHRMAN, J.A.; HORNER-DEVINE, M.C.; HUSE, S.M.; WELCH, D.B.M.; MARTINY, J.B.H.; SOGIN, M.; BOETIUS, A.; RAMETTE, A. Global patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater ecosystems. **PloS one**, San Francisco, v. 6, n. 9, p. 1-11, 2011.

3 BIOGEOGRAFIA DA COMUNIDADE DE ARQUEIAS EM SOLOS CULTIVADOS COM CANA-DE-AÇÚCAR

Resumo

Desde que foi proposta a existência do domínio Archaea, há algumas décadas, seus estudos com métodos independentes de cultivo vem demonstrando uma distribuição ubíqua desta comunidade nos mais distintos ambientes. O solo representa um importante ambiente no qual esta comunidade desempenha papéis funcionais distintos. No entanto, o conhecimento sobre as arqueias presentes neste ambiente é ainda incipiente, sendo necessários mais estudos sobre a distribuição espacial e os principais fatores ambientais que modulam a estrutura desta comunidade. Os conhecimentos sobre uma única cultura, como a cana-de-açúcar, que tem um papel importante no cenário econômico brasileiro, estão ausentes e podem ser úteis para entender uma fração significativa da comunidade microbiana presente nestes solos. Visando contribuir com novos conhecimentos nesta área, esta pesquisa teve como objetivo descrever a comunidade de arqueias ao longo de uma distribuição espacial, avaliando a abundância e a composição desta comunidade, bem como, estabelecer quais são os principais fatores ambientais que a modulam. Os resultados mostraram que as arqueias apresentam abundância entre 10^5 e 10^8 cópias do gene ribossomal por grama de solo, sendo os filos mais abundantemente encontrados Thaumarchaeota (75%) e Euryarchaeota (24%). A estrutura desta comunidade mostrou ser mais sensível aos efeitos de física e química do solo (pH, magnésio, cálcio e matéria orgânica), seguido por práticas de manejo das regiões produtoras e o efeito de distância, a qual é correlacionada com o limite de dispersão desta comunidade. Portanto, nossos resultados indicam que a comunidade de arqueias possuem uma distribuição biogeográfica, associada as variáveis ambientais e a distanciamento geográfico, que devem ser considerados conjuntamente na busca de uma melhor exploração deste recurso biológico nas áreas de cultivo.

Palavras-chave: *Thaumarchaeota*, *Euryarchaeota*, métodos independentes de cultivo

Abstract

Since it was proposed the existence of the domain Archaea, a few decades ago, their studies with unculture-independent methods have been demonstrating a ubiquitous distribution of these communities in widely different environments. The soil is an important environment where this community plays distinct functional roles. However, the knowledge about the archaea present in this environment is still incipient, and more studies on its spatial distribution and the major environmental factors that drive the structure of this community are needed. The knowledge on a single crop such as sugarcane, which has an important role in the Brazilian economic scenario, is missing and may be useful for understanding a significant fraction of the archaeal community present in these soils. In order to contribute in this area, this research aimed to describe the community of archaea along a spatial gradient distribution, assessing the abundance and composition of this community as well, to establish what are the main environmental factors that drive this community. The results showed that the archaeal abundance ranged between 10^5 and 10^8 copies of the ribosomal gene per gram of soil, being the most abundantly found the Thaumarchaeota phyla (75%) and Euryarchaeota (24%). The structure of this community was more

sensitive to the effects of physical and chemical soil properties (pH, magnesium, calcium and organic matter), followed by management practices of the producing regions and the effect of distance, which is correlated with the dispersal limitation of this community. Therefore, our results indicate that the community of archaea has a biogeographic distribution, associated with environmental variables and geographic distance, which should be considered together in searching for a better exploration of this biological resource in this culture.

Keywords: *Thaumarchaeota*, *Euryarchaeota*, culture-independent approaches

3.1 Introdução

O domínio *Archaea* foi proposto a algumas décadas (WOESE; KANDLERT; WHEELIS, 1990), e desde então, são constantes os estudos relacionados com sua biologia, diversidade e ecologia. Contudo, devido a dificuldades de cultivo destes organismos em condições de laboratório, sua descrição e inferências sobre suas características, foram possíveis, primordialmente, com o advento das técnicas independentes de cultivo. Atualmente, pode-se dizer que a distribuição das arqueias ocorre de forma ubíqua pelo planeta, estando presente nos mais distintos ambientes, como fontes termais (EHRHARDT et al., 2007), ambientes marinhos (DELONG, 1992), sedimentos hipersalinos e de manguezais (DEMERGASSO et al., 2004; DIAS et al., 2011) e solos agrícolas (BUCKLEY; SCHMIDT, 2003; OODMAN, 1997; ZHANG; MÖRTELMAIER; MARGESIN, 2012). Dentre os filos mais importantes e conhecidos deste domínio, no ambiente do solo destacam-se *Thaumarchaeota* e o *Euryarchaeota*. O primeiro filo é composto por arqueias oxidadoras de amônia (KÖNNEKE et al., 2005; LEININGER et al., 2006), as quais desempenham importante papel no ciclo do nitrogênio, participando no processo de nitrificação (BROCHIER-ARMANET et al., 2008; SPANG et al., 2010). O segundo filo também é encontrado nos mais distintos ambientes, apresentando indivíduos com funções metabólicas como metanogênese, metanotrofia (oxidadores do metano), desnitrificação, redução de sulfato e oxidação de ferro (OFFRE; SPANG; SCHLEPER, 2013).

Trabalhos que buscam correlacionar as variáveis ambientais com alterações na comunidade de arqueias do solo demonstraram que os principais atributos correlacionados são o pH (NICOL et al., 2008; WESSÉN; HALLIN; PHILIPPOT, 2010), as práticas de manejo (NICOL; GLOVER; PROSSER, 2003) e o sistema de uso da terra (TAKETANI; TSAI, 2010). Apesar deste conhecimento, juntamente com

a elevada importância funcional de alguns grupos deste domínio, ainda são controversos os resultados obtidos em diferentes estudos sobre sua abundância relativa, diversidade, funcionalidade e fatores ambientais que podem se correlacionar com sua distribuição no planeta (BATES et al., 2011). Recentemente, buscando auxiliar a elucidar alguns destes pontos, trabalhos abrangendo uma maior escala espacial dos dados (enfoque biogeográfico) têm sido conduzidos, reiterando a importância de alguns fatores, como pH, uso do solo e efeito de distância, além de adicionar novas variáveis de importância na estruturação das comunidades de arqueias do solo, como a relação C/N, a temperatura e a cobertura vegetal (ANGEL et al., 2010; BATES et al., 2011; BRU et al., 2011; HU; ZHANG; DAI, 2013; JIANG et al., 2014; LUPATINI et al., 2013; SHEN et al., 2013).

Portanto, buscando um melhor entendimento sobre este grupo microbiano, o presente trabalho objetivou avaliar, em um único sistema agrícola, a distribuição espacial e os fatores ambientais que se correlacionam com a estrutura da comunidade de arqueias dos solos. A escolha do ambiente de cana-de-açúcar deve-se ao fato de esta cultura ser uma das mais importante para o agronegócio brasileiro, sendo sua produção concentrada no Estado de São Paulo. Alguns trabalhos buscaram compreender os efeitos das mais distintas práticas de manejo sobre a comunidade bacteriana presente no solo destes ambiente (DINI-ANDREOTE et al., 2010; RACHID et al., 2013), porém, o conhecimento sobre o domínio das arqueias é ainda inexistente, o que gera questões iniciais a serem respondidas, como: *a)* quais são os grupos dominantes de arqueias presentes em solos cultivados com cana-de-açúcar? *b)* a estrutura da comunidade de arqueias apresentam distintos padrões ao longo de uma escala espacial?; *c)* quais os principais moduladores ambientais desta comunidade?

3.2 Material e métodos

3.2.1 Descrição da área, análises físicas, químicas e extração de DNA do solo

Foram amostradas 10 localidades produtoras de cana-de-açúcar. Um total de 95 pontos (talhões), com três repetições cada (total de 285 amostras), abrangendo distintas práticas de manejo e propriedades físicas e químicas do solo, foram coletados. A descrição da área, metodologia de amostragem, análises químicas e

físicas; e extração do DNA total dos solos coletados descritos no item 2.2.1 do capítulo 2.

3.2.2 Quantificação da comunidade de arqueias por PCR quantitativo (qPCR)

A quantificação do número de cópias do gene 16S rRNA de arqueias foi realizada em cada uma das amostras de solo por meio de reações de PCR quantitativo, realizadas no equipamento *IQ5* (BioRad, EUA), com o sistema *SYBR Green I*. As reações foram realizadas em um volume final de 25 μ L, contendo: 12,5 μ L de *Platinum Quantitative PCR Supermix-UDG* (Invitrogen, Brasil), 0,2 μ M de iniciadores 340F (5'- CCCTAYGGGGYGCASCAG -3 ') e 1000R (5'- GAGARGWRGTGCATGGCC -3 ') (GANTNER et al., 2011) e 1 μ L (cerca de 50 ng) de DNA molde. As reações foram realizadas com as seguintes condições de ciclo: desnaturação inicial a 95 °C durante 15 min, seguido por 30 ciclos de 95 °C durante 30 s, 57 °C durante 30 s e 72 °C durante 30 s. Para verificar a especificidade da amplificação, as curvas de desnaturação (*melting*) foram realizadas com temperaturas crescentes, a partir de 72 °C e chegando a 96 °C. As estimativas do log do número de cópias do gene 16S rRNA por grama de solo foram determinadas comparando os valores de Ct obtidos com os da curva padrão previamente construídas, a qual foi realizada utilizando de 10^3 a 10^9 cópias do molde por ensaio ($R^2 = 0,99$). A eficiência do qPCR (E) foi calculado de acordo com a equação $E = [10^{(-1/\text{slope})} - 1]$ e determinada em 90%.

3.2.3 Análise da estrutura da comunidade de arqueias por T-RFLP

A análise da estrutura da comunidade de arqueias foi realizada por meio da análise de T-RFLP do gene 16S rRNA. As amplificações foram efetuadas em um volume final de 50 μ L, com os iniciadores 21f (5'- TTCYGGTTGATCCYGCC IGA-3'), marcado com o fluoróforo FAM e 958R (5'- YCCGGCGTTGAMTCCA ATT-3') (DELONG, 1992; TAKETANI e TSAI, 2010), contendo: 1X Tampão de PCR, 3 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de *dNTP*, 0,2 μ M de cada primer, 0,04 U/ μ L de Taq DNA polimerase (Fermentas, São Paulo, Brasil) e 1 μ L do DNA molde. As reações foram realizadas com as seguintes condições de ciclo: desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min, seguido por 30 ciclos de 95 °C durante 30 s, 53 °C durante 30 s e 72 °C durante

30 s, com uma extensão final de 72 °C por 10 min. Posteriormente, todas as amostras foram purificadas por precipitação com isopropanol 75% e aproximadamente 100 ng dos produtos foram clivados com 5 U da enzima *HhaI* (Fermentas, São Paulo, Brasil), seguindo recomendações do fabricante. Por fim, estes produtos foram precipitados com acetato de sódio 3 M e EDTA 125 mM, ressuspensos em formamida Hi-DI com o marcador LIZ 600 (Applied Biosystems) e analisados em um sequenciador ABI 3500 (Applied Biosystems). Para a análise dos picos (*TRFs*) obtidos, foi adotado uma linha de corte de 50 unidades de fluorescência, para remover o “background” das amostras e os resultados transformados e uma matriz de abundância relativa.

3.2.4 A descrição da comunidade bacteriana por sequenciamento em larga escala do gene 16S de rRNA

O estudo taxonômico das arqueias que ocorrem nos solos amostrados foi realizado por meio do sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S rRNA de arqueias. Este fragmento foi acessado por meio de duas etapas de ampliações (*nested PCR*). Para primeira reação foi adotado o mesmo jogo de iniciadores (porém sem a marcação com o fluoróforo FAM) e condições de amplificação das descritas anteriormente para a elaboração do T-RFLP. A partir desta, a segunda reação ocorreu a partir da amplificação da região V3 utilizando os iniciadores ArcF (5'- CCC CTA CGC CCY GCA SCA G-3') e ArcR (5'- TTA CCG CGG CKG CTG-3'), sendo as sequências de cada amostra foram identificadas pelo uso de marcadores adicionais (*barcodes*), composto por cinco nucleotídeos, incluídos nos iniciadores *ArcF* (<http://vamps.Mbl.edu/>). As reações foram preparadas em um volume final de 50 µL, contendo: 1X Tampão de PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,2 µM de cada primer, 0,04 U/ µL de Taq DNA polimerase (Fermentas, São Paulo, Brasil) e 1 µL do DNA molde. As reações foram realizadas com as seguintes condições de ciclo: desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min, seguido por 30 ciclos de 95 °C durante 30 s, 55,8 °C durante 30 s e 72 °C durante 1 min, com uma extensão final de 72 °C por 10 min. Posteriormente, as três repetições de cada amostra (provenientes das repetições dos talhões) foram misturadas de maneira equimolar.

Estes produtos foram purificados com *ChargeSwitch® PCR Clean-Up Kit* (Life Technologies), quantificados utilizando o aparelho *Qubit® 2.0 Fluorometer*

(Life Technologies) e o sequenciamento foi realizado na plataforma *Ion Torrent Personal Genome Machine System* (PGM) com três chips *Ion 316TM* (Life Technologies) de acordo com (KAVAMURA et al., 2013).

3.2.5 Análise das sequências obtidas

As análises das sequências obtidas foram efetuadas com o programa Quantitative Insights Into Microbial Ecology – QIIME (CAPORASO et al., 2010). Resumidamente, os arquivos *FastQ* foram separados em arquivos *.Fasta e *.qual a partir do comando *convert_fastaqual_fastq.py*. A remoção das sequências de baixa qualidade (inferiores a 20) e dos os iniciadores, assim como a separação das amostras de acordo com seus marcadores (*barcodes*) foram realizadas a partir do comando *split_libraries.py*. Posteriormente, as sequências válidas foram alocadas em um matriz de OTUs, usando uma de similaridade de 97% para formação das mesmas, por meio da metodologia *uclust*. A classificação taxonômica de sequências representativas de cada OTU foi atribuída usando o algoritmo *RDP Classifier* e comparados com o banco de dados do *Silva*. A árvore filogenética foi construída utilizando o algoritmo *FastTree*. Para minimizar os efeitos *bias* de amostragem na análise o número de sequências analisados por amostra foi normalizado, sendo adotado como padrão de corte 7.680 sequências por amostras (DINI-ANDREOTE et al., 2014).

3.2.6 Análises estatísticas dos resultados

Os procedimentos para as análises estáticas deste trabalho foram os mesmo descritos no item 2.2.7 do capítulo 2.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Quantificação e análise da estrutura da comunidades de arqueias nos solos estudados

A quantificação da comunidade de arqueias por PCR quantitativo (qPCR) demonstrou que a abundância do gene 16S rRNA variou entre 10^5 e 10^8 cópias por grama de solo, sendo sua média de 10^6 . Nestes resultados os valores de abundância

média de cada região produtora variaram entre 10^5 a 10^6 , apresentando como exceção a área J com um valor médio de 10^7 (Tabela 3.1). Estes resultados colocam o grupo das arqueias como o segundo mais abundante nos solos cultivados com cana-de-açúcar, visto que, os valores obtidos para bactérias (Capítulo 2) variam entre 10^9 e 10^{10} cópias do gene ribossomal por grama de solo, enquanto que o trabalho anterior com fungos nestas áreas, encontrou valores médios de 10^5 cópias do *operon* ribossomal por grama de solo (GUMIERE, 2012). Além disso, os valores de abundância encontrados para esta comunidade no ambiente do solo estão de acordo com trabalhos anteriores, nos quais seus valores variaram entre 10^5 até 10^8 (CAO et al., 2012; OCHSENREITER et al., 2003).

Tabela 3.1 - Quantificação de arqueias nas regiões produtoras de solos cultivadas com cana-de-açúcar no Estado de São Paulo. Valores apresentados em log do número de cópias do gene alvo por grama de solo, seguidos dos valores de desvio

Regiões produtoras	(16S RNAr)
Área A	5,9 (0,38)
Área B	6,4 (0,40)
Área C	6,2 (0,36)
Área D	6,1 (0,33)
Área E	6,7 (0,30)
Área F	6,6 (0,30)
Área G	6,3 (0,30)
Área I	6,5 (0,6)
Área J	7,0 (0,27)
Área K	5,3 (0,33)
Área L	5,5 (0,43)
Todas	6,2 (0,47)

Buscando avaliar diferenças na estrutura da comunidade de arqueias, a análise de T-RFLP de 285 amostras demonstrou uma elevada variação na sua composição, sendo esta baseada na ocorrência de um total de 420 picos (*TRFs*) (Figura 3.1). A análise de PCoA demonstrou uma ampla variação da estrutura das comunidades, sendo que as amostras das regiões produtoras C, D e J tenderam a se agrupar, enquanto que as demais apresentaram uma ampla variabilidade, estando dispersas ao longo do gráfico. Trabalhos anteriores empregando a mesma metodologia em solos de floresta da Amazônica e do Mediterrâneo (ANGEL et al., 2010; TAKETANI; TSAI,

2010), também demonstraram as diferenças na estrutura da comunidade deste domínio nos solo.

Figura 3.1 – Análise de coordenadas principais (PCoA) a partir dos resultados de T-RFLP das comunidades de arqueias presentes em amostras de solo de 95 talhões (285 amostras) cultivados com cana-de-açúcar no Estado de São Paulo. A matriz de distância adotada foi a de *Bray-Curtis*

3.3.2 Descrição taxonômica da comunidade de arqueias

Com o objetivo de identificar os principais grupos taxonômicos que compõem a comunidade de arqueias, foi utilizado o sequenciamento em larga escala pela plataforma de *Ion Torrent*, dando origem a um total de 729.600 sequências, alocadas em 13.065 *OTUs* (determinadas a 97% de similaridade). A afiliação taxonômica das sequências de cada uma destas *OTUs* permitiu estabelecer *Thaumarchaeota* e *Euryarchaeota* como principais filos de arqueias nestes solos, com valores médios de frequência relativa de 75% e 24%, respectivamente. Porcentagens similares a esta foram anteriormente descritas em solos localizados na China (HU; ZHANG; YUAN, 2013), assim como a presença do filo *Euryarchaeota* foi relatada em solos de floresta e solos agrícolas (PESARO; WIDMER, 2002; POPLAWSKI et al., 2007). Contudo, é

importante ressaltar a variação nestes valores dentre as amostras analisadas no presente estudo. Em 13 amostras (de um total de 95), a abundância do filo *Euryarchaeota* foi maior do que *Thaumarchaeota*, sugerindo que a responsividade da comunidade de arqueias em solos agrícolas é elevada, e indicando estes grupos como alvo para estudos mais detalhados (Figura 3.2).

Figura 3.2 - Frequência relativa de sequências ribossomais dos filos mais abundantes de arqueias em solos cultivados com cana-de-açúcar no Estado de São Paulo. Os valores são baseados na classificação de um total de 729.600 sequências por amostra

Num maior detalhamento da afiliação das sequências obtidas, pode-se observar que para o filo *Thaumarchaeota*, os grupos *SCG* (61,3%) e *SAGMCG-I* (6,4%), representados respectivamente pelos organismos *Candidatus Nitrososphaera* (11,6%) e *Candidatus Nitrosotalea* (6,2%), apresentaram grande abundância dentre as amostras avaliadas. Trabalhos anteriores demonstraram que estes organismos foram isolados e relatados como oxidadores de amônia (OFFRE; SPANG; SCHLEPER, 2013). Além disso, estudos fisiológicos sobre *Candidatus Nitrososphaera viennensis* demonstraram que a mesma é capaz de utilizar para seu metabolismo fontes de nitrogênio alternativas ao NH_3 , como por exemplo a uréia (TOURNA et al., 2011). Estas observações ligam a ocorrência destes organismos às transformações do nitrogênio nos solos estudados com práticas agrícolas adotadas no cultivo de cana-de-açúcar, como por exemplo, a adição de uréia (adubação nitrogenada). Dentro do filo *Euryarchaeota*, as ordens mais abundantes encontradas foram *Thermoplasmatales* (15%) e *Halobacteriales* (4,2%). A primeira foi relatada anteriormente em outros solos (KEMNITZ; KOLB; CONRAD, 2007; PESARO; WIDMER, 2002; SHEN et al., 2013), sendo inclusive, constatada em maiores quantidades em solos não alagados, ou seja, com condições predominantemente aeróbias (HU; ZHANG; YUAN, 2013). O segundo grupo encontrado também foi descrito anteriormente em ambientes de solo de pastagem, agrícolas e de floresta, localizados na China (HU; ZHANG; DAI, 2013). Isolados da ordem *Halobacteriales* demonstraram ser heterótrofos obrigatórios, porém, estudos adicionais sobre este grupo são necessários para elucidar maiores detalhes sobre a sua funcionalidade no ambiente (OFFRE; SPANG; SCHLEPER, 2013).

Além da avaliação taxonômica da comunidade de arqueias, os dados de sequenciamento permitiram avaliar a alfa diversidade, riqueza de *OTUs* e a estimativa de cobertura das amostras em cada uma das regiões produtoras estudadas. De forma geral, não ocorreram grandes variações entre as regiões produtoras para estes dados. Contudo é importante destacar que as regiões A e D apresentaram menores valores de diversidade e riqueza, quando comparadas as demais (Tabela 3.2). Comparativamente com os resultados obtidos para bactérias (Capítulo 2), as variações da alfa diversidade entre as regiões produtoras foram inferiores, indicando que as arqueias apresentam uma maior homogeneidade na sua alfa diversidade em solos cultivados com cana-de-açúcar. Contudo, as diferenças encontradas na composição da sua comunidade foram

claras, indicando que comunidade de arqueias possui distritos perfis ao longo de uma distribuição espacial nestes solos.

Tabela 3.2 - Valores médios de alfa diversidade, riqueza de *OTUs* e estimativa de cobertura obtidos em cada uma das regiões produtoras estudadas. As letras representam as diferenças nas comparações das médias por teste de Tukey, a uma significância de 5% ($p < 0,05$)

Regiões Produtoras	<i>Faith's Phylogeny Diversity</i>		Riqueza de <i>OTUs</i>		Cobertura de <i>Good</i>	
	Média	Tukey	Média	Tukey	Média	Tukey
A	22,199	b	371,385	b	0,968	a
B	27,865	a	457,875	ab	0,958	b
C	28,656	a	513,000	a	0,953	b
D	27,312	ab	455,273	ab	0,959	b
E	29,948	a	498,333	a	0,956	b
F	30,119	a	511,385	a	0,955	b
G	29,792	a	496,222	a	0,955	b
I	30,292	a	479,222	a	0,957	b
J	32,698	a	530,300	a	0,952	b
K	32,468	a	504,000	a	0,954	b

3.3.3 Efeito das práticas de manejo, características do solo e ocorrência de padrões biogeográficos na comunidade de arqueias

As análises de *pRDA* foram elaboradas com o objetivo de ordenar os principais moduladores da comunidade de arqueias nos solos, considerando tanto a comunidade total, como os principais filos encontrados, separadamente. Os resultados obtidos a partir do sequenciamento (matriz de *OTUs*) demonstraram que dentre as variáveis estudadas, os atributos físicos e químicos do solo foram mais importantes que práticas de manejo e distribuição espacial (Figura 3.3). Para os resultados de T-RFLP, quando comparados aos resultados de sequenciamento, uma menor importância dos efeitos de física e química do solo foram encontrados, com uma maior relevância das práticas de manejo e efeito da distância espacial (Figura 3.3). Provavelmente, tal diferença deve-se ao limite de resolução das metodologias, uma vez que esta possui um elevado número de *OTUs*, fazendo com que a análise consiga detectar também os grupos taxonômicos mais raros nos solos amostrados.

Fracionando os resultados de sequenciamento, a análise da comunidade de *Thaumarchaeota* demonstrou que a explicação da variação na sua beta diversidade

manteve-se semelhante aos valores encontrados para a comunidade total de arqueias (Figura 3.4). Contudo, para o filo *Euryarchaeota*, a explicação da variação na estrutura da comunidade divergiu das demais, sendo que, os valores de distância não foram significativos, os efeitos das práticas de manejo foram maiores e o das características físicas e químicas do solo decresceram (Figura 3.4). Trabalhos abordando a comunidade de arqueias, e sua distribuição ao longo do espaço, demonstraram que os efeitos de física e química do solo e/ou distância podem influir na sua comunidade (BATES et al., 2011; HU; ZHANG; DAI, 2013; MAO et al., 2013; TRIPATHI et al., 2013), porém poucos destes quantificaram cada um destes fatores separadamente. Um exemplo disto, foi descrito por Zheng et al. (2013), que estudou solos alagados e não alagados na China, e encontraram que a maioria da variação na comunidade de arqueias foi explicada pelos efeitos da distância, seguido das variações ambientais, com destaque para as variáveis pH e longitude. Estes autores concluem que as teorias de nicho e neutra suportam concomitantemente a explicação para a variação na beta diversidade, assim como ocorre com os macrorganismos. Contudo, nossos resultados demonstraram que os efeitos da física e química do solo; e práticas de manejo são superiores ao da distância geográfica, quando avaliamos uma única cultura agrícola. Esta diferença provavelmente ocorreu devido ao fato que as distintas práticas de manejos e correções no solo adotadas, a fim de propiciar uma condição nutricional ideal para a planta, exercem uma maior pressão de seleção do que o limite de dispersão da comunidade de arqueias, o qual é mensurados pela correlação da variação na estrutura da comunidade com a distância geográfica.

Figura 3.3 - Diagrama de Venn, obtido a partir da análise de *pRDA*, demonstrando a contribuição dos efeitos de distância, práticas de manejo e física e química do solo (ambiental) na explicação da variação das comunidades, sendo que, **a** indica a porcentagem de explicação obtida a partir da matriz de Otus e **b** a porcentagem de explicação obtida a partir da matriz de TRs. Os valores individuais dos efeitos avaliados tiveram sua significância calculada a partir do teste de permutação com 1000 repetições. A parte de correlação entre os efeitos avaliados não foram testadas pelo teste de permutação, visto que, elas são calculadas a partir dos valores dos efeitos individuais

Figura 3.4 - Diagrama de Venn, obtido a partir da análise de *pRDA*, demonstrando a contribuição dos efeitos de da distância, práticas de manejo e física e química do solo (ambiental) na explicação da variação das comunidades, sendo que, **a** indica a porcentagem de explicação do filo *Thaumarchaeota* e **b** a porcentagem de explicação do filo *Euryarchaeota*. Os valores individuais dos efeitos avaliados tiveram sua significância calculada a partir do teste de permutação com 1000 repetições. A parte de correlação entre os efeitos avaliados não foram testadas pelo teste de permutação, visto que, elas são calculadas a partir dos valores dos efeitos individuais

Numa análise mais detalhada sobre os principais componentes ambientais responsáveis pela variação na estrutura da comunidade de arqueias, foi efetuada uma análise de redundância (RDA) seguida de “*forward selection*”. De uma forma geral, os resultados elegeram como os principais atributos de física e química do solo: pH, e quantidade de magnésio (Mg^{2+}) e matéria orgânica do solo. Em relação às análises realizadas para cada filo, os dois primeiros foram importantes para explicar a variação na comunidade de *Thaumarchaeota*, e o primeiro e terceiro, juntamente com o teor de argila foram significativos na explicação do filo *Euryarchaeota* (Tabela 3.3). Dentro

deste contexto, trabalhos anteriores também encontraram pH como o atributo mais relevantes para a comunidade total de arqueias (CAO et al., 2012), *Thaumarchaeota* (BAOLAN et al., 2014; HU; ZHANG; DAI, 2013) e *Euryarchaeota* (HU; ZHANG; YUAN, 2013) nos mais distintos solos, porém, a explicação ocasionada por outros atributos como a matéria orgânica, argila e Mg^{+2} , assim como, as diferenças encontradas entre os filos mais abundantes avaliados são inovadores, e sugerem a necessidade de futuros estudos para uma melhor compreensão da funcionalidade deste domínio em solos cultivados com cana-de-açúcar.

Quanto a contribuição das práticas de manejo, os atributos mais relevantes foram a adição de carvão vegetal, torta de filtro, aplicação de vinhaça, e a estratégia de colheita (Tabela 3.3). Não obstante, é importante destacar os efeitos da adição de compostos orgânicos (torta de filtro e palhada, proveniente da colheita mecanizada) foram mais significativas sobre o filo *Euryarchaeota*, os quais conjuntamente estão correlacionados com o efeito da matéria orgânica do solo, e sugerem que este grupo apresente um relevante papel na degradação da mesma. Outra possibilidade é o fato deste filo estar relacionado a processos anaeróbios, como por exemplo a metanogênese, processo que ocorre predominantemente em solos com maiores teores de argila e matéria orgânica, o que leva os mesmos a apresentarem condições de menores teores de oxigênio.

Tabela 3.3 - Porcentagem de explicação das variáveis ambientais e de práticas de manejo sobre a comunidade de arqueia

	TRFs		OTU's		<i>Traumarchaeota</i>		Euryarchaeota	
física e química do solo	Explicação	p	Explicação	P	Explicação	p	Explicação	p
Ca	7,9%	0,04	17,7%	0,005				
CTC			18,7%	0,015				
Mg	9,6%	0,005	16,6%	0,005	20,3%	0,005		
Matéria orgânica	6,4%	0,035	19,4%	0,031			10,8%	0,005
pH	13,5%	0,01	17,2%	0,005	30,9%	0,005	10,4%	0,005
Argila			14,8%	0,005			14,4%	0,005
Areia			20,6%	0,022				
Silte			20,0%	0,044				
Práticas de manejo	Explicação	p	Explicação	P	Explicação	p	Explicação	p
Coleita com queima								
Adição de carvão vegetal			8,8%	0,036				
Tempo de cultivo da cultura	9,5%	0,01	5,4%	0,005	8,0%	0,005		
Corte								
Adição de torta de filtro	6,9%	0,005	3,0%	0,005			6,4%	0,005
Colheita mecanizada			8,0%	0,01			11,0%	0,005
Adição de vinhaça			6,9%	0,005				

3.4 Conclusões

Estes resultados elegem a comunidade de arqueias como um importante grupo alvo de estudos para a cultura de cana-de-açúcar, visto que, além de ser o segundo mais abundante encontrado nesta cultura, ele também apresenta uma clara variação espacial na estrutura da sua comunidade. Além disso, pode-se evidenciar que dentre os principais filos encontrados *Thaumarchaeota* e *Euryarchaeota* estes foram modulados por distintos atributos, sugerindo que estes ocupem frações distintas da partícula do solo, desempenhando tarefas fundamentais para ciclagem de nutrientes neste sistema.

Referências

- ANGEL, R.; SOARES, M.I.M.; UNGAR, E.D.; GILLOR, O. Biogeography of soil archaea and bacteria along a steep precipitation gradient. **The ISME Journal**, New York, v. 4, n. 4, p. 553–563, 2010.
- BAOLAN, H.; SHUAI, L.; WEI, W.; LIDONG, S.; LIPING, L.; WEIPING, L.; GUANGMING, T.; XIANGYANG, X.; PING, Z. pH-dominated niche segregation of ammonia-oxidising microorganisms in Chinese agricultural soils. **FEMS microbiology ecology**, Amsterdam, v. 90, n. 1, p. 290–299, 2014.
- 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.
- BROCHIER-ARMANET, C.; BOUSSAU, B.; GRIBALDO, S.; FORTERRE, P. Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. **Nature reviews. Microbiology**, London, v. 6, n. 3, p. 245–252, 2008.
- BRU, D.; RAMETTE, A.; SABY, N.P.A.; DEQUIEDT, S.; RANJARD, L.; JOLIVET, C.; ARROUAYS, D.; PHILIPPOT, L. Determinants of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities at the landscape scale. **The ISME Journal**, New York, v. 5, n. 3, p. 532–542, 2011.
- BUCKLEY, D.H.; SCHMIDT, T.M. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 6, p. 441–452, 2003.
- CAO, H.; AUGUET, J.-C.; GU, J.-D. Global ecological pattern of ammonia-oxidizing archaea. **PloS one**, San Francisco, v. 8, n. 2, p. e52853, 2013.
- CAO, P.; ZHANG, L.; SHEN, J.; ZHENG, Y.; DI, H.J.; HE, J. Distribution and diversity of archaeal communities in selected Chinese soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 80, n. 1, p. 146–158, 2012.

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; COSTELLO, E.K.; FIERER, N.; PEÑA, A.G.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J.I.; HUTTLEY, G.A.; KELLEY, S.T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J.E.; LEY, R.E.; LOZUPONE, C.A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B.D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.R.; TURNBAUGH, P.J.; WALTERS, W.A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. Correspondence QIIME allows analysis of high- throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. **Nature**, London, v. 7, n. 5, p. 335–336, 2010.

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

DEMERGASSO, C.; CASAMAYOR, E.O.; CHONG, G.; GALLEGUILLOS, P.; ESCUDERO, L.; PEDRÓS-ALIÓ, C. Distribution of prokaryotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, Northern Chile. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 48, n. 1, p. 57–69, 2004.

DIAS, A.C.F.; DINI-ANDREOTE, F.; TAKETANI, R.G.; TSAI, S.M.; AZEVEDO, J.L.; MELO, I.S.; ANDREOTE, F.D. Archaeal communities in the sediments of three contrasting mangroves. **Journal of Soils and Sediments**, Landsberg, v. 11, n. 8, p. 1466–1476, 2011.

DINI-ANDREOTE, F.; ANDREOTE, F.D.; COSTA, R.; TAKETANI, R.G.; ELSAS, J. D.; ARAÚJO, W.L. Bacterial soil community in a Brazilian sugarcane field. **Plant and Soil**, London, v. 336, n. 1/2, p. 337–349, 2010.

DINI-ANDREOTE, F.; DE CÁSSIA PEREIRA E SILVA, M.; TRIADÓ-MARGARIT, X.; CASAMAYOR, E.O.; ELSAS, J.D.; SALLES, J.F. Dynamics of bacterial community succession in a salt marsh chronosequence: evidences for temporal niche partitioning. **The ISME Journal**, New York, v. 8 ???, n. 4, p. 1–13, 2014.

EHRHARDT, C.J.; HAYMON, R.M.; LAMONTAGNE, M.G.; HOLDEN, P.A. Evidence for hydrothermal Archaea within the basaltic flanks of the East Pacific Rise. **Environmental microbiology**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 900–912, 2007.

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.

GUMIERE, T. **Biogeografia de comunidades fúngicas em áreas cultivadas com cana-de-açúcar**. 2012. 147 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

HU, H.-W.; ZHANG, L.-M.; DAI, Y.; DI, H.; HE, J. pH-dependent distribution of soil ammonia oxidizers across a large geographical scale as revealed by high-throughput pyrosequencing. **Journal of Soils and Sediments**, Landsberg, v. 13, n. 8, p. 1439–1449, 2013.

HU, H.-W.; ZHANG, L.-M.; YUAN, C.-L.; HE, J. Contrasting Euryarchaeota communities between upland and paddy soils exhibited similar pH-impacted biogeographic patterns. **Soil Biology and Biochemistry**, New York, v. 64, p. 18–27, 2013.

JIANG, H.; HUANG, L.; DENG, Y.; WANG, S.; ZHOU, Y.; LIU, L. Latitudinal distribution of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in the agricultural soils of eastern china. **Applied and Environmental microbiology**, Oxford, v. 80, n. 18, p. 5593–5602, 2014.

KAVAMURA, V.N.; TAKETANI, R.G.; LANÇONI, M.D.; ANDREOTE, F.D.; MENDES, R.; SOARES, M.I. Water regime influences bulk soil and Rhizosphere of *Cereus jamacaru* bacterial communities in the Brazilian Caatinga biome. **PloS one**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. e73606, 2013.

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.

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

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.

LUPATINI, M.; JACQUES, R.J.S.; ANTONIOLLI, Z.I.; SULEIMAN, A.K.A.; FULTHORPE, R.R.; ROESCH, L.F.W. Land-use change and soil type are drivers of fungal and archaeal communities in the Pampa biome. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 29, n. 2, p. 223–233, 2013.

MAO, Y.; YANNARELL, A.C.; DAVIS, S.C.; MACKIE, R.I. Impact of different bioenergy crops on N-cycling bacterial and archaeal communities in soil. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 928–942, 2013.

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

NICOL, G.W.; GLOVER, L.A.; PROSSER, J.I. The impact of grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 152–162, 2003.

OCHSENREITER, T.; SELEZI, D.; QUAISER, A.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, L.; SCHLEPER, C. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 9, p. 787–797, 2003.

OFFRE, P.; SPANG, A.; SCHLEPER, C. Archaea in biogeochemical cycles. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 67, p. 437–457, 2013.

OODMAN, R.O.M.G. Molecular phylogeny of Archaea from soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, p. 277–282, Jan. 1997.

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

POPLAWSKI, A.B.; MÅRTENSSON, L.; WARTIAINEN, I.; RASMUSSEN, U. Archaeal diversity and community structure in a Swedish barley field: specificity of the EK510R/(EURY498) 16S rDNA primer. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 69, n. 1, p. 161–173, 2007.

RACHID, C.T.C.C.; SANTOS, A.L.; PICCOLO, M.C.; BALIEIRO, F.C.; COUTINHO, H.L.C.; PEIXOTO, R.S.; TIEDJE, J.M.; ROSADO, A.S. Effect of sugarcane burning or green harvest methods on the Brazilian Cerrado soil bacterial community structure. **PloS one**, San Francisco, v. 8, n. 3, p. e59342, 2013.

SHEN, J.P.; CAO, P.; HU, H.; HE, J. Differential response of archaeal groups to land use change in an acidic red soil. **The Science of the Total Environment**, Oxford, v. 461/462, p. 742–749, 2013.

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

TAKETANI, R.G.; TSAI, S.M. The influence of different land uses on the structure of archaeal communities in Amazonian anthrosols based on 16S rRNA and amoA genes. **Microbial ecology**, New York, v. 59, n. 4, p. 734–743, 2010.

TOURNA, M.; STIEGLMEIER, M.; SPANG, A.; KÖNNEKE, M.; SCHINTLMIESTER, A.; URICH, T. *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, San Francisco, v. 108, n. 20, p. 8420–8425, 2011.

TRIPATHI, B.M.; KIM, M.; LAI-HOE, A.; SHUKOR, N.A.A.; RAHIM, R.A.; GO, R.A.D. pH dominates variation in tropical soil archaeal diversity and community structure. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 86, n. 2, p. 303–311, 2013.

WESSÉN, E.; HALLIN, S.; PHILIPPOT, L. Differential responses of bacterial and archaeal groups at high taxonomical ranks to soil management. **Soil Biology and Biochemistry**, New York, v. 42, n. 10, p. 1759–1765, 2010.

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

ZHANG, D.-C.; MÖRTELMAIER, C.; MARGESIN, R. Characterization of the bacterial archaeal diversity in hydrocarbon-contaminated soil. **The Science of the Total Environment**, Oxford, v. 421/422, p. 184–196, 2012.

ZHENG, Y.-M.; CAO, P.; FU, B.; HUGHES, J.M.; HE, J. Ecological drivers of biogeographic patterns of soil archaeal community. **PloS one**, San Francisco, v. 8, n. 5, p. e63375, 2013.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento sobre a microbiologia dos solos agrícolas é bastante profundo em exemplos pontuais, tendo como principais grupos microbianos alvos de estudo os fixadores de nitrogênio atmosférico, ou os fungos micorrízicos. No entanto, para uma melhor exploração deste recursos, encontrado em todas as áreas de cultivo agrícola mundial, um melhor conhecimento é necessário sobre a estruturação das comunidades microbianas presentes nestes solos, bem como inferências mais detalhadas, e válidas em diferentes regiões, sobre os fatores ambientais relacionados com as comunidades microbianas dos solos. Este trabalho objetivou introduzir os conceito de biogeografia nos estudos na área de microbiologia dos solos agrícolas, escolhendo como modelo a cana-de-açúcar, onde foi avaliada a heterogeneidadeda do solo, dos manejos empregados, e da distribuição espacial dos organismos alvo, dando origem a descrição dos principais moduladores da comunidade de procariotos neste ambiente. Resta como questionamento geral aos resultados deste trabalho, a possibilidade de extrapolação destes resultados para outras culturas agrícolas. Neste ponto, pode-se fazer inicialmente uma afirmativa, baseado no fato de que o estudo está focado no solo, e em como a comunidade residente neste ambiente é afetada pelas diferentes variáveis quantificadas; enquanto que o ponto negativo a esta extrapolação está no possível efeito de práticas agrícolas específicas para o cultivo da cana-de-açúcar serem interferentes sobre os resultados aqui obtidos.

Dentro deste contexto, pode-se destacar que os atributos de química foram preponderantes na explicação da variação na estrutura das comunidades avaliadas, com especial destaque para pH e matéria orgânica, granulometria e distância geográfica, os quais foram moduladores comuns para os dois domínios estudados (Bacteria e Archaea). Esta observação elege estas variáveis como àquelas a serem observadas, ou essencialmente inclusas, em projetos que visem a modulação do uso da microbiota do solo já obtenção de melhores resultados de produção vegetal, seja no suprimento nutricional de plantas, ou na proteção das mesmas contra estresses ambientais.

Mais especificamente, este estudo foi inovador na descrição da comunidade de arqueias em solos agrícolas, elegendo este grupo como abundante neste ambiente, e relacionado a estruturação destas comunidades a variáveis ambientais, como os efeitos de histórico de cultivo da área e a colheita mecanizada, além dos a tributos

químicos anteriormente citados. Portanto, tanto a comunidade de arqueias, como grupos conhecidos dentro deste domínio, como os promotores dos processos de metanogênese ou da oxidação do amônio, devem ser integrados em estudos de microbiologia dos solos agrícolas.

Outro ponto de destaque entre os resultados obtidos, refere-se a descrição das interações ecológicas entre os principais grupos bacterianos encontrados nos solos analisados. Foram descritas tanto relações positivas encontradas, como as encontradas entre componentes dos filos *Acidobacteria* e *Proteobacteria*, como as correlações negativas, destes mesmos filos contra os componentes do filo *Actinobacteria*. Neste ponto, o trabalho foi inovador ao passo que atribui uma fração da variabilidade nas comunidades estudadas às próprias interações biológicas compartilhadas por seus componentes.

Além desta fração da variância, outro fato que chama a atenção é a descrição da ocorrência de padrões de biogeografia para a estruturação de comunidade microbianas em solos agrícolas. Este fato era desconhecido neste tipo de solos, onde acreditava-se que pela interferência antrópica no sistema, as comunidades microbianas seriam mais homogêneas, mesmo em solos distintos sob o mesmo cultivo.

Portanto, a partir dos conhecimentos relatados neste estudo, pode-se não apenas direcionar melhor futuros estudos na área da microbiologia agrícola, mas também, concluir que devemos avaliar a comunidade microbiana em distintas regiões, permitindo assim, avaliações mais robustas que possam contribuir para um futuro manejo adequado da microbiota nestes solos.