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

Oxidação Microbiológica do Enxofre Elementar no Solo

Adriano Reis Lucheta

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

**Piracicaba
2010**

Adriano Reis Lucheta
Engenheiro Agrônomo

Oxidação Microbiológica do Enxofre Elementar no Solo

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

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

**Piracicaba
2010**

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

Lucheta, Adriano Reis

Oxidação microbiológica do enxofre elementar no solo / Adriano Reis Lucheta. - -
Piracicaba, 2010.
178 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Bactérias 2. Biodiversidade 3. Enxofre 4. Fertilizantes biológicos 5. Microbiologia do solo 6. Oxidação I. Título

CDD

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

**Aos meus Avós, meus Pais, minha Irmã e a uma Estrela que apontou
no meu céu...**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais por acreditar no meu potencial e pelo incentivo na realização do Doutorado. Mais do que um orientador, com certeza um grande amigo. Agradeço também, na sua pessoa, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola/ESALQ-USP pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo financiamento do projeto e bolsa de estudos e ao revisor dos relatórios científicos.

Ao Dr. Luís Ignácio Prochnow, que juntamente com o Prof. Lambais foram os idealizadores deste projeto, pelas sugestões e contatos para a aquisição das amostras de solo.

Ao Dr. Lourival Vilela da EMBRAPA CERRADOS e ao Dr. Eros Francisco da FUNDAÇÃO MT, pela disponibilização das amostras de solo usadas neste estudo.

Ao Dr. Oswaldo Garcia Júnior (*in memorian*) e à Dra. Denise Bevilaqua, do Instituto de Química da UNESP/ARARAQUARA, pelo fornecimento dos isolados de *Acidithiobacillus thiooxidans*.

Aos Drs. Marcos Machado e Marco Aurélio Takita e ao amigo Kleber Borges, do Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”, pela utilização da plataforma de sequenciamento de DNA.

Aos Professores Doutores: Elke J. B. N. Cardoso, Marli de Fátima Fiore e Carlos Eduardo P. Cerri, pela participação no exame de qualificação e sugestões bastante valiosas.

À secretária do PPG em Microbiologia Agrícola Giovana Maria de Oliveira, por todo o apoio e à bibliotecária Silvia Maria Zinsly pelas correções da tese.

Aos meus avós e padrinhos Waldemar e Aparecida, meus pais José Roberto e Virgínia, minha irmã Isabela, por todo o seu amor e apoio incondicionais e imprescindíveis para a concretização deste sonho. Muito obrigado por poder contar com vocês e fazer parte desta família maravilhosa.

À minha estrela Nijima, minha namorada, tão importante na minha vida e nessa reta final, agradeço pelo seu amor, compreensão e incentivo, e, aos seus pais Mara e Mauro pelo acolhimento.

Aos amigos desta caminhada: Gisele Nunes, Marcio Moraes, Rafael Armas, Giselle Gomes e Felipe Cury, Kelly Justin, Elisa Matos, Vívian Carvalho, Alice Cassetari, Joze Correa, Lucas Azevedo e Simone Azevedo, Eder dos Santos, Winston Franz Ruiz, Rafael Valadares, à ala colombiana: Nelson Piraneque, Sandra Montenegro, John Ausique, Silvia Barrera e Maryeimy Varon, à Carolina Maluche-Baretta, Cristiane Fasanella e Fernando Andreote, André Nakatani, Rafael Vasconcelos, Carlos Marcelo, Thiago Rosignolo e a muitos outros amigos que infelizmente não foram citados aqui, muito obrigado pela convivência, troca de conhecimento e experiências de vida.

Aos amigos e técnicos do Departamento de Solos: Denise Mescolotti, Wladimir Rosignolo e Fernando Baldesin, e demais funcionários por todo o suporte.

Aos eternos amigos: Henrique Sérgio Alves, Valesca Pandolfi, Irwing Joseph Berger, Jeanedy Pazinato e Adriano Malosso, a distância e o tempo não mudam o meu carinho por vocês.

EPÍGRAFE

"As oportunidades normalmente se apresentam
disfarçadas de trabalho árduo e
é por isso que muitos não as reconhecem"

Ann Landers

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 DESENVOLVIMENTO.....	19
2.1 Revisão Bibliográfica.....	19
2.1.1 Transformações do enxofre (S) na natureza	19
2.1.1.1 Ocorrência natural do S e sua exploração comercial	19
2.1.1.2 A importância do S para as plantas.....	21
2.1.1.3 Enxofre orgânico no solo.....	21
2.1.1.4 Processos de mineralização e imobilização do S no solo	22
2.1.1.5 O S inorgânico no solo	24
2.1.2 Oxidação microbiológica do S ⁰ no solo	26
2.1.2.1 O gênero <i>Thiobacillus</i>	26
2.1.2.2 Diversidade de organismos oxidantes de formas reduzidas de S no solo.....	28
2.1.2.3 Mecanismos de Oxidação do S nas bactérias.....	31
2.1.3 Avaliação da oxidação do S ⁰ no solo	33
2.1.3.1 Métodos de determinação da oxidação do S ⁰ no solo.....	33
2.1.3.2 Variáveis que afetam a oxidação do S ⁰ no solo	35
2.2 Material e Métodos.....	39
2.2.1 Amostragem	39
2.2.2 Ensaio de incubação dos solos com S ⁰ em microcosmos.....	39
2.2.2.1 Determinação do S ⁰ remanescente nos solos	40
2.2.2.2 Determinação de sulfato (SO ₄ ²⁻) e cálculo da taxa de oxidação do S ⁰	40
2.2.2.3 Determinação do pH em CaCl ₂ (0,01M)	41
2.2.3 Análise da estrutura das comunidades e diversidade de Bactéria	41
2.2.3.1 Extração do DNA metagenômico	42
2.2.3.2 Detecção molecular de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> nos solos	42
2.2.3.3 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)	42
2.2.3.4 Construção das bibliotecas de clones do gene rRNA 16S de Bactéria	44

2.2.3.5 Sequenciamento das bibliotecas de clones do gene rRNA 16S	45
2.2.3.6 Análise das sequências e estimativa dos índices de riqueza e diversidade	45
2.2.4 Análise da diversidade de Archaea.....	47
2.2.4.1 Construção das bibliotecas de clones do gene rRNA 16S.....	47
2.2.5 Isolamento e cultivo de bactérias oxidantes de S	48
2.2.5.1 Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)	48
2.2.5.2 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento do gene rRNA 16S dos isolados.....	49
2.2.6 Encapsulamento de bactérias oxidantes de S ⁰ e ensaios de inoculação	51
2.2.6.1 Ensaio piloto de encapsulamento de bactérias oxidantes de S ⁰	51
2.2.6.2 Inoculação de micro-esferas contendo bactérias oxidantes de S ⁰ em solo	52
2.3 Resultados e Discussão	53
2.3.1 Caracterização físico-química dos solos.....	53
2.3.2 Ensaio de incubação dos solos com S ⁰ em microcosmos	56
2.3.2.1 Determinação do S ⁰ remanescente nos solos	56
2.3.2.2 Concentração de SO ₄ ⁻² nos solos.....	58
2.3.2.3 Taxa de oxidação do S ⁰ nos solos.....	63
2.3.2.4 Determinação do pH do solo em CaCl ₂	68
2.3.3 Análises da estrutura das comunidades e diversidade de Bacteria.....	73
2.3.3.1 Detecção molecular da espécie <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> nos solos	73
2.3.3.2 Análise da estrutura das comunidades de Bacteria nos solos tratados com S ⁰ .	76
2.3.3.3 Análise da diversidade de Bacteria nos solos tratados com S ⁰	80
2.3.4 Análise da diversidade de Archaea nos solos tratados com S ⁰	90
2.3.5 Isolamento e cultivo de bactérias oxidantes de S	101
2.3.6 Encapsulamento de bactérias oxidantes de S ⁰ e ensaios de inoculação	114
2.3.6.1 Ensaio piloto de encapsulamento das bactérias oxidantes de S ⁰	114
2.3.6.2 Inoculação de micro-esferas contendo bactérias oxidantes de S ⁰ em solo	121
3 CONCLUSÕES.....	139
REFERÊNCIAS	141

RESUMO

Oxidação Microbiológica do Enxofre Elementar no Solo

Reduções dos níveis de sulfato nos solos vêm sendo observadas em função de práticas agrícolas e exportação de biomassa. O enxofre Elementar (S^0) pode ser usado como fertilizante, contudo para ser absorvido pelas plantas deve ser antes oxidado a sulfato. A oxidação microbiológica do S^0 está associada com *Acidithiobacillus thiooxidans*, apesar de muitos trabalhos não detectarem esta espécie nos solos. Trabalhos recentes têm mostrado uma grande diversidade de microrganismos capazes de oxidar o S^0 no solo além do *A. thiooxidans*, entretanto, pouco se sabe sobre esta diversidade em solos brasileiros. Os objetivos deste trabalho foram determinar a taxa de oxidação do S^0 em três solos brasileiros, a diversidade de Bacteria e Archaea envolvidas nesse processo, isolar bactérias oxidantes de enxofre (BOE) e avaliar seu potencial como biofertilizante. Amostras de solos foram coletadas em Anhembi/SP (ANB), Brasília, DF (BRA) e Rondonópolis, MT (RDP). Os solos foram enriquecidos com 10 g de S^0 kg^{-1} ($+S^0$) ou não ($-S^0$) e incubados em microcosmos a 28 °C por 0, 6, 22, 38, 54, 67, 86 e 102 dias. A taxa de oxidação do S^0 variou entre 2,8 e 3,2 $ug\ S\ cm^{-2}\ dia^{-2}$ nos solos arenosos (ANB e RDP) e 1,3 $ug\ S\ cm^{-2}\ dia^{-2}$ no solo argiloso (BRA) após 102 dias de incubação. A oxidação do S^0 elevou a quantidade de sulfato e reduziu o pH principalmente nos solos arenosos. A aplicação do S^0 alterou a estrutura e a diversidade da comunidade microbiana. Foram obtidas 811 seqüências do gene rRNA 16S de bactérias, sendo agrupadas em 518 Unidade Taxonômicas Operacionais (UTOs). Os principais filos nos solos foram Acidobacteria, Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria. Foram obtidas 463 seqüências de rRNA 16S de Archaea, sendo agrupadas em 39 UTOs. Mais de 84% da UTOs foram classificadas como Archaea não classificadas enquanto 15% foram classificadas como Euryarchaeota. A diversidade de Archaea não foi muito afetada pelo S^0 . Cinquenta BOE foram isoladas e afiliadas a Proteobacteria (68%), Actinobacteria (18%) e Firmicutes (14%) após o seqüenciamento do rRNA 16S. Os gêneros atribuídos foram: *Aurantimonas*, *Acinetobacter*, *Novosphingobium*, *Methylobacterium*, *Paracoccus*, *Bradyrhizobium*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Micrococcus* e *Bacillus*. Esferas de alginato $+S^0$, contendo os isolados de BOE ANB9 (*Acinetobacter*), RDP5 (*Mycobacterium*) e *A. thiooxidans* foram incubados em areia estéril, resultando no aumento de 111%, 430% e 5350% no SO_4^{2-} comparado ao controle negativo após 14 dias de incubação, respectivamente. As taxas de oxidação do S^0 foram 4,7 (ANB9), 18 (RDP5) e 130 (*A. thiooxidans*) vezes maiores do que o controle negativo após o mesmo período. As micro-esferas carregando as bactérias e o S^0 foram incubadas nos solos ANB e BRA durante 54 dias. *A. thiooxidans* foi o oxidante de enxofre mais eficiente, apresentando a maior taxa de oxidação, aumento do SO_4^{2-} e redução do pH em comparação com os outros isolados de BOE. As esferas de *A. thiooxidans* também foram capazes de solubilizar rocha fosfática. Novas informações foram geradas sobre a diversidade de bactérias envolvidas na oxidação do S^0 em solos brasileiros.

Palavras-chave: Enxofre; Diversidade Microbiana; Biofertilizante; Agricultura

ABSTRACT

Microbiological Elemental Sulfur Oxidation in Soil

Depletion of sulfur levels in soil has been observed as a result of agricultural practices and biomass harvesting. Elemental sulfur (S^0) may be an interesting fertilizer, however it must be oxidized to sulfate in order to be taken up by plants. Biological oxidation of S^0 is commonly associated to *Acidithiobacillus thiooxidans*, although many studies failed to detect them in soils. Recent efforts have shown a great diversity of microorganisms able to oxidize S^0 , besides *A. thiooxidans*. Nevertheless, no information is available for Brazilian soils. The aims of this work were to determine the S^0 oxidation rates of three Brazilian soils, the bacterial and archaeal communities' diversity associated to S^0 oxidation, as well as, to isolate sulfur oxidizing bacteria (SOB) and evaluate its potential as a biofertilizer. Soils sampled in Anhembi, SP (ANB), Brasília, DF (BRA) and Rondonópolis, MT (RDP) were enriched with 10 g of S^0 kg⁻¹ (+ S^0) or not (- S^0) and incubated in microcosms for 0, 6, 22, 38, 54, 67, 86 and 102 days under 28 °C. Oxidation rates of S^0 were low, ranging to 2,8 and 3,2 ug S cm⁻² day⁻² in the sand soils (RDP and BRA) and 1,3 ug S cm⁻² day⁻² in the clay one (BRA) after 102 days incubation. Soil SO₄²⁻ content was increased and pH decreased as result of S^0 oxidation mainly in the sand soils. Bacterial community structure and diversity were affected by S^0 amendment and time of incubation, represented by changes in the DGGE profile and phylum distribution. Were obtained 811 bacterial 16S rRNA sequences, clustered in 518 Operational Taxonomic Units (OTUs). The predominant phyla in the soils were Acidobacteria, Actinobacteria, Firmicutes and Proteobacteria. Were obtained 463 archaeal 16S rRNA sequences clustered into 39 OTUs. More than 84% of the OTUs were assembled to unclassified Archaea whereas 15% were classified as Euryarchaeota. Archaea diversity was not mostly affected by S^0 . Fifty SOB were isolated and affiliated to Proteobacteria (68%), Actinobacteria (18%) and Firmicutes (14%) after 16S rRNA sequencing. The assigned genera were *Aurantimonas*, *Acinetobacter*, *Novosphingobium*, *Methylobacterium*, *Paracoccus*, *Bradyrhizobium*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Micrococcus* and *Bacillus*. Alginate beads containing the SOB isolates ANB9 (*Acinetobacter*), RDP5 (*Mycobacterium*) and *A. thiooxidans* plus S^0 were incubated in sterile sand resulting in 111%, 430% and 5350% increment in SO₄²⁻ comparing to negative controls after 14 days incubation, respectively. The S^0 oxidation rate was 4,7 (ANB9), 18 (RDP5) and 130 (*A. thiooxidans*) times greater than the negative control after the same time. The entrapped bacteria with S^0 were incubated in ANB and BRA soils for 54 days in microcosms. *A. thiooxidans* was the best S^0 oxidizer, showing the highest oxidation rate, increment in SO₄²⁻ and pH decrease comparing with the other SOB isolates. *A. thiooxidans* beads were also able to solubilize phosphate rock. New information was generated about the bacterial diversity involved in the S^0 oxidation in Brazilian soils.

Keywords: Sulfur; Microbial Diversity; Biofertilizer; Agriculture

1 INTRODUÇÃO

A expansão das fronteiras agrícolas, bem como o crescimento da produção e produtividade, vem caminhando nos últimos anos intimamente ligada a necessidade da utilização de insumos químicos, principalmente os fertilizantes minerais. Entretanto, além da dependência da importação destes insumos, preocupações de aspecto agrônômico também estão surgindo, como o empobrecimento em alguns nutrientes secundários nos solos, principalmente o enxofre (S).

A redução dos níveis de S nos solos tropicais é dada principalmente pela maior utilização de fontes concentradas de nitrogênio (N) e fósforo (P) em fertilizantes que não contém S em suas formulações, redução no uso de pesticidas sulfurosos, maior exportação do solo pelo alto rendimento das culturas, redução dos aportes de S nas águas de chuva e controle da emissão atmosférica de dióxido de S provenientes da queima de combustíveis fósseis além da própria deficiência natural em algumas regiões, por exemplo, no cerrado brasileiro.

Uma alternativa para a reposição do S nos solos é a utilização do S^0 (100% de S^0) aplicado na forma de pó, agregado a argilas expansíveis (bentonita) ou recobrimo fertilizantes, como a uréia, permitindo assim o uso de fórmulas ricas em NPK. Contudo, as plantas só podem absorver o S^0 aplicado ao solo após sua oxidação até a forma de sulfato (SO_4^{2-}), sendo este um processo predominantemente microbiológico.

Apesar de estudos recentes demonstrarem uma grande diversidade de gêneros de bactérias envolvidos no processo de oxidação do S^0 no solo, o gênero *Acidithiobacillus* ainda é um dos mais estudados. A dificuldade no isolamento de *Acidithiobacillus thiooxidans* em amostras de solo agrícola e sua frequente associação a ambientes extremos, como lagoas de drenagem ácida em áreas de mineração (pH 1 a 2), geram dúvidas sobre sua real contribuição para a oxidação de S^0 em condições agrícolas. Vários outros gêneros de microrganismos mixotróficos e heterotróficos vêm sendo isolados em amostras de solos naturais, mostrando a existência de uma grande diversidade de oxidantes de S.

Poucos estudos foram realizados no Brasil a respeito da capacidade natural dos solos em oxidar o S^0 e a comunidade microbiana envolvida neste processo. Horowitz

(2003) avaliou a taxa de oxidação do S em amostras de 42 solos de vários estados do Brasil, quando aplicada uma dose de $10 \text{ g S}^0 \text{ kg}^{-1}$ de solo e encontrou uma variação de até vinte vezes. Neste trabalho foram avaliados somente aspectos físicos que interferiam na oxidação, sendo os teores de Al^{3+} e de matéria orgânica os mais significativos. Mesmo sem a avaliação de aspectos biológicos, o autor sugere que, nos solos do Brasil, a oxidação do S^0 é realizada, pelo menos em parte, por microrganismos heterotróficos.

Diferentemente, Pinto e Nahas (2002) observaram que a população de bactérias autotróficas oxidantes de S^0 foi duas vezes maior do que a população de heterotróficos oxidantes de tiosulfato, através da contagem de bactérias oxidantes de formas reduzidas de S pela técnica do Número Mais Provável (NMP). Este fato, como justificado pelo autor, pode advir da baixa quantidade de matéria orgânica no solo, sendo que nesta situação, os microrganismos autotróficos ou mixotróficos teriam a vantagem de oxidar o S independentemente da disponibilidade de carbono.

Uma vez que a eficiência na oxidação do S^0 aplicado ao solo está intimamente associada à comunidade microbiana presente, é extremamente interessante a utilização de métodos independentes de cultivo para a identificação da diversidade microbiana com potencial de oxidação do S^0 e eventuais impactos da aplicação do S^0 ao solo sobre a estrutura das comunidades microbianas. Estudos sobre a ecologia de microrganismos envolvidos na oxidação do S^0 nos solos brasileiros são raros e o potencial natural de oxidação do S pela microbiota dos solos é pouco conhecido. Essa falta de conhecimento tem restringido a aplicação biotecnológica desse processo ao grupo dos *Acidithiobacillus*, o qual pode não ser o mais eficiente na oxidação do S^0 em solos agrícolas.

O presente trabalho visa avaliar a capacidade natural de alguns solos brasileiros de oxidar S^0 aplicado como fertilizante, avaliar a diversidade de representantes dos domínios Bacteria e Archaea associadas com o processo de oxidação do S^0 através de técnicas moleculares independentes de cultivo, isolar e identificar bactérias oxidantes de formas reduzidas de enxofre dos solos estudados e testar seu potencial de aplicação como biofertilizante. O trabalho visa também determinar a contribuição de *Acidithiobacillus thiooxidans* para a oxidação do S^0 nos solos avaliados.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Transformações do enxofre (S) na natureza

2.1.1.1 Ocorrência natural do S e sua exploração comercial

O enxofre (S) é um elemento químico não-metálico, naturalmente apresentado em três formas (alfa, beta e gama) com coloração amarela (alfa) ou amarela pálida (beta e gama), cuja fórmula é S_8 . O S é insolúvel em água e tem solubilidade variada em solventes orgânicos (ALBUQUERQUE; AZAMBUJA; LINS, 2008).

O S compõe entre 0,06 e 0,10% da crosta terrestre (HAVLIN et al., 2005) sendo encontrado em depósitos de origem vulcânica, bacias de evaporitos e domos salinos em sua forma nativa. Também pode estar associado a minerais na forma de sulfetos (calcopirita, pirrotita, esfalerita, galena, arsenopirita, pirita) ou sulfatos (anidrita, barita, gipsita), gás natural, petróleo, carvão mineral, areias betuminosas, folhelhos pirobetuminosos e xistos. O S ainda pode ser encontrado na forma gasosa (H_2S) em mangues, pântanos e proveniente de atividades industriais (ALBUQUERQUE; AZAMBUJA; LINS, 2008; FONSECA; BACIC, 2009).

Estima-se que as reservas mundiais de S sejam da ordem de 5 bilhões de toneladas nas formas associadas ao gás-natural, petróleo, sulfetos metálicos, domos salinos e depósitos vulcânicos, 600 bilhões de toneladas na forma de carvão, folhelhos pirobetuminosos e xistos, e praticamente ilimitadas na forma de sulfatos (gipsita e anidrita) (ALBUQUERQUE; AZAMBUJA; LINS, 2008). As reservas brasileiras estão computadas em 48,5 milhões de toneladas, ou 1,2% da reserva mundial (FONSECA; BACIC, 2009). As principais reservas de S no Brasil estão associadas ao refino do petróleo e gás natural (explorado pela Petrobrás), na forma de folhelhos pirobetuminosos da formação Irati na bacia do Paraná, associadas ao carvão mineral no sul do país, principalmente em Santa Catarina (75% pirita e 25% de carvão mineral), como subproduto da exploração de sulfetos metálicos (sulfetos de zinco, níquel e ouro

em Minas Gerais, cobre na Bahia, Goiás e Pará) e como enxofre nativo na forma de sedimentos extratiformes (7,1% de S) no município de Siriri, no estado do Sergipe (FONSECA; BACIC, 2009).

Segundo o Departamento Nacional de Produção Mineral - DPNM (FONSECA; BACIC, 2009) a produção mundial de S no ano de 2008 atingiu cerca de 69 milhões de toneladas, sendo os principais países produtores: Canadá (13,5%), Estados Unidos (13%), China (12%), Rússia (10%), Japão, Arábia Saudita, Alemanha e Cazaquistão. A produção brasileira no mesmo ano foi de 513 mil toneladas (0,7% da produção mundial), sendo 33% do S proveniente do refino de petróleo e folhelhos betuminosos e 67% como subproduto da mineração e metalurgia. No entanto, esses números devem crescer a partir da recuperação das formas de S associadas ao refino de petróleo e gás natural nas recém descobertas bacias da camada pré-sal e das políticas públicas de redução dos teores de S nos combustíveis.

De todo o S consumido no mundo, 55% é para a produção de fertilizantes. No Brasil, esse número ultrapassa 65%, sendo a maior parte do S consumido na forma de ácido sulfúrico utilizado na solubilização de rochas fosfáticas e produção de sulfato de amônia. Além do uso no segmento de fertilizantes, o S também é utilizado em pigmentos, indústria química, fabricação de papel, fabricação de aço, fibras celulósicas, fotografia, produção de bissulfeto de carbono, inseticidas, fungicidas, explosivos, vulcanização de borrachas, entre outras aplicações (ALBUQUERQUE; AZAMBUJA; LINS, 2008).

Em 2008, as importações de S⁰ foram à ordem de 2,1 milhões de toneladas ao custo de US\$ 1,03 bilhão, além da importação de 508 mil toneladas de ácido sulfúrico, gerando um déficit na balança comercial de US\$ 1,1 bilhão (FONSECA; BACIC, 2009). Espera-se que o aumento da produção interna e a tendência de decréscimo dos preços internacionais reduzam esse déficit comercial.

2.1.1.2 A importância do S para as plantas

O S é um constituinte vital para todos os organismos, sendo necessário na síntese dos aminoácidos metionina, cisteína e cistina, componentes das proteínas. Resíduos de cisteína também são importantes na conformação estrutural das proteínas e ligação de metais, auxiliando na catálise de reações enzimáticas (KERTESZ et al., 2007). O S é fundamental na síntese da coenzima A (importante na oxidação e síntese de ácidos graxos, síntese de aminoácidos e oxidação de intermediários do Ciclo do Ácido Cítrico), ferredoxina (vital no processo de fotossíntese e fixação biológica de N) e vitaminas (HAVLIN et al., 2005).

As raízes das plantas absorvem S preferencialmente na forma de sulfato (SO_4^{2-}), podendo também ser absorvido na forma de tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$). Pequenas quantidades de SO_2 podem ser absorvidas pelas folhas, sendo esta forma tóxica quando em altas concentrações (HAVLIN et al., 2005). Vitti e colaboradores (2007) relataram a absorção foliar de S^0 em plantas de soja, independente da dose e natureza da fonte, observando maior eficiência do que a aplicação via solo e resultando no aumento dos teores de N e S nas folhas.

A concentração de S nas plantas varia entre 0,1 e 0,5%, sendo a concentração decrescente entre as ordens *Cruciferae*, *Leguminosae* e *Gramineae*. Os sintomas de deficiência de S são principalmente a redução do crescimento da planta e o surgimento de clorose uniforme nas folhas mais jovens (HAVLIN et al., 2005).

2.1.1.3 Enxofre orgânico no solo

Embora a fração inorgânica seja a fração prontamente disponível para a absorção pelas raízes das plantas, ela representa em média menos do que 5% do total de S do solo. A maior parte do S do solo (>95%) está ligada a moléculas orgânicas, indiretamente disponíveis para as plantas (KERTESZ; MIRLEAU, 2004). Os métodos químicos tradicionais permitem a separação de três frações amplas de S orgânico no solo, sendo elas: S orgânico não ligado diretamente ao carbono (C) e redutível a H_2S pelo ácido iodídrico (HI); S orgânico ligado diretamente ao C (C-S) reduzido a H_2S pelo

composto Raney níquel, e S não identificado, residual ou inerte. A primeira fração é composta principalmente por ésteres de sulfatos (C-O-S) como: fenóis sulfatados, polissacarídeos sulfatados e lipídios sulfatados, entre outras, a segunda fração é constituída pelos aminoácidos contendo S (metionina, cistina e cisteína), mercaptanas, dissulfetos, sulfonas e ácido sulfônico, e a terceira fração geralmente é negligenciada (FRENEY, 1967; TABATABAI, 1984; ERIKSEN, 2008).

Estudos mais recentes utilizando espectroscopia de absorção de raios-X na borda K do enxofre (S K-edge X-ray absorption spectroscopy – XANES), diretamente do solo ou da fração húmica, permitiram a separação do S-orgânico em cinco frações de acordo com o estado de oxidação, sendo elas: duas frações de S reduzido (poli, di e monossulfetos, tiol e tiofenos), duas frações de S em estados de oxidação intermediários (sulfóxidos e sulfonatos) e uma contendo S altamente oxidado (ésteres de sulfato) (KERTESZ; FELLOWS; SCHMALENBERGER, 2007; ZHAO et al., 2006; SOLOMON; LEHMANN; MARTINEZ, 2003).

2.1.1.4 Processos de mineralização e imobilização do S no solo

Segundo Kertesz e Mirleau (2004), o estoque de S presente no solo está sempre em constante transformação, sendo parte do S-inorgânico transformado em S-orgânico (imobilização), diferentes formas de S-orgânico se inter-convertendo e simultaneamente parte do S imobilizado sendo convertido em formas inorgânicas disponíveis para as plantas (mineralização).

Os fatores que governam o acontecimento e a velocidade destas transformações são principalmente: a quantidade de S na matéria orgânica, temperatura, umidade, pH do solo, presença de plantas, tempo de cultivo, tipo de manejo e principalmente a microbiota e atividade enzimática do solo (HAVLIN et al., 2005; ERIKSEN; MURPHY; SCHNUG, 1998; SCHOENAU; MALHI, 2008).

Em solos com boa aeração, materiais com relação C:S > 400 podem causar a imobilização temporária do SO_4^{2-} prontamente disponível para as plantas, enquanto que resíduos com relação C:S < 200 promoverão a mineralização do S da matéria orgânica para o solo na forma de SO_4^{2-} . Materiais com relação C:S entre 200 e 400 resultam em

equilíbrio entre a mineralização e a imobilização (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). As fontes de S-orgânico decomponíveis podem vir de resíduos animais e vegetais frescos, biomassa do solo, incluindo biomassa microbiana e metabólitos, além do húmus (SCHOENAU; MALHI, 2008).

A mineralização do S é extremamente baixa em temperaturas abaixo de 10 °C, aumenta com temperaturas entre 20 e 40 °C, e diminui novamente em temperaturas superiores a 40 °C. A umidade ótima para o processo de mineralização é de aproximadamente 60% da capacidade de campo e pH 6-7. A atividade dos microrganismos rizosféricos afeta positivamente a mineralização, quando comparada a solos em plantas.

O conteúdo de S pode cair drasticamente nos solos após o primeiro cultivo, sendo um equilíbrio atingido com o tempo, dependendo das condições de clima, práticas culturais e solo do local (HAVLIN et al., 2005). A relação C:N:S de solos virgens é mais ampla do que as de solos cultivados. A redução desta relação após sucessivos cultivos sugere que o S é menos mineralizável do que o C e o N (TABATABAI, 1984). No entanto, a utilização de técnicas conservacionistas de manejo que evitem as perdas de nutrientes e favoreçam o aumento da matéria orgânica do solo contribuem para o aumento da taxa de mineralização do S nos solos (SCHOENAU; MALHI, 2008).

A quantidade de S na fração de ésteres de sulfato pode chegar até 60% do total de S-orgânico do solo. Esta forma de S pode ser mineralizada pela atividade de sulfatases, como por exemplo, arilsulfatases, alquil sulfatases e arilsulfotransferases, produzidas por uma grande diversidade de microrganismos heterotróficos, principalmente *Pseudomonas* (SCHMALENBERGER; KERTESZ, 2007). Entretanto, trabalhos recentes mostraram que os compostos de S ligados diretamente ao C (ex. aminoácidos contendo S), apesar de serem mais reduzidos, são mineralizados de maneira mais rápida do que os ésteres de sulfato (SOLOMON; LEHMANN; MARTINEZ, 2003; KERTESZ; FELLOWS; SCHMALENBERGER, 2007).

2.1.1.5 O S inorgânico no solo

O S pode ser encontrado na natureza em diferentes estados de oxidação, variando de -2 a +6, onde o sulfeto (HS^-) é a forma mais reduzida e o sulfato (SO_4^{2-}) a mais oxidada.

O S elementar (S^0) é o produto imediato da oxidação do sulfeto de hidrogênio (H_2S), sendo uma forma estável. O monóxido de enxofre (SO) e sua forma hidratada (H_2SO_2) são intermediários instáveis hipotéticos entre o S^0 e o dióxido de enxofre (SO_2). O SO_2 é um gás altamente solúvel em água, originando o ácido sulfuroso (H_2SO_3) e sua forma dissociada sulfito (SO_3^{2-}). A forma mais oxidada do S, apresentando valência +6, é o trióxido de enxofre (SO_3) formado pela junção do SO_2 e um oxigênio, na presença de um catalisador, sendo sua forma hidratada o ácido sulfúrico (H_2SO_4) e sua forma dissociada o íon sulfato (SO_4^{2-}). O tetrionato tem 4 átomos de S, sendo que sua estrutura sugere que 2 átomos tem valência 0 e os demais +4 e +6 respectivamente (SUZUKI, 1999) (Quadro 1).

-2	0	+2	+4	+6
H_2S	S	(SO)	SO_2	SO_3
Sulfeto de Hidrogênio	S elementar	Monóxido de Enxofre	Dióxido de Enxofre	Trióxido de Enxofre
HS^-		H_2SO_2 Ácido sulfoxílico	H_2SO_3 Ácido sulfuroso	H_2SO_4 Ácido sulfúrico
			SO_3^{2-} Sulfito	SO_4^{2-} Sulfato
	S —————		SO_3^{2-}	
		Tiosulfato		
	S —————		SO_3^{2-}	
	S —————			SO_3
		Tetrionato		
2^-S —————	S_n			
Politionato				

Quadro 1 - Estado de oxidação de diversas formas de S inorgânicas. Fonte: Suzuki (1999)

Como já citado anteriormente, a fração inorgânica do S pode representar menos do que 5% do total de S do solo. As principais entradas de S-inorgânico no ciclo do enxofre são provenientes do processo de mineralização do S-orgânico, emissões atmosféricas (chuvas ácidas), pesticidas, e principalmente na forma de fertilizantes minerais. Segundo Schoenau e Malhi (2008) entre 1 e 5% do total do S-orgânico do solo pode ser disponibilizado na forma de SO_4^{2-} pelo processo de mineralização.

As emissões antropogênicas de SO_2 para a atmosfera vêm sendo reduzidas nos últimos 30 anos em muitos países europeus e nos Estados Unidos (LEHMANN et al., 2008). Após a adoção da lei de controle da poluição do ar em 1990, nos Estados Unidos, a quantidade de ácido sulfúrico que retornou na forma de chuva ácida aos estados do leste americano foi reduzida em 50% (MALAKOFF, 2010), e dever ser mais reduzida no futuro.

O principal aporte de S no solo acontece de maneira indireta, principalmente através de fertilizantes nitrogenados, fosfóricos e potássicos. As formas mais comuns de fertilizantes sulfatados são: sulfato de amônio (24% de S), superfosfato simples (12% de S), gesso agrícola (14-18% de S), sulfato de potássio (18% de S) e sulfato de potássio e magnésio (22% de S). A forma mais concentrada de aplicação de S como fertilizante é diretamente na forma de S^0 (100% S), como S^0 ligado a bentonita (90% de S) ou S^0 em suspensão em argila (40 – 60% de S). Alguns fertilizantes também podem ser recobertos por S^0 , como é o caso da uréia revestida com S^0 (10-20% de S).

As principais perdas de S-inorgânico nos solos acontecem pela adsorção do sulfato aos óxidos de Fe e Al e às argilas, lixiviação, erosão, exportação pelas culturas e em menor quantidade pela volatilização. As perdas por volatilização podem ser mais significativas em solos alagados devido à redução microbiológica das formas oxidadas de S à H_2S (ERIKSEN; MURPHY; SCHNUG, 1998).

2.1.2 Oxidação microbiológica do S⁰ no solo

2.1.2.1 O gênero *Thiobacillus*

O primeiro relato da utilização do S⁰ na agricultura aconteceu em 1877, no estado da Carolina do Sul, nos Estados Unidos. Charles F. Panknin sugeriu a incorporação no solo, de uma mistura contendo 95 partes de ossos ou fosfato mineral finamente moído juntamente com 5 partes de S elementar em pó fino, com a finalidade de solubilizar do fósforo a partir do ácido sulfúrico produzido pela oxidação do S⁰. No mesmo ano ele entrou com o pedido de patente da sua descoberta, registrado como “Letters Patent 193,890” (LIPMAN; McLEAN; LINT, 1916). Segundo Lipman e seus colaboradores (1916), Panknin tinha o conhecimento de que o S elementar era oxidado no solo formando ácido sulfúrico, mas ainda não sabia que se tratava de um processo microbiológico. Ele também não sabia que a quantidade indicada (1 parte de S⁰: 20 partes de fosfato) era insuficiente para o resultado desejado.

Lipman por sua vez, já munido de novos conhecimentos de microbiologia, como a descoberta de Winogradsky, em 1887, sobre a capacidade da bactéria *Beggiatoa* em utilizar o H₂S como fonte de energia e fixar CO₂ atmosférico (WINOGRADSKY, 1887) e do isolamento das bactérias oxidantes de S, *Thiobacillus denitrificans* e *Thiobacillus thioparus*, em 1904 por Martinus Beijerinck (BEIJERINCK, 1904), começou a postular suas próprias hipóteses sobre a oxidação microbiana do S⁰ no solo. Lipman e seus colegas (1916) testaram a capacidade de oxidação de amostras de solo esterilizadas e não-esterilizadas tratadas com S⁰, e concluíram que o processo de oxidação do S⁰ era um processo microbiológico, apesar de o microrganismo responsável não ter sido isolado.

Em 1922, Selman Waksman e Jacob Joffe, colegas de Lipman na Estação Experimental Agrícola de Nova Jersey, Estados Unidos, isolaram a bactéria *Thiobacillus thiooxidans* da mistura de solo, S e rocha fosfática, em meio inorgânico, atribuindo a esta bactéria a capacidade de ácido sulfúrico, resultante da oxidação do S⁰. Starkey, em 1924, publicou um trabalho detalhado sobre a fisiologia e os principais fatores que afetavam o processo de oxidação da recém descoberta bactéria. Alguns anos mais

tarde, Starkey (1935) isolou uma nova espécie, *Thiobacillus novellus*, uma bactéria heterotrófica facultativa, capaz de utilizar tiosulfato como fonte de energia. Em 1951, outra importante espécie do gênero *Thiobacillus* foi isolada de lagoas ácidas ricas em ferro, provenientes da drenagem de uma mina de carvão nos Estados Unidos, sendo denominada *Thiobacillus ferrooxidans* (TEMPLE; COLMER, 1951). A nova bactéria descrita era muito parecida com *T. thiooxidans*, apresentava a capacidade de oxidação de Fe e tiosulfato, mas não se desenvolvia em meio com S^0 .

O composto descrito por Panknin e Lipman não se tornou uma prática comum na agricultura, entretanto estimulou o interesse sobre as transformações microbiológicas do S e o estudo sobre a bioquímica das bactérias oxidantes de S no solo (STARKEY, 1966). As primeiras dúvidas sobre a real contribuição de *T. thiooxidans* e *T. ferrooxidans* para os processos naturais de oxidação de formas reduzidas de S nos solos começaram a surgir. Enquanto *T. thioparus*, *T. denitrificans* e *T. novellus* eram comumente encontradas em solos com pH próximo da 7,0, raramente se encontravam *T. thiooxidans* e *T. ferrooxidans* nas mesmas condições, exceto em condições de elevadas concentrações de S^0 ou acidez elevada. Alguns trabalhos já falhavam em isolar essas espécies em solos em condições normais, mesmo após procedimentos de enriquecimento das amostras com S^0 (STARKEY, 1966).

Estudos mais amplos sobre a capacidade de oxidação do S^0 em muitos países apresentaram resultados bastantes variáveis, sendo que *T. thiooxidans* era detectado em dois terços das amostras de solo analisadas na Austrália (VITOLINS; SWABY, 1969) e Nova Zelândia (LEE et al., 1987), mas não era detectado em amostras de solo do Canadá (LAURENCE; GERMIDA, 1991) e Escócia (CHAPMAN, 1990). Vitols e Swaby (1969), testando a capacidade de oxidação do S^0 e tiosulfato *in vitro* de 206 linhagens de bactérias isoladas dos mesmos solos australianos, identificaram, em sua maioria, organismos quimiolitotróficos facultativos ou heterotróficos, em detrimento a *Thiobacillus* quimiolitotróficos obrigatórios.

Com o avanço da deficiência de S no solo em grandes áreas da Austrália e Nova Zelândia e a necessidade de adubação principalmente de pastagens, Swaby (1975) lançou mão do mesmo composto de rochas fosfáticas e S^0 utilizado no passado, mas com a inoculação de *T. Thiooxidans*, na forma de péletes de 2-4 mm, nomeando esse

produto como Biosuper. Vários trabalhos mostraram a eficiência desta preparação, em alguns casos, apresentando resultados iguais ou superiores aos tratamentos utilizando fertilizantes fosfatados solúveis (PARTRIDGE, 1980; RAJAN 1981; ROBBINS; BUSHELL; COMPTON, 1984; BESHARATI; ATASHNAMA; HATAMI, 2007).

No Brasil, a utilização do biofertilizante contendo rocha fosfática, enxofre elementar e *Thiobacillus thiooxidans* vem sendo bastante aplicada pelo grupo do Dr. Newton Stanford, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, gerando várias publicações e recomendações para diversas culturas como a caupí, cana-de-açúcar, videiras e meloeiros (STAMFORD et al., 2003; STAMFORD et al., 2007; STAMFORD et al., 2008; MOURA et al., 2007).

Em 2000, a partir da utilização das técnicas de amplificação e sequenciamento do gene rRNA 16S e análises baseadas na hibridização DNA-DNA foi proposta uma reclassificação das 17 espécies do gênero *Thiobacillus* (KELLY; WOOD, 2000). A nova classificação propôs a criação de três novos gêneros (*Acidithiobacillus*, *Halothiobacillus* e *Thermithiobacillus*), além da reclassificação de outras espécies em gêneros já existentes. As Gammaproteobacteria *T. thiooxidans* e *T. ferrooxidans* passaram a ser denominadas *Acidithiobacillus thiooxidans* e *Acidithiobacillus ferrooxidans* e a Alphaproteobacteria *T. novellus* passou a ser denominada *Starkeya novella* (ROBERTSON; KUENEN, 2006b).

2.1.2.2 Diversidade de organismos oxidantes de formas reduzidas de S no solo

Formas reduzidas de S podem ser oxidadas no solo por microrganismos quimiolitotróficos (capazes de utilizar energia disponível na oxidação de compostos inorgânicos e o CO₂ como fonte de carbono, ex. *Acidithiobacillus thiooxidans*), fotoautotróficos (capazes de fazer fotossíntese anoxigênica na presença de luz e CO₂ como fonte de carbono, ex. bactérias púrpuras e verdes do S) e heterotróficos (utilizam substâncias orgânicas como fonte de energia e carbono, ex. diversas bactérias e fungos), sendo os quimiolitotróficos e heterotróficos predominantes em condições de solos bem drenados (GERMIDA E JANZEN, 1993).

Segundo Ghosh e Roy (2006b), diversas espécies aeróbicas, quimiolitotróficas, e bactérias oxidantes de enxofre anaeróbicas, fotolitotróficas, trabalham em sequência na natureza, a fim de conduzir a porção oxidativa do ciclo do enxofre e disponibilizar sulfato assimilável pelas plantas.

A contribuição de cada grupo na natureza pode ser bastante variável. Segundo Czaban e Kobus (2000), experimentos utilizando uma série de antibióticos em solos tratados com S^0 mostraram que as bactérias foram mais eficientes em oxidar S do que os fungos. Wainwright e Killham (1980) demonstraram a capacidade de *Fusarium solani* em oxidar S^0 *in vitro*, em solo autoclavado e solo não esterilizado, de forma similar a bactérias heterotróficas, mas com eficiência inferior à de *A. Thiooxidans*, bactéria quimiolitotrófica obrigatória.

Outras espécies de fungos que possuem capacidade de oxidar S^0 são: *Aspergillus niger*, *Mucor flavus*, *Trichoderma harzianum* (GRAYSTON; NEVELL; WAINWRIGHT, 1986), *Saccharomyces* e *Debaryomyces* (VITOLINS; SWABY, 1969). Li, Lin e Zhou (2010) identificaram, a partir do sequenciamento da região ITS (Internal-transcribed spacer) entre as subunidades rRNA 18S e 23S, 18 isolados de fungos com capacidade de oxidar S^0 *in vitro*, afiliados aos gêneros: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Bipolaris* e *Pleosporales*.

No domínio Bacteria, os gêneros quimiolitotróficos obrigatórios mais comuns encontrados no solo pertencem predominantemente a Betaproteobacteria (*Thiobacillus*) e Gammaproteobacteria (*Acidithiobacillus*). Alphaproteobacteria são geralmente mixotróficos (*Paracoccus*) (GHOSH; DAM, 2009). Representantes dos filos Actinobacteria (ANANDHAM et al., 2008) e Firmicutes (JIANG et al., 2008) também apresentam capacidade de oxidação do S em solos.

O gênero *Paracoccus*, formado por bactérias Gram-negativas, esféricas, mixotróficas, aeróbicas, com capacidade de redução de nitrato e diferentes habilidades em utilizar compostos reduzidos de S, vem sendo um dos mais estudados atualmente (FRIEDRICH et al., 2001; FRIEDRICH et al., 2005). Apesar de terem sido isoladas principalmente de digestores anaeróbios e lodo ativo, existem muitos relatos do isolamento de representantes deste gênero em amostras de solo e rizosfera de plantas (GHOSH; ROY, 2006b). O sequenciamento do gene rRNA 16S de isolados de solos da

Índia, com capacidade de oxidação de tiosulfato tanto em meio mineral como em meio orgânico mostrou grande similaridade a *P. versattus* e *P. alcaliphilus* (DEB et al., 2004). Isolados de solo rizosférico de plantas leguminosas apresentando similaridade com *P. bengalensis* (GHOSH; MANDAL; ROY, 2006), *P. pantotrophus* e *P. thiocyanatus* (GHOSH; ROY, 2007b) mostraram capacidade de oxidação de diferentes formas de S como: tiosulfato, tetrionato, tiocianato, sulfeto e S elementar.

Trabalhos recentes têm relatado o isolando de novos gêneros de bactérias mixotróficas com capacidade de oxidar formas reduzidas de S no solo, incluindo gêneros nunca antes relacionados com o processo de oxidação do S.

Em 2006, foi publicado o primeiro relato sobre o isolamento de linhagens de *Rhizobium spp* com capacidade de oxidar S^0 em solos calcários dos Emirados Árabes Unidos, juntamente com *Paracoccus versattus* e *P. panthotrophus* (EL-TARABILY et al., 2006). Outra bactéria fixadora de nitrogênio isolada da rizosfera de uma leguminosa herbácea, *Mesorhizobium thiogangeticum* sp, também foi descrita como capaz de oxidar S^0 e tiosulfato (GHOSH; ROY, 2006b).

A rizosfera de leguminosas também foi o local de isolamento de novas linhagens de *Azospirillum* e *Pseudoxanthomonas* (GHOSH; ROY, 2007a). Stubner e colaboradores (1998) isolaram linhagens quimiolitotróficas facultativas de *Ancylobacter aquaticus*, *Xanthobacter sp* e *Bosea thiooxidans* e a linhagem quimiolitotrófica obrigatória *Thiobacillus thioparus* da rizosfera de arroz. Outras espécies isoladas e relacionadas com a oxidação de S no cultivo de arroz apresentaram similaridade com *Mesorhizobium loti*, *Hydrogenophaga sp.*, *Delftia sp*, *Pandoraea sp.*, *Achromobacter sp* (GRAFF; STUBNER, 2003) e *Methylobacterium oryzae* (ANANDHAM et al., 2007).

Anandham e colaboradores (2008) descreveram a presença de cinco novos gêneros de bactérias isoladas de solo com capacidade de crescimento quimiolitotrófico em tiosulfato, mixotrófico e heterotrófico, sendo eles: as Alphaproteobacterias: *Burkholderia* e *Alcaligenes*, a Gammaproteobacteria: *Dyella* e as Actinobacteria: *Microbacterium* e *Leifsonia*. Os autores também descreveram o isolamento de gêneros já conhecidos pela oxidação de S: *Pandoraea* (Betaproteobacteria) e *Halothiobacillus* (Gammaproteobacteria).

Organismos do domínio Archaea capazes de oxidar S são menos conhecidos. O conhecimento está restrito à membros da ordem Sulfolobales, responsáveis pela oxidação de formas reduzidas de enxofre inorgânicas em condições extremas como fontes hidrotermais vulcânicas e fossas hidrotermais marinhas (FRIEDRICH et al., 2005).

Recentemente têm-se atribuído grande importância ao processo de nitrificação no solo por organismos do domínio Archaea, podendo inclusive superar as bactérias na oxidação da amônia (GUBRY-RANGIN; NICOL; PROSSER, 2010; ZHANG et al., 2010). Os recentes estudos como o realizado por BATES e colaboradores (2010) sobre a distribuição das populações de Archaea em diversos solos através de pirosequenciamento deve futuramente abrir novas fronteiras sobre a compreensão da atividade destes organismos nas transformações de elementos essenciais para o crescimento de plantas sob condições não extremas.

2.1.2.3 Mecanismos de Oxidação do S nas bactérias

O tiosulfato é uma importante forma reduzida de S presente nos mais diversos ambientes e utilizado como fonte de elétrons nos sistemas de geração de energia fotossintéticos ou respiratórios de uma grande diversidade de bactérias. Outra forma reduzida de S amplamente utilizada pelas bactérias quimiolitotróficas é o tetrionato, que também pode ser produzido como intermediário na oxidação do tiosulfato (GHOSH; DAM, 2009). Ao longo do tempo, dois processos de oxidação do S elementar, sulfeto e tiosulfato foram propostos, sendo que um deles envolve a formação de tetrionato como intermediário e outro a oxidação do tiosulfato diretamente à sulfato (KELLY et al., 1997).

Várias Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria quimiolitotróficas obrigatórias (ex. *Acidithiobacillus*) utilizam o mecanismo de oxidação com a formação tetrionato como intermediário (S_4I) enquanto que as Alphaproteobacteria facultativas, como por exemplo *Paracoccus*, utilizam o mecanismo denominado “Paracoccus Sulfur Oxidation” ou SOX, governado pelo operon *sox* (KELLY et al., 1997; FRIEDERICH et al., 2001; FRIEDERICH et al., 2005). Um terceiro mecanismo de oxidação de tiosulfato em

bactérias anaeróbicas fotolitotróficas e quimiolitotróficas que depositam enxofre intracelularmente durante o processo também foi descrito, sendo denominado “via ramificada de oxidação do tiosulfato”. Uma recente e extensa revisão sobre o último e os demais mecanismos de oxidação de formas reduzidas de S descritos acima, bem como, as reações bioquímicas e biologia molecular dos processos pode ser vista em Ghosh e Dam (2009).

A via de oxidação SOX (atualmente denominada via Kelly-Friederick) é a mais bem estudada e compreendida, embora muitas etapas ainda sejam obscuras, principalmente em relação à oxidação do S^0 . Neste processo, um complexo multienzimático, governado pelo operon *soxTRS-VW-XYZABCDEFGH* governa a oxidação do tiosulfato, sulfeto, sulfito e S elementar (MUKHOPADHYAYA et al., 2000; BAGCHI; ROY, 2005; LAHIRI et al., 2006; GHOSH; MALLICK; GUPTA, 2009). Os genes *soxXA* codificam ambos citocromos do tipo *c*, *soxYZ* codificam uma proteína de ligação covalente de S e uma proteína quelante de compostos contendo S, respectivamente, *soxB* codifica uma proteína di-manganês que atua como componente da sulfato tiol esterase, e *sox(CD)₂* codifica uma enxofre desidrogenase (GHOSH; DAM, 2009).

De maneira simplificada, o complexo Sox liga covalentemente a molécula de tiosulfato a um resíduo “cysteinyI” na região c-terminal da subunidade SoxY, da proteína SoxYZ, onde dois átomos de S são oxidados à sulfato pela transferência de elétrons para o citocromo *c*. Outras formas de S são introduzidas no sistema na posição referente ao seu estado de oxidação via conjugações enzimáticas ou não-enzimáticas à proteína SoxY (GHOSH; DAM, 2009).

O operon Sox é amplamente distribuído dentro no domínio Bacteria, a distribuição e evolução deste complexo enzimático na natureza vêm sendo avaliada principalmente pela amplificação e filogenia do gene *SoxB* (GHOSH et al., 2001; MEYER; IMHOFF; KUEVER, 2007; ANANDHAM et al., 2008).

A via S_4I , com formação de tetrionato como intermediário da oxidação de tiosulfato, ainda não está bem estabelecida como a via SOX, sendo a localização de algumas proteínas do sistema um motivo de conflito (GHOSH; DAM, 2009). O mecanismo mais recentemente proposto foi descrito em *Tetrathibacter kashmirensis*

(DAM et al., 2007). Nele, a oxidação do tiosulfato à tetrathionato na bactéria é realizada por um complexo de oxidação periplásmico, enquanto a completa oxidação do tetrathionato se dá na membrana. O sulfito é oxidado no citoplasma por uma sulfito desidrogenase, envolvendo um complexo de transferência de elétrons para o oxigênio, composto por uma ubiquinona-citocromo *b* (DAM et al., 2007; GHOSH; DAM, 2009).

2.1.3 Avaliação da oxidação do S^0 no solo

2.1.3.1 Métodos de determinação da oxidação do S^0 no solo

Segundo Wainwright (1984), a maioria dos estudos envolvendo a oxidação do S^0 utiliza a incubação de amostras de solo juntamente com S , em condições de laboratório, durante muitas semanas, e posterior análise dos íons de S ou alteração da população de bactérias oxidantes de S . A avaliação e determinação da taxa de oxidação do S no solo podem ser realizadas de maneira direta, através da quantificação do S^0 remanescente após o período de incubação (WATKINSON; LEE; LAUREN, 1987; WATKINSON; LEE, 1994) ou indireta, a partir da quantificação do sulfato formado como resultado final da oxidação do S^0 (MASSOUMI; CORNFIELD, 1963, JANZEN; BETTANY, 1987). Outros métodos indiretos são a determinação do pH, que tende a diminuir com a formação de ácido sulfúrico (MASSOUMI; CORNFIELD, 1963), respirometria (BALDENSBERGER, 1976) e absorção de CO_2 pelo solo tratado com S^0 (BELLY; BROCK, 1974).

A determinação do S^0 remanescente pode ser realizada a partir da análise por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) do extrato do solo em clorofórmio, utilizando-se uma coluna de fase reversa com gradiente isocrático de metanol e clorofórmio (LAUREN; WATKINSON, 1985, WATKINSON; LEE; LAUREN, 1987). Algumas variações do método de determinação do S^0 por HPLC em hidrocarbonetos, solo, sulfetos metálicos e água, podem ser vistas em Clarck e Lesage (1989), Rethmeier et al., (1997), McGuire e Hamers (2000) e Hurse e Abeydeera (2002). O método de cromatografia gasosa também foi descrito como uma possibilidade de quantificação do S^0 em amostras de solo (RICHARD; VICK; JUNG, 1977). O S^0

dissolvido em acetona também pode ser determinado por turbidimetria após a substituição do solvente por água, precipitando o S^0 na forma coloidal e permitindo a análise em espectrofotômetro a 420 nm (HART, 1961).

Além dos métodos cromatográficos, o S^0 extraído do solo em clorofórmio e digerido com HNO_3 - KNO_3 pode ser determinado por espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado (ZHAO et al., 1996) e espectroscopia de absorção de raios-X na borda K do enxofre (BURTON et al., 2009).

O principal método de determinação do SO_4^{2-} no solo é o método turbidimétrico, onde o sulfato do solo é extraído com uma solução extratora (ex. fosfato monocálcico, acetato de amônio) e precipitado cloreto de bário, deixando a solução turva. A turbidez é proporcional à quantidade de sulfato na amostra e a absorbância é medida por espectrofotometria a 420 nm (MASSOUMI; CORNFIELD, 1963; VITTI, 1989; CANTARELLA; PROCHNOW, 2001). Prochnow, Boaretto e Vitti (1997) descreveram a utilização de resina trocadora de íons para a extração de SO_4^{2-} de amostras de terra, obtendo resultados semelhantes à extração com acetato de amônio. O sulfato do solo pode ainda ser determinado através de cromatografia de troca iônica (OHIRA; TODA, 2006; YANG et al., 2010).

Segundo Watkinson e Blair (1993), a técnica de determinação do S^0 remanescente é mais precisa do que a determinação de SO_4^{2-} . Os autores salientam que durante o período de incubação o S-orgânico do solo pode ser mineralizado e o SO_4^{2-} pode ser imobilizado, comprometendo os resultados das análises. Por sua vez, Janzen e Bettany (1987) comentam que, a partir do início do processo de oxidação, a quantidade inicial de S^0 começa a cair, ficando cada vez menor sob condições que favoreçam o processo de oxidação e mais pronunciada ao longo do tempo. Assim sendo, o declínio diferencial do substrato impede uma determinação acurada do S^0 remanescente, mesmo que sob as mesmas taxas de oxidação. Os autores defendem que o melhor método seria a determinação do sulfato após um período curto de incubação, como, por exemplo, sete dias. Outro problema da técnica de determinação do S^0 remanescente é a utilização de solventes tóxicos como tolueno, clorofórmio e acetona durante o processo de extração do S^0 do solo (BARROW, 1968). Além disso, a extração de S^0 por clorofórmio pode ser incompleta, dependendo dos teores de

umidade do solo ou a temperatura de secagem da amostra (BARROW, 1970). Watkinson e Lauren (1987) descrevem que partículas agregadas de solo podem não ser dispersas em clorofórmio evitando a solubilização do S^0 ocluso e interferindo na precisão da análise.

2.1.3.2 Variáveis que afetam a oxidação do S^0 no solo

Os principais fatores ambientais que influenciam a oxidação do S^0 são: temperatura, umidade e aeração, pH e microbiota do solo. Outros fatores, tais como tamanho da partícula, dispersão no solo e a forma de S^0 aplicada, também afetam sua taxa de oxidação.

De maneira geral, a taxa de oxidação do S^0 é mínima entre temperaturas abaixo de 10 °C e acima de 40 °C (FRENEY, 1967). Segundo Nor e Tabatabai (1977), a oxidação média do S^0 aplicado a um solo, após 57 dias de incubação foi de 8% a 5 °C, 22% a 15 °C e 47% a 30 °C. Solberg e colaboradores (2005) determinaram que a 36 °C, a recuperação de sulfato foi máxima, sendo a relação de aumento da quantidade de SO_4^{2-} por grau de temperatura elevado menor entre 6 e 18 °C do que entre 18 e 36 °C.

A relação entre a oxidação do S^0 e a umidade do solo apresenta um comportamento parabólico, sendo a oxidação mínima quando há pouca disponibilidade de água, aumentando com o aumento da umidade até um ponto máximo e diminuindo novamente quando a umidade ultrapassa o limite ótimo (JANZEN; BETTANY, 1987). A umidade ótima para máxima oxidação de S^0 encontra-se próximo da capacidade de campo do solo, desde que ela permita uma boa aeração do solo (WAINWRIGHT, 1984). Solberg e colaboradores (2005) obtiveram a recuperação de SO_4^{2-} entre 32 e 53,2% e 71,8 e 105,9% dos solos com umidades de 40 e 90% da capacidade de campo, respectivamente. Segundo Janzen e Bettany (1987), o potencial hídrico ótimo vai variar de acordo com o tipo de solo, dependendo da sua textura e do grau de aeração.

A oxidação do S^0 resulta na acidificação do solo pela geração de íons H^+ durante o processo, podendo variar de acordo com a quantidade de S^0 aplicada e a capacidade tampão do solo (YANG et al., 2008). Entretanto vários trabalhos demonstraram um aumento da oxidação do S^0 em solos alcalinos ou em resposta à adição de $CaCO_3$

(FRENEY, 1967; ADAMCZYK-WINIARSKA; KRÓL; KOBUS, 1975; NOR; TABATABAI, 1977; CZABAN; KOBUS, 2000; YANG et al., 2008). Segundo Adamczyk-Winiarska e co-autores (1975), o carbonato de cálcio estaria relacionado com a melhoria das condições para o desenvolvimento dos microrganismos oxidantes de S no solo. Czaban; Kobus (2000) sugeriram que em solos ácidos a oxidação do S⁰ seria conduzida principalmente por fungos.

Em 1941, Vogler e Umbreit provaram por vários métodos a necessidade direta de contato de *Thiobacillus thiooxidans* (atualmente *Acidithiobacillus thiooxidans*) com a partícula de S⁰ para a ocorrência de oxidação. A taxa de oxidação é governada pela área total das partículas de S⁰, que por sua vez, aumentada com a diminuição do tamanho das partículas de S⁰ (FRENEY, 1967). Para que haja uma grande eficiência na utilização do S⁰ como fertilizante é necessária a aplicação de partículas de tamanho entre 80-1000 mesh ou menores (WAINWRIGHT, 1984). A forma da partícula também influencia na área superficial da mesma, sendo a forma esférica a de menor razão massa/área (GERMIDA; JANZEN, 1993).

Vários modelos matemáticos foram descritos para a determinação da taxa de oxidação em função do tamanho e forma das partículas de S⁰ ao longo do tempo, gerando uma grande discussão sobre qual o melhor modelo a ser utilizado (JANZEN; BETTANY, 1987; McCASKILL; BLAIR, 1987; BLAIR et al., 1993; WATKINSON, 1993; WATKINSON; BLAIR, 1993).

Como visto anteriormente, a taxa de oxidação é inversamente proporcional ao tamanho da partícula de S⁰, entretanto, a aplicação de partículas muito pequenas no campo é muito difícil, além do risco de incêndio pelo fato do enxofre ser inflamável. A dispersão inadequada das partículas de S⁰ no solo diminui drasticamente a taxa de oxidação (GERMIDA; JANZEN, 1993). Os mesmos autores comentam que a oxidação foi limitada quando a dispersão do S⁰ no solo foi baixa (< 50 g solo g⁻¹ de S) sendo máxima com a diluição do S⁰ para 1000 g de solo g⁻¹ de S⁰, podendo esse limite crítico variar de acordo com o tipo de solo.

A utilização do S⁰ em bentonita, recobrindo a uréia, misturado a rochas fosfáticas, entre outros, facilita a aplicação, entretanto o aumento na área superficial

diminuirá a taxa de oxidação no solo (BOSWELL; FRIESEN, 1993, BOSWELL; SWANNEY; BRAITHWAITE, 1996).

Por fim, a aplicação prévia de S^0 em uma determinada área apresenta um efeito positivo sobre a taxa de oxidação do S^0 na segunda aplicação. Solberg e colaboradores (2005) encontraram um aumento da recuperação de SO_4^{2-} de 1,88 a 3,13 vezes na segunda aplicação de S^0 comparada à primeira aplicação. Entretanto, segundo Li, Lin e Zhou (2005) a segunda aplicação de S^0 em solos que já apresentaram uma grande taxa de oxidação após a primeira aplicação não alterou significativamente essa taxa, enquanto que em solos com taxa de oxidação inicial baixa houve um grande incremento após a segunda aplicação. Uma explicação dos autores para o fato é a proliferação de microrganismos oxidantes no solo após as sucessivas aplicações de S^0 .

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Amostragem

Amostras de solo do horizonte A, na profundidade de 0 a 20 cm, sob vegetação de mata nativa, das localidades de: Anhembi, SP (ANB, 22°43'46,34"S, 48°1'16,46"W), Brasília, DF (BRA, 15°38'43"S, 47°44'45"W – Embrapa Cerrados) e Rondonópolis, MT (RDP, 16°28,03'S, 54°38,94'W – Fundação MT) foram utilizadas para os ensaios *in vitro* de oxidação do S^0 . As amostras recebidas foram secas em temperatura ambiente, tamisadas em peneira de 2,0 mm de abertura e homogeneizadas. Sub-amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Química, do Departamento de Ciência do Solo, ESALQ/USP, coordenado pelo Prof. Dr. Luis Reynaldo Ferracciú Alleoni, para a realização as análises de levantamento físico-químicas.

2.2.2 Ensaio de incubação dos solos com S^0 em microcosmos

Foram pesados 100 g de solo e acondicionados em frascos de vidro com capacidade para 250 mL. Foram realizados dois tratamentos, sendo eles: Tratamento 1 ($-S^0$): solo natural sem adição de S^0 , e Tratamento 2 ($+S^0$): solo natural adicionado de 10 g de S^0 sublimado peneira 100 mesh (diâmetro da partícula 0,149 mm, Sigma-Aldrich, Spruce, Estados Unidos) kg^{-1} de solo.

O solo nos microcosmos foi homogeneizado e a umidade ajustada para 80% da capacidade máxima de retenção de água. Os frascos foram cobertos com tampas plásticas perfuradas para permitir a oxigenação. As amostras foram incubadas por 0, 6, 22, 38, 54, 67, 86 e 102 dias em sala climatizada com temperatura constante de 28 °C, na ausência de luz. O experimento foi realizado com três repetições por tratamento, inteiramente ao acaso, totalizando 48 microcosmos para cada tipo de solo e 144 no total.

2.2.2.1 Determinação do S⁰ remanescente nos solos

Para a análise do S⁰ remanescente foram pesados 2,5 g de solo de cada microcosmo. O solo foi seco à temperatura ambiente e acondicionado em frasco de 100 mL com tampa hermética. Foram adicionados 20 mL de clorofórmio (grau HPLC, Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, Estados Unidos) e 10 mL de água deionizada como solução extratora e agitou-se a 180 RPM, durante 12 horas. Após a agitação, 2 mL da fase orgânica foram filtrados em filtro de seringa 0,22 µm (Millipore Corporate, Billerica, Estados Unidos) para a retirada de material particulado. Foram injetados 50 µL do extrato filtrado em loop de 10 µL e analisados por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC, ÄKTA, GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Foi utilizada uma coluna de fase reversa PRP1 (Hamilton, Reno, Estados Unidos), absorvância a 254 nm, fase móvel clorofórmio/metanol 50:50 (v/v) e taxa de fluxo 1 mL min⁻¹. A concentração de S⁰ das amostras foi determinada por comparação com curva padrão preparada com S⁰ (99,8% de pureza, Sigma-Aldrich, Spruce, Estados Unidos), nas concentrações de 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25 e 1,5 mg mL⁻¹ seguindo modelo de regressão pela área do pico. A determinação da taxa de oxidação foi realizada de acordo com o modelo proposto por Watkinson (1989) e Watkinson e Blair (1993). Foi realizada a Análise de Variância (ANAVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$) para a comparação das médias dos tratamentos através do programa Sisvar 5.1 (FERREIRA, 2008).

2.2.2.2 Determinação de sulfato (SO₄²⁻) e cálculo da taxa de oxidação do S⁰

A concentração de SO₄²⁻ nas amostras de solos dos experimentos foi determinada pelo método turbidimétrico, seguindo a metodologia proposta por Cantarella e Prochnow (2001). Análise de Variância e teste de Tukey ($p < 0,05$) foram utilizados para a análise estatística dos dados com a ajuda do programa Sisvar 5.1 (FERREIRA, 2008).

A taxa de oxidação do S com base na liberação de SO_4^{-2} foi determinada pelo modelo matemático proposto por Janzen e Bettany (1987) de oxidação constante por unidade de área, considerando as partículas de S^0 como esferas do mesmo tamanho, representado pela equação (1):

$$k = \left(1 - \left(\frac{1 - m}{m_0} \right)^{1/3} \right) \cdot \frac{(g \cdot D_0)}{2 \cdot t} \quad (1)$$

Onde: k = constante de oxidação do S^0 ($\mu\text{g S cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$), m = massa de S oxidado (μg), m_0 = massa inicial do S^0 (μg), g = densidade do S^0 (2,07), (D_0 = diâmetro inicial da partícula de S^0 (cm) e t = período de incubação (dias).

2.2.2.3 Determinação do pH em CaCl_2 (0,01M)

Para a determinação do pH, 10 cm^3 de solo foi transferido para Erlenmeyer de 100 mL e suspenso em 25 mL de solução de CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Após 15 min de contato, a suspensão foi agitada por 10 min a 220 RPM. Após 30 min em repouso foi efetuada a leitura do pH em um pHmetro Hanna mod. HI3221 (Hanna Instruments, Ann Arbor, Michigan, Estados Unidos). Foi realizada ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$) para a comparação das médias dos tratamentos através do programa Sisvar 5.1 (FERREIRA, 2008).

2.2.3 Análise da estrutura das comunidades e diversidade de Bacteria

A estrutura das comunidades e diversidade de Bacteria foram avaliadas a partir de métodos moleculares independentes de cultivo baseados na amplificação de fragmentos do gene rRNA 16S do DNA metagenômico.

2.2.3.1 Extração do DNA metagenômico

O DNA metagenômico de 2 repetições independentes dos tratamentos ANB -S⁰, ANB +S⁰, BRA -S⁰, BRA +S⁰ e RDP -S⁰ e RDP +S⁰, após 0, 54 e 102 dias de incubação em microcosmo, foi extraído de 0,5 g de solo utilizando o *Fast DNA Kit* (Qbiogene, Irvine, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

A integridade do DNA foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x (Tris, Ácido Acético, EDTA), depois de corado com *Sybr® Green* (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos). A aquisição da imagem dos géis foi feita utilizando-se um densitômetro *Storm™* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e analisadas pelo programa *Image Quant TL* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

A concentração do DNA foi determinada por fluorescência utilizando-se um fluorímetro *Q-bit™* (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos) e kit *Quant-iT™ dsDNA BR* (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos)

2.2.3.2 Detecção molecular de *Acidithiobacillus thiooxidans* nos solos

Amostras do DNA metagenômico dos tratamentos -S⁰ e +S⁰, extraído dos três solos após 102 dias de incubação em microcosmos, foram amplificadas para a detecção de *Acidithiobacillus thiooxidans* utilizando-se iniciadores específicos, segundo a metodologia descrita por De Wulf-Durand, Bryant e Sly (1997). Isolados de *A. thiooxidans*, linhagens ELC01 e FG01, fornecidas pelo Dr. Oswaldo Garcia Jr. (Instituto de Química de Araraquara, UNESP) foram utilizadas como controle positivo para as reações (GARCIA JR., 1991).

2.2.3.3 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

A reação de amplificação de fragmentos do rRNA 16S foi realizada a partir do DNA metagenômico extraído de duas repetições, dos tratamentos -S⁰ e +S⁰, após 0, 54 e 102 dias de incubação, dos três solos, utilizando-se os iniciadores BC338fGC (5'

CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGGACTCCTACGGGA GGC 3') e UN518r (5'ATTACCGCGGCTGCTGG 3') (ØVREÅS et al., 1997).

A amplificação ocorreu em 25 µL de solução contento: 2,5 µL de 10x Tampão *Taq* (750 mM Tris-HCl pH 8,8, 200 mM (NH₄)₂SO₄ e 0,1% de Tween 20), 0,75 µL de 25 mM MgCl₂, 2,5 µL de 2 mM dNTP (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos), 0,3 µL de 5 U µL⁻¹ de *Taq* DNA Polimerase recombinante (Fermentas Life Sciences, Burlington, Canadá), 1 µL de cada iniciador (25 pmoles µL⁻¹) e 100 ng de DNA metagenômico, sendo o restante do volume completado com água deionizada esterilizada. As condições de amplificação foram 5 min a 95 °C; 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C e 1 min a 72 °C, e extensão final por 10 min a 72 °C. A concentração dos amplicons foi determinada por fluorescência utilizando-se um fluorímetro *Q-bit*TM (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos) e kit *Quant-iT*TM dsDNA BR (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos). Quantidades iguais de amplicons (300 ng) foram analisadas através de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante-DGGE (MYERS; MANIATIS; LERMAN, 1987; MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993) 8% de acrilamida:bisacrilamida (m/v) contendo um gradiente de 15 a 55% de formamida e uréia (solução 100% contendo 10,5 g de uréia, 5 mL de solução acrilamida:bisacrilamida 40% e 10 mL de formamida). A eletroforese foi feita a 200 V e 60 °C, utilizando-se um sistema *DCode* (BioRad, Hercules, CA, USA), em tampão TAE 1x. O géis foram tratados em soluções de Ácido Acético 10% (15 min), Metanol 50% (15 min) intercaladas por lavagem em água deionizada (3 a 5 minutos) e corados com *Sybr*® *Green* (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos) em sistema automatizado (*Automated Gel Stainer*, GE Healthcare, Uppsala, Suécia) As imagens dos géis foram adquiridas utilizando-se um densitômetro *Storm*Tm (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). O perfil de bandeamento foi analisado pelo programa *Diversity Database* (BioRad, Hercules, CA, USA), gerando-se uma matriz de presença e ausência de bandas com mesmo R_f. A matriz de dados binários foi analisada pelo programa *SYSTAT 8.0* (SYSTAT, Chicago, Estados Unidos), utilizando-se o método de concordância simples ("simple matching"), algoritmo Ward e distância Euclidiana como unidade de medida para a geração dos dendrogramas.

2.2.3.4 Construção das bibliotecas de clones do gene rRNA 16S de Bacteria

Para a construção das bibliotecas de clones do gene rRNA 16S de Bacteria foi realizada uma reação de amplificação a partir do DNA metagenômico extraído de duas repetições dos solos ANB, BRA e RDP, dos tratamentos $-S^0$ e $+S^0$, após 102 dias de incubação, com os seguintes iniciadores: BAC 8F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e BAC 1541R (5'AAGGAGGTGATCCAGC CGCA 3'). A PCR foi feita em 25 μ L de solução contendo: 2,5 μ L de 10x Tampão *Taq* (750 mM Tris-HCl pH 8,8, 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,1% de Tween 20), 0,75 μ L de 25 mM MgCl_2 , 2,5 μ L de 2 mM dNTP (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos), 0,3 μ L de 5 U μL^{-1} *Taq* DNA Polimerase recombinante (Fermentas Life Sciences, Burlington, Canadá), 1 μ L de cada iniciador (10 pmoles μL^{-1}) e 100 ng de DNA metagenômico, sendo o restante do volume completado com água deionizada esterilizada. As condições de amplificação foram: 3 min a 94 °C; 30 ciclos de 45 seg a 94 °C, 30 seg a 56 °C e 2 min a 72 °C, e extensão final por 7 min a 72 °C. Os amplicons resultantes foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x depois de corado com *Sybr® Green* (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos). A aquisição da imagem dos géis foi feita utilizando-se um densitômetro *Storm™* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e analisadas com o programa *Image Quant TL* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Os fragmentos de interesse (aproximadamente 1533 pares de base) foram purificados diretamente da reação de PCR utilizando-se o kit *Invisorb DNA Fragment CleanUp* (Invitek, Berlim, Alemanha). Para a melhor representatividade das bibliotecas e redução de artefatos, antes da purificação dos fragmentos, foram misturadas 3 repetições independentes da PCR, provenientes de duas repetições por tratamento. O mix de amplicons purificados foi clonado no plasmídeo pGEM-T, com o auxílio do kit *pGEM-T Easy Vector System* (Promega, Madison, WI, Estados Unidos). A reação de ligação foi realizada conforme protocolo original do fabricante. Os plasmídeos ligados foram transformados em células de *Escherichia coli*, linhagem DH5- α químico-competentes, por choque térmico, incubando-se as bactérias em contato com os plasmídeos por 20 min em gelo, 2 min a 42 °C e 3 min de gelo. As bactérias contendo o plasmídeo recombinante foram selecionadas em meio de cultura seletivo LB contendo 100 mg L^{-1} de antibiótico

ampicilina e 20 mg L⁻¹ X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactosídeo) e seus plasmídeos foram extraídos através de lise alcalina (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 2001).

2.2.3.5 Sequenciamento das bibliotecas de clones do gene rRNA 16S

A reação de sequenciamento foi composta por 200 ng de DNA plasmidial, 2 μ L de tampão de sequenciamento (200 mM Tris-HCl pH 9, 5 mM MgCl₂), 1 μ L de *DYEnamic™ ET Terminator* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), 2 μ L do iniciador 8F (10 pmoles μ L⁻¹), sendo o volume final completado para 10 μ L com água deionizada esterilizada. As reações foram realizadas em microplacas de 96 cavidades. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial de 95°C por 1 seg, seguido por 25 ciclos de: 95 °C por 20 seg, 55 °C por 15 seg e 60 °C por 1 min, sendo a reação incubada a 4 °C após o término.

Para a precipitação do DNA amplificado, foram adicionados 2 μ L de solução mix (3 M Acetato de Sódio pH 9 + 0,5 M EDTA pH 8) 60 μ L de etanol absoluto 100%, agitando-se vigorosamente. As placas foram centrifugadas a 4 °C, durante 45 min e 1700 g. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 150 μ L de etanol absoluto 70%, uma nova centrifugação a 4 °C foi realizada por 5 min. Posteriormente o etanol foi descartado e a placa incubada em temperatura ambiente, no escuro, por pelo menos 2 horas para total evaporação do álcool.

As placas contendo os clones foram enviadas para o laboratório de biotecnologia do Centro APTA-Citros Sylvio Moreira, em Cordeirópolis, SP, sendo sequenciadas em um sequenciador automático capilar Modelo *ABI PRISM 3700* (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos).

2.2.3.6 Análise das sequências e estimativa dos índices de riqueza e diversidade

As sequências foram processadas pelo programa *PHRED* (EWING; GREEN, 1998) para a remoção de bases com baixa qualidade (parâmetro de qualidade > 20,

menos de um erro em 100 nucleotídeos) e sequências do vetor. Após a validação das sequências, apenas a região entre os nucleotídeos 63 e 518 (455 pb) foi utilizada para as análises posteriores. Sequências quiméricas foram detectadas pelo algoritmo *Chimera-Check*, desenvolvido pelo *Ribosomal Database Project* – RDP (COLE et al., 2009) e excluídas da base de dados. Sequências válidas foram agrupadas em Unidade Taxonômica Operacional (UTO) utilizando-se o programa *DOTUR* (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005), considerando-se similaridade > 97% para definição de espécie. Posteriormente as sequências foram alinhadas pelo programa *Clustal X 2* (THOMPSON et al., 1997), utilizando-se as penalidades para abertura de gaps e extensão de gaps 10 e 0,1, respectivamente. Distâncias evolutivas foram calculadas pelo programa *DNADIST* (<http://cmgm.stanford.edu/phyliip/dnadist.html>), utilizando-se o algoritmo de distância Jukes-Cantor (JUKES; CANTOR, 1969). A riqueza de UTOs foi determinada pelos estimadores não-paramétricos ACE e Chao1 e a diversidade pelos índices de Shannon e Recíproco de Simpson, além da cobertura de amostragem, pelo programa *SPADE* (CHAO; SHEN, 2003; CHAO; SHEN, 2003-2008). Para a classificação taxonômica das sequências, utilizou-se a ferramenta *Classifier*, disponibilizado pelo RDP (WANG et al., 2007), com nível de confiança de 95%. As sequências foram comparadas com o banco de dados de nucleotídeos (NT/NR) do *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (ALTSCHUL et al., 1990) usando-se a ferramenta *megablast* com algoritmo padrão, sendo o acesso de menor *E-value* (*Expectation Value* – número de diferentes alinhamentos com a mesma pontuação ou maior, que poderia ser encontrado em uma busca no banco de dados ao acaso) utilizado posteriormente nas análises filogenéticas como referência. Árvores filogenéticas foram construídas pelo método de Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987), usando-se a distância evolutiva calculada pelo algoritmo Kimura-2 (KIMURA, 1980) e teste de *bootstrap* com 1000 repetições (FELSENSTEIN, 1985), através do programa *MEGA 4.0* (TAMURA et al., 2007). Comparações múltiplas entre as bibliotecas de clones do gene rRNA 16S foram realizadas utilizando-se o programa *S-Libshuff* (SCHLOSS; LARGET; HANDELSMAN, 2004) e o teste de Monte Carlo com 10000 permutações.

2.2.4 Análise da diversidade de Archaea

A diversidade das comunidades de Archaea também foi avaliada a partir de métodos moleculares independentes de cultivo baseados na amplificação metagenômica de fragmentos do gene rRNA 16S.

2.2.4.1 Construção das bibliotecas de clones do gene rRNA 16S

O DNA metagenômico das mesmas amostras utilizadas na análise da diversidade de Bacteria, descrita no item 2.2.3.1, serviu como molde para a amplificação dos fragmentos do gene rRNA 16S de Archaea por PCR.

Os fragmentos foram amplificados por *nested* PCR com a utilização dos iniciadores degenerados ARCH 21F (5' TTCYGGTTGATCCYGCCRGA 3') e ARCH 958R (5' YCCGGCGTTGANTCCAATT 3') e ARCH 21F e ARCH 519R (TTACCGCGGCKGCTG). O tamanho esperado para os fragmentos amplificados foi de 937 pb e 498 pb, respectivamente.

Ambas as reações de amplificação foram realizadas em 25 μ L de solução contendo: 2,5 μ L de 10x Tampão *Taq* (750 mM Tris-HCl pH 8,8, 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,1% de Tween 20), 0,75 μ L de 25 mM MgCl_2 , 2,5 μ L de 2 mM dNTP (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos), 0,3 μ L de 5 U μL^{-1} *Taq* DNA Polimerase recombinante (Fermentas Life Sciences, Burlington, Canadá), 1 μ L de cada iniciador específico (10 pmoles μL^{-1}) e 100 ng de DNA metagenômico, sendo o restante do volume completado com água deionizada esterilizada. Cerca de 100 ng do DNA metagenômico foi utilizado como molde na primeira amplificação enquanto que 1 μ L de uma diluição 1:10 do produto amplificado na primeira PCR foi utilizado como molde para a segunda reação. As condições de amplificação foram compostas de uma desnaturação inicial de 5 min a 95 °C seguida por 30 ciclos de 30 seg a 95 °C para desnaturação, 30 seg a 53 °C para o anelamento dos oligonucleotídeos e 1 min a 72 °C para a extensão dos fragmentos, uma extensão final de 7 min a 72 °C foi acrescida ao final dos ciclos. Os amplicons resultantes da segunda amplificação (*nested* PCR) foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x, a aquisição da

imagem dos géis foi feita utilizando-se um densitômetro *StormTm* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e analisadas com o programa *Image Quant TL* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Os fragmentos de interesse foram purificados utilizando-se o *Kit Invisorb DNA Fragment CleanUp* (Invitex, Berlim, Alemanha). O processo de clonagem e extração dos plasmídeos foi o mesmo descrito no item 2.2.3.4.

As bibliotecas de clones foram sequenciadas de acordo como descrito no item 2.2.3.5, utilizando-se o iniciador M13F (5' GTAAAACGACGGCCAG 3'). O iniciador M13 foi utilizado por ser complementar a sequência do plasmídeo, evitando o uso dos oligonucleotídeos degenerados na reação de sequenciamento.

As análises de bioinformática e estimativa dos índices de riqueza e diversidade também foram realizadas como descrito no item 2.2.3.6, sendo que neste caso as sequências válidas utilizadas apresentaram em torno de 429 pb entre as posições 21 e 519 do rRNA 16S.

2.2.5 Isolamento e cultivo de bactérias oxidantes de S

A finalidade desta etapa do trabalho foi realizar o isolamento e cultivo de bactérias capazes de utilizar formas reduzidas de S como fonte de energia nos solos amostrados tratados com S⁰ após 120 dias (ANB +S⁰, BRA +S⁰, RDP +S⁰) e avaliar a diversidade destes organismos após o sequenciamento parcial do gene rRNA 16S.

2.2.5.1 Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

Para o ensaio de contagem de UFC, 10 g do solo foram pesados e adicionados a 90 mL de solução salina (0,85% NaCl) em Erlenmeyer de 250 mL. Os frascos foram agitados a 180 revoluções por minuto durante 30 minutos. Uma diluição serial foi realizada a partir da transferência de 1 mL da suspensão de solo para tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina. Foi distribuído 1 mL das diluições 10⁻² e 10⁻³ em placas de Petri contendo o meio de cultura específico. As placas foram incubadas a 28^o C durante 30 dias e o total de UFC foi contado. As colônias de bactérias com maior taxa

de crescimento foram replicadas em novas placas contendo meio de cultura fresco, incubadas novamente, liofilizadas e preservadas em freezer a -80°C.

Foram utilizados quatro meios de cultura seletivos contendo apenas formas reduzidas de enxofre como fonte de energia e elétrons, na ausência de fonte de carbono, sendo eles:

- 1- Meio Mineral MS + Tiosulfato de Sódio (pH 7,5, MUKHOPADHYAYA, 2000);
- 2- Meio Colmer + Tiosulfato de Sódio (pH 4,8, COLMER; TEMPLE; KINCKLE, 1950);
- 3- Meio Mineral MS +S⁰ (pH 7,5, adaptado de MUKHOPADHYAYA, 2000);
- 4- Meio Dupla Camada +Solução de Polissulfeto (WIERINGA, 1966).

Os meios de cultura MS + Tiosulfato e MS +S⁰ foram acrescidos do indicador de pH Vermelho Fenol (Sigma-Aldrich, Spruce, Estados Unidos). Os isolados foram testados posteriormente em meio Ágar-Nutriente (BD Difco, Franklin Lakes, Estados Unidos) para avaliação da capacidade de crescimento heterotrófico.

2.2.5.2 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento do gene rRNA 16S dos isolados

Colônias que apresentaram rápida produção de biomassa e/ou possível oxidação do S pela acidificação do meio de cultura, indicada pela mudança de cor, foram selecionadas para o sequenciamento parcial do gene rRNA 16S e filogenia.

O DNA genômico dos isolados selecionados foi extraído com a ajuda do *Genomic DNA Isolation Kit* (Norgen Biotek, Ontario, Canadá), seguindo as recomendações do fabricante e amplificados com os seguintes iniciadores: BAC 8F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e BAC 1541R (5'AAGGAGGTGATCCAGC CGCA 3'). A PCR foi feita em 25 µL de solução contendo: 2,5 µL de 10x Tampão *Taq* (750mM Tris-HCl pH 8,8, 200mM (NH₄)₂SO₄ e 0,1% de Tween 20), 0,75 µL de 25 mM MgCl₂, 2,5 µL de 2 mM dNTP (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos), 0,3 µL de 5 U/µL *Taq*

DNA Polimerase recombinante (Fermentas Life Sciences, Burlington, Canadá), 1 µL de cada iniciador (10 pmoles/µL) e 100 ng de DNA genômico, sendo o restante do volume completado com água deionizada esterilizada. As condições de amplificação foram: 3 min a 94°C; 30 ciclos de 45 seg a 94°C, 30 seg a 56°C e 2 min a 72°C, e extensão final por 7 min a 72°C. Os amplicons resultantes foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x, a aquisição da imagem dos géis foi feita utilizando-se um densitômetro *StormTm* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e analisadas com o programa *Image Quant TL* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). O fragmento de aproximadamente 1533 pares de bases foi purificado utilizando-se o *Kit Invisorb DNA Fragment CleanUp* (Invitek, Berlim, Alemanha) e utilizado diretamente na reação de sequenciamento. A reação de sequenciamento foi realizada como descrito no item 2.1.3.5, exceto pela utilização de 200 ng do fragmento de DNA purificado como molde. Foi utilizado o Iniciador BAC 8F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') para o sequenciamento da fita sense e o iniciador BAC704R (5' GTAGCGGTGAAATGCGTAGA 3') para amplificação da fita anti-senso, em reações independentes. As sequências foram processadas pelo programa *PHRED* (EWING; GREEN, 1998) para a remoção de bases com baixa qualidade (parâmetro de qualidade > 20, menos de um erro em 100 nucleotídeos). As sequências válidas processadas apresentaram em torno de 455 pb, compreendendo a região entre as posições 63 e 518 do gene rRNA foram comparadas com o banco de dados de nucleotídeos (NT/NR) do *National Center for Biotechnology Information* (ALTSCHUL et al., 1990) usando-se a ferramenta megablast com algoritmo padrão (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O acesso apresentou o maior *Total Score* (soma da pontuação do alinhamento subtraída das penalidades por substituições e abertura de *gaps*) e menor *E-value* foi utilizado para a definição da provável classificação taxonômica dos isolados.

2.2.6 Encapsulamento de bactérias oxidantes de S⁰ e ensaios de inoculação

2.2.6.1 Ensaio piloto de encapsulamento de bactérias oxidantes de S⁰

Este ensaio teve a finalidade de adaptar e testar a metodologia de encapsulamento de bactérias em matriz de alginato para as bactérias oxidantes de S⁰ isoladas, e avaliar seu potencial em oxidar S⁰, através da determinação de SO₄²⁻ após um período de incubação em areia lavada autoclavada.

As micro-esferas foram preparadas a partir da diluição do alginato no meio de cultura específico acrescido de S⁰ para a formação de um gel e gotejamento em solução CaCl₂. As esferas frescas apresentaram tamanho em torno de 3 mm. Os isolados ANB9 e RDP5 foram cultivados em meio de cultura MS + S⁰ (MUKOPHADYAYA et al., 2000) e adicionados ao gel antes do gotejamento. O isolado FG01 de *Acidithiobacillus thiooxidans* (GARCIA, JR, 2001) foi cultivado em meio 9K (SILVERMAN; LUNDGREN, 1959) e também foi encapsulado e utilizado como controle positivo. As micro-esferas foram incubadas durante 7 e 14 dias, em microcosmos contendo 100 g de areia lavada e autoclavada, em 4 repetições, totalizando 48 unidades.

Foram realizados os seguintes tratamentos:

T1 - Areia lavada sem adição de esferas

T2 - Esfera meio MS +S⁰

T3 - Esfera meio MS +S⁰ + ANB9

T4 - Esfera meio MS +S⁰ + RDP5

T5 - Esfera meio 9K +S⁰

T6 - Esfera meio 9K +S⁰ + *A. thiooxidans*

As determinações de sulfato e pH foram realizadas como descrito nos itens 2.3.2.2 e 2.3.2.4, e a taxa de oxidação do S determinada pelo modelo de Janzen e Bettany (1987).

2.2.6.2 Inoculação de micro-esferas contendo bactérias oxidantes de S^0 em solo

As micro-esferas utilizadas neste experimento foram preparadas como descrito no item 2.2.6.1. Apatita de Araxá (35% P_2O_5) foi adicionada a cinco tratamentos com a finalidade de avaliar a solubilização de fosfato. As micro-esferas foram incubadas durante 0, 6, 22, 38 e 54 dias, em microcosmos contendo 50 g dos solos ANB e BRA, em três repetições, totalizando 300 unidades.

Os tratamentos realizados foram:

- T1 - Esfera meio 9K + 10 g kg^{-1} de solo de S^0
- T2 - Esfera meio 9K + 10 g kg^{-1} de solo de S^0 + *A. thiooxidans*
- T3 - Esfera meio 9K + 5 g kg^{-1} de solo de S^0 + 50 g kg^{-1} de solo de Apatita de Araxá
- T4 - Esfera meio 9K + 5 g kg^{-1} de solo de S^0 + 50 g kg^{-1} de solo de Apatita de Araxá + *A. thiooxidans*
- T5 - Esfera meio MS + 10 g kg^{-1} de solo de S^0
- T6 - Esfera meio MS + 10 g kg^{-1} de solo de S^0 + Isolado ANB9
- T7 - Esfera meio MS + 10 g kg^{-1} de solo de S^0 + isolado RDP5
- T8 - Esfera meio MS + 5 g kg^{-1} de solo de S^0 + 50 g kg^{-1} de solo de Apatita de Araxá
- T9 - Esfera meio MS + 5 g kg^{-1} de solo de S^0 + 50 g kg^{-1} de solo de Apatita de Araxá + isolado ANB9
- T10 - Esfera meio MS + 5 g kg^{-1} de solo de S^0 + 50 g kg^{-1} de solo de Apatita de Araxá + isolado RDP5

As determinações de sulfato e pH também foram realizadas como descrito nos itens 2.3.2.2 e 2.3.2.4, e a taxa de oxidação do S determinada pelo modelo de Janzen e Bettany (1987).

A determinação dos teores de Fósforo foi realizada através do método de resina trocadora de íons, pelo Laboratório de Química, do Departamento de Ciência do Solo, ESALQ/USP.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Caracterização físico-química dos solos

Os solos provenientes de Brasília, DF (BRA) e Rondonópolis, SP (RDP) foram recomendados para os experimentos por apresentarem um histórico positivo de resposta à adição de S^0 , previamente determinado em experimentos realizados pelo Dr. Luís Ignácio Prochnow (comunicação pessoal). A amostra de solo BRA apresentou o predomínio da fração argila (626 g kg^{-1}) em sua constituição física, enquanto que a amostra RDP apresentou o predomínio da fração areia (850 g kg^{-1}), especificamente areia fina (540 g kg^{-1}) (Tabela 1).

Com a finalidade de avaliar a oxidação do S^0 sob mais uma condição de textura, foi escolhido um solo do município de Anhembi, SP (ANB), cuja principal característica é a quantidade de areia grossa (630 g kg^{-1}) em sua fração total de areia (880 g kg^{-1}). Os demais atributos físicos dos solos amostrados podem ser observados na Tabela 1.

As três amostras foram coletadas na profundidade de 0 a 20 cm, em áreas não cultivadas, recobertas por mata nativa e que nunca haviam recebido aplicação de S^0 . A intenção da coleta sob estas condições foi a de estudar o impacto da aplicação de S^0 sobre a comunidade bacteriana nativa do solo.

Em relação aos atributos químicos, no geral, os três solos apresentaram baixa soma de bases, alta saturação por alumínio e pH abaixo de 4,0. A quantidade total de matéria orgânica nos solos ANB e RDP foi próxima de 20 g dm^{-3} e no solo BRA 45 g dm^{-3} (Tabela 2). Quanto à concentração de micronutrientes, o solo ANB apresentou maiores teores de ferro, manganês e boro, em relação aos demais solos (Tabela 3).

Tabela 1 - Atributos físicos das amostras de solo coletadas na profundidade de 0 e 20 cm, nos municípios de Anhembi, SP (ANB), Brasília, DF (BRA) e Rondonópolis, MT (RDP)

Amostra	Argila <0,002mm	Silte 0,053-0,002mm	Areia Total g/kg	Areia Grossa 2,00-0,210mm	Areia Fina 0,210-0,053mm
ANB	109	11	880	630	250
BRA	626	204	170	100	70
RDP	117	33	850	310	540

Tabela 2 - Atributos químicos e de avaliação da fertilidade das amostras de solo coletadas na profundidade de 0 e 20 cm, nos municípios de Anhembi, SP (ANB), Brasília, DF (BRA) e Rondonópolis, MT (RDP)

Amostra	pH CaCl ₂	M.O	P resina	K	Ca	Mg	H+Al	Al	Soma Bases SB	CTC	Sat. Bases V	Al Sat. m	S -SO ₄ ⁻² mg dm ⁻³
		g dm ⁻³	mg dm ⁻³						mmol _c dm ⁻³		%	%	
ANB	3,5	21	5	0,5	6	3	52	7	10	62	15	42	5
BRA	4,0	45	3	0,3	2	1	72	5	3	75	4	60	1
RDP	3,7	17	5	0,5	2	2	38	6	5	43	11	57	1

M.O, Matéria orgânica do solo

Tabela 3 - Concentração de micronutrientes (mg dm^{-3}) das amostras de solo coletadas na profundidade de 0 e 20 cm, nos municípios de Anhembi, SP (ANB), Brasília, DF (BRA) e Rondonópolis, MT (RDP)

Amostra	Cu	Fe	Zn	Mn	B
	DTPA				(água quente)
ANB	0,4	272	0,9	14,0	0,48
BRA	0,1	48	0,3	0,8	0,23
RDP	0,1	44	0,9	8,0	0,21

2.3.2 Ensaio de incubação dos solos com S^0 em microcosmos

2.3.2.1 Determinação do S^0 remanescente nos solos

Não foi detectada, pela técnica de HPLC, a presença de S^0 nos solos que não receberam enxofre ($-S^0$) em nenhum dos três locais amostrados. O limite mínimo de detecção da técnica, sob as condições e tipo de coluna cromatográfica utilizada, é de 10 ng de S^0 , restando a possibilidade de presença de S^0 nativo nos solos naturais abaixo dessa concentração (LAUREN; WATKINSON, 1985).

A quantidade de S^0 remanescente após o período de incubação de 0, 6, 22, 38, 54, 67, 86 e 102 dias, nos solos ANB, BRA e RDP que receberam 10 g S^0 kg⁻¹ de solo foi determinada por HPLC do extrato em clorofórmio e comparação com a curva padrão de S (Figura 1).

Os dois solos com textura arenosa (ANB e BRA) apresentaram quantidade de S^0 remanescente abaixo da quantidade inicial aplicada, após 22 dias de incubação. A menor quantidade de S^0 remanescente foi detectada na amostra ANB após 54 dias de incubação (8,3 g S^0 kg⁻¹), indicando uma possível oxidação de 12% do S^0 inicial. No solo RDP, a menor quantidade de S^0 remanescente também foi observada após 54 dias de incubação (8,4 g S^0 kg⁻¹). Nos dois solos foi observada uma flutuação nas quantidades de S^0 remanescente ao longo dos períodos de incubação, não possibilitando a visualização de uma tendência clara do processo de oxidação através desta técnica.

No solo de textura argilosa (BRA), na maior parte dos períodos de incubação, a quantidade de S^0 remanescente não diferiu da quantidade aplicada inicialmente.

Figura 1 - Quantidade de S⁰ remanescente no solo (g S⁰ kg⁻¹) determinada por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC), nas amostras de solo de Anhembi, Rondonópolis e Brasília, incubadas durante 0, 6, 22, 38, 54, 67, 86 e 102 dias em condições de microcosmo, com dose inicial (0 dias) de 10 g S⁰ kg⁻¹ de solo. Os valores são referentes à média de três repetições $\pm$ desvio padrão da média

As variações na quantidade de S^0 remanescente nas amostras podem ser decorrentes da dificuldade de homogeneização da dose S^0 no solo no microcosmo para a sub-amostragem (10 g) utilizada para a extração com clorofórmio, sendo agravada na amostra com quantidade maior de argila.

Apesar da utilização de doses acima de 10 g de $S^0 \text{ kg}^{-1}$ solo em alguns trabalhos (HOROWITZ, 2003; YANG et al., 2010), esta quantidade pode ter dificultado a mistura e homogeneização das partículas de S^0 . Durante a elaboração deste experimento, optou-se pela utilização de partículas pequenas e uniformes de S^0 (100 mesh) para permitir a máxima oxidação (WAINWRIGHT, 1984) e melhor homogeneização no solo, uma vez que o S^0 é insolúvel em água.

Em experimentos visando a determinação da quantidade de S^0 em amostras de solo em condições de campo, foi observado que a precisão das sub-amostras foi muito menor do que a normalmente encontrada em outros tipos de análise de solo, evidenciando a dificuldade da homogeneização das partículas de S^0 em quantidades maiores de solo (BARROW, 1968; BARROW, 1970). Segundo os autores essa dificuldade deve variar de acordo com o tipo de solo amostrado.

2.3.2.2 Concentração de SO_4^{2-} nos solos

Diferentemente dos resultados da determinação do S^0 remanescente, a quantificação do sulfato evidenciou claramente a ocorrência de oxidação do S^0 aplicado nas amostras de solo ao longo do período de incubação.

Após 102 dias de incubação com 10 g de $S^0 \text{ kg}^{-1}$ solo, os valores médios de SO_4^{2-} determinadas nas amostras de solo de ANB, BRA e RDP foram 948, 243 e 733 mg de $SO_4^{2-} \text{ dm}^{-3}$ solo, respectivamente (Figuras 2, 3 e 4).

Foi observado um aumento linear nas concentrações de SO_4^{2-} após 22 e 6 dias de incubação nas amostras ANB + S^0 e RDP + S^0 , respectivamente, atingindo quantidade máxima após 102 dias de incubação. No tratamento BRA + S^0 , houve um grande incremento em SO_4^{2-} nos primeiros 22 dias de incubação, seguido de uma estabilização durante o restante do experimento.

Nos tratamentos $-S^0$, a quantidade de SO_4^{2-} permaneceu constante ao longo do período de incubação dos microcosmos.

Os resultados da concentração de SO_4^{2-} determinados neste experimento foram muito parecidos com os resultados obtidos por Horowitz (2003) em sua tese de doutorado (publicados em HOROWITZ; MEURER, 2006) durante o estudo da oxidação do S^0 em amostras de um argissolo (100g de argila kg^{-1} solo) coletada em Pindorama, SP e de um latossolo (470g de argila kg^{-1} solo) coletada em Planaltina, DF. Os autores determinaram a quantidade máxima de 563 e 207 mg de SO_4^{2-} dm^{-3} no argissolo e no latossolo, respectivamente, após 70 dias de incubação. Os autores ainda observaram um aumento significativo na quantidade de SO_4^{2-} a partir de 22 dias de incubação, seguindo um aumento linear até 54 dias de incubação no argissolo e 70 dias no latossolo.

Yang e colaboradores (2010) determinaram a quantidade de 3360 mg de SO_4^{2-} kg^{-1} solo, após 84 dias de incubação com 15 g de S^0 kg^{-1} de um cambissolo (47% de areia e 46,7% de silte) coletado em Braunschweig, na Alemanha.

Figura 2 - Concentração de SO₄⁻² (mg dm⁻³) no solo de Anhembi não tratado (-S⁰) e tratado com 10 g de S⁰ kg⁻¹ (+S⁰) após incubação de 0, 6, 22, 38, 54, 67, 86 e 102 dias em condições de microcosmo. Os valores são referentes à média de três repetições $\pm$ desvio padrão da média. Médias seguidas da mesma letra não diferiram entre si, dentro do mesmo período de incubação, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). C.V. (%) = 43,88

Figura 3 - Concentração de SO₄⁻² (mg dm⁻³) no solo de Brasília não tratado (-S⁰) e tratado com 10 g de S⁰ kg⁻¹ (+S⁰) após a incubação de 0, 6, 22, 38, 54, 67, 86 e 102 dias em condições de microcosmo. Os valores são referentes à média de três repetições $\pm$ desvio padrão da média. Médias seguidas da mesma letra não diferiram entre si, dentro do mesmo período de incubação, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). C.V. (%) = 44,67

Figura 4 - Concentração de SO_4^{2-} (mg dm^{-3}) no solo de Rondonópolis não tratado ($-\text{S}^0$) e tratado com $10 \text{ g de } \text{S}^0 \text{ kg}^{-1}$ ($+\text{S}^0$) após a incubação de 0, 6, 22, 38, 54, 67, 86 e 102 dias em condições de microcosmo. Os valores são referentes à média de três repetições $\pm$ desvio padrão da média. Médias seguidas da mesma letra não diferiram entre si, dentro do mesmo período de incubação, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). C.V. (%) = 45,72

2.3.2.3 Taxa de oxidação do S⁰ nos solos

Devido à inconsistência dos resultados obtidos pela análise do S⁰ remanescente, o cálculo da taxa de oxidação foi feito pelo modelo proposto por Janzen e Bettany (1987), com base na quantidade de SO₄²⁻ recuperada, mesmo correndo-se o risco de pequenas interferências dos processos de mineralização e imobilização sobre os resultados.

A variação da taxa de oxidação ($\mu\text{g S cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$) foi diferente entre os três solos até os 38 dias de incubação (Figura 5). No tratamento ANB +S⁰ a taxa de oxidação calculada foi praticamente 0 até 6 dias de incubação, atingindo 2,2 $\mu\text{g S cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ após 38 dias de incubação e máxima aos 102 dias de incubação (3,2 $\mu\text{g S cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$). Na amostra RDP +S⁰, o S⁰ foi oxidado praticamente a uma taxa constante ao longo do período de incubação, aproximadamente 2,7 $\mu\text{g S cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$.

A amostra BRA +S⁰ apresentou um comportamento de oxidação inverso ao observado na amostra de Anhembi, oxidando S⁰ a uma taxa bastante elevada aos 6 dias de incubação (5,9 $\mu\text{g S cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$), decaindo aos 38 dias e estabilizando ao longo de 102 dias (1,3 $\mu\text{g S cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$).

O percentual máximo do S⁰ oxidado ao final de 102 dias de incubação foi de 6,5% e 5,7% nos tratamentos ANB e RDP +S⁰ e 2,6% no tratamento BRA +S⁰ (Figura 6).

Figura 5 - Taxa de oxidação do S^0 ($\mu\text{g S cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$) calculada com base na média da concentração de SO_4^{2-} (JANZEN; BETTANY, 1987) nos microcosmos contendo solo de Anhembi, Brasília e Rondonópolis após a incubação de 0, 6, 22, 38, 54, 67, 86 e 102 com $10 \text{ g de } S^0 \text{ kg}^{-1}$

Figura 6 - Percentual médio de S^0 oxidado nos microcosmos contendo solo de Anhembi, Brasília e Rondonópolis após a incubação de 0, 6, 22, 38, 54, 67, 86 e 102 com 10 g de $S^0 \text{ kg}^{-1}$ ($+S^0$)

Watkinson (1989) calculou pelo seu modelo matemático a taxa de oxidação do S^0 em solos sob pastagem na Nova Zelândia após 70 dias de incubação dos dados obtidos por Lee et al., (1987), encontrando uma variação entre 48 e 76 $\mu\text{g } S^0 \text{ cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$. Valores semelhantes foram relatados em solos australianos, com taxas de oxidação do S^0 em torno de 54 $\mu\text{g } S \text{ cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ (BLAIR, 1987).

No único estudo de avaliação da taxa de oxidação do S^0 através da determinação do S^0 remanescente no solo por HPLC em solos brasileiros, Horowitz (2003) determinou valores variando entre 14 e 65,7 $\mu\text{g } S \text{ cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ no latossolo coletado em Planaltina, e entre 4,6 e 27,7 $\mu\text{g } S \text{ cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ no argissolo coletado em Pindorama. Horowitz (2003) também determinou a taxa de oxidação de S^0 em 42 amostras de solos de vários estados brasileiros, obtendo valores entre 1,95 e 65,7 $\mu\text{g } S \text{ cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$). Todos os trabalhos citados utilizaram o método direto de avaliação da taxa de oxidação, determinada pela quantificação do S^0 remanescente e modelo matemático considerando as partículas de S^0 de tamanho variável e com distribuição de massa uniforme (WATKINSON, 1989).

Por outro lado, as taxas de oxidação determinadas em 40 solos do Canadá variaram entre 2,3 e 8,0 $\mu\text{g } S \text{ cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$, sendo a maioria delas entre 3 e 6 $\mu\text{g } S \text{ cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$. Entretanto, a metodologia empregada no cálculo da taxa de oxidação se baseou na quantificação de sulfato após seis dias de incubação. Foi utilizado no cálculo dessas taxas o modelo de oxidação constante por unidade de área, considerando as partículas de S^0 como esferas do mesmo tamanho (JANZEN; BETTANY, 1987).

Outros experimentos utilizando a quantidade de SO_4^{2-} e o modelo matemático de Janzen e Bettany (1987) para o cálculo da taxa de oxidação foram descritos por Li e colaboradores (2005) e Yang et al., (2010). Li e colaboradores (2005) determinaram taxas de oxidação do S^0 variando entre 0,3 e 25,6 $\mu\text{g } S \text{ cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$, em 20 solos agrícolas chineses, sendo que a maioria deles apresentaram taxas entre 2,0 e 10 $\mu\text{g } S \text{ cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$. A taxa de oxidação média foi em torno de 6,2 $\mu\text{g } S \text{ cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$.

Após 84 dias de incubação de um cambissolo da Alemanha a 30 °C, 15 g de S^0 kg⁻¹ solo, Yang e colegas determinaram que a maior taxa de oxidação do S^0 aconteceu durante os primeiros 28 dias (12,8 $\mu\text{g S cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$). Os mesmos autores determinaram que 22,4% do S^0 aplicado foi oxidado após 84 dias de incubação.

Além da metodologia diferente de determinação e cálculo da taxa de oxidação, a oxidação do S^0 nos solos do Canadá foi atribuída principalmente por organismos heterotróficos (JANZEN; BETTANY, 1989; GERMIDA; JANZEN, 1993), enquanto que os valores mais elevados na taxa de oxidação nos solos da Austrália e Nova Zelândia seria devido à presença de *Acidithiobacillus thiooxidans* (LEE et al., 1987).

Características do solo, como umidade e pH, teor de argila e matéria orgânica, além do tamanho da partícula do S^0 aplicada também podem influenciar indiretamente a taxa de oxidação do S^0 (WAINWRIGHT, 1984; JANZEN; BETTANY, 1987; GERMIDA; JANZEN, 1993).

Janzen e Bettany (1987) encontraram uma correlação positiva entre a taxa de oxidação e a porosidade do solo, explicada pela dependência de oxigênio para o processo de oxidação. Por este motivo, o conteúdo de areia no solo influenciou positivamente a taxa de oxidação, enquanto que a quantidade de argila influenciou negativamente. Solos com alto teor de argila (>75%) apresentaram taxa de oxidação do S^0 reduzida em função da restrita difusão do oxigênio. Horowitz e Meurer (2006) também concluíram que a oxidação do S^0 à SO_4^{2-} é inversamente relacionada com o teor de argila do solo. Este fato pode explicar as maiores taxas de oxidação observadas nos solos de Anhembi e Rondonópolis (maior conteúdo de areia) e as menores taxas de oxidação observadas do solo de Brasília (maior teor de argila).

2.3.2.4 Determinação do pH do solo em CaCl_2

A média dos valores iniciais de pH em CaCl_2 medido nos tratamentos sem a adição de S^0 foi 3,6 para os solos de Anhembi e Rondonópolis e 4,0 para o solo de Brasília. O valor médio do pH nos tratamentos $-\text{S}^0$ não variou estatisticamente ao longo dos 102 dias de incubação.

Nos tratamentos que receberam o enxofre ($+\text{S}^0$) os resultados da avaliação do pH mostraram acidificação mais acentuada nos solos ANB e RDP a partir dos 38 dias de incubação (Figuras 7 e 9), embora os valores de pH já tivessem diferido estatisticamente ($p < 0,05$) após 22 e 6 dias de incubação, respectivamente. A amostra ANB, após 102 dias de incubação, apresentou a maior acidificação em função da oxidação do S^0 , atingindo pH 2,6. No solo RDP, o menor valor de pH também foi observado após 102 dias de incubação, sendo de 3,1.

No solo BRA tratado com S^0 (Figura 8), a alteração do pH foi provavelmente tamponada pelo alto teor de argila e matéria orgânica do solo, permanecendo praticamente inalterado ao longo do tempo, embora diferenças significativas ($p < 0,05$) foram observadas em alguns períodos de incubação (6, 22, 86 e 102 dias).

Assim como na análise de SO_4^{2-} , o comportamento do pH foi muito semelhante ao descrito por Horowitz (2003) nas amostras de argissolo e latossolo incubadas com 9 e 12 g de $\text{S}^0 \text{ kg}^{-1}$ solo. O autor observou redução do pH de 6,2 para 3,3 no argissolo e a redução do pH de 4,2 para 4,0 no latossolo, após 70 dias de incubação. Entretanto, as medições de pH de Horowitz foram realizadas em água. A menor variação de pH no latossolo também foi atribuída pelo autor ao maior poder tampão daquele solo em função dos maiores teores de argila e matéria orgânica.

A acidificação do solo é proveniente da dissociação do H_2SO_4 resultante do processo de oxidação microbológica do S^0 , como pode ser visto na equação (2) (WAINWRIGHT, 1984):

O ácido sulfúrico produzido a partir da oxidação do S^0 além de ser um indicativo da ocorrência do processo, pode ser utilizado para a solubilização de rochas fosfáticas (LIPMAN; McLEAN; LINT, 1916; SWABY, 1975) ou também para a acidificação de solos calcários e alcalinos para o aumento da fertilidade (LOPEZ-AGUIRRE et al., 1999; NEILSEN et al., 1993).

Figura 7 – Valores de pH (CaCl₂ 0,01 M) no solo de Anhembi não tratado (-S⁰) e tratado com 10 g de S⁰ kg⁻¹ (+S⁰) após incubação por 0, 6, 22, 38, 54, 67, 86 e 102 dias em condições de microcosmo. Os valores são referentes à média de três repetições $\pm$ desvio padrão da média. Médias seguidas da mesma letra não diferiram entre si, dentro do mesmo período de incubação, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). C.V. = 3,69

Figura 8 – Valores de pH (CaCl₂ 0,01 M) no solo de Brasília não tratado (-S⁰) e tratado com 10 g de S⁰ kg⁻¹ (+S⁰) após incubação por 0, 6, 22, 38, 54, 67, 86 e 102 dias em condições de microcosmo. Os valores são referentes à média de três repetições $\pm$ desvio padrão da média. Médias seguidas da mesma letra significam que os tratamentos não diferiram entre si, dentro do mesmo período de incubação, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). C.V. = 1,23

Figura 9 – Valores de pH (CaCl₂ 0,01 M) no solo de Rondonópolis não tratado (-S⁰) e tratado com 10 g de S⁰ kg⁻¹ (+S⁰) após incubação por 0, 6, 22, 38, 54, 67, 86 e 102 dias em condições de microcosmo. Os valores são referentes à média de três repetições $\pm$ desvio padrão da média. Médias seguidas da mesma letra não diferiram entre si, dentro do mesmo período de incubação, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). C.V. = 1,40

2.3.3 Análises da estrutura das comunidades e diversidade de Bactéria

2.3.3.1 Detecção molecular da espécie *Acidithiobacillus thiooxidans* nos solos

Através de PCR com iniciadores específicos (DE WULF-DURAND; BRYANT; SLY, 1997), não foi possível detectar amplicons do gene rRNA 16S de *A. thiooxidans* nos solos avaliados, mesmo após 102 dias de incubação com S⁰. Os fragmentos do gene rRNA 16S dos isolados ELC1 e FG01 de *Acidithiobacillus thiooxidans* (GARCIA JR., 1991), utilizados como controle positivo das reações, foram amplificados com sucesso, produzindo amplicons do tamanho esperado (Figura 10A e B). Após a segunda amplificação foi observada a presença de alguns fragmentos inespecíficos de tamanho muito abaixo do esperado, esses fragmentos podem ter sido amplificados inespecificamente nas amostras, ou provenientes da formação de dímeros de oligonucleotídeos.

Desde a década de 90, a real importância de *A. thiooxidans* em solos agrícolas sem aplicação de S⁰ como fertilizante, vêm sendo contestada (CHAPMAN, 1990). Apesar de Vitolins e Swaby (1969) terem detectado a presença de *Thiobacillus thiooxidans* (atualmente *Acidithiobacillus thiooxidans*, KELLY; WOOD, 2000) em dois terços das 237 amostras de solos da Austrália analisadas, vários outros experimentos falharam no isolamento de bactérias deste gênero em outras localidades. Chapman (1990) analisou 43 solos na Escócia, não conseguindo isolar *Thiobacillus acidófilos* em nenhum deles. Lawrence e Germida (1991) também não detectaram a presença de populações de *A. thiooxidans* e *A. ferrooxidans* em 35 solos agrícolas canadenses, sendo encontrados populações de microrganismos heterotróficos que produziam tiosulfato ou sulfato, heterotróficos oxidantes de tiosulfato e autotróficos oxidantes de tiosulfato. Mesmo com a utilização de ferramentas moleculares, mais sensíveis do que os métodos de cultivo, também não foi detectada a presença de *A. thiooxidans* nos três solos brasileiros avaliados neste trabalho.

Segundo Germida e Janzen (1993), a idéia de que *Acidithiobacillus thiooxidans* é a principal espécie responsável pela oxidação do S^0 no solo foi concebida pelo fato da taxa de oxidação apresentada por esse organismo *in vitro* ser de longe muito maior do que a taxa de oxidação apresentada por organismos heterotróficos sob as mesmas condições. No entanto, a não detecção dessa espécie nos solos testados indica que a oxidação do S^0 está sendo realizada por outros microrganismos, provavelmente heterotróficos ou mixotróficos.

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose (1%) dos amplicons da *nested* PCR utilizando iniciadores específicos para a amplificação da bactéria *Acidithiobacillus thiooxidans* (DE WULF-DURAND; BRYANT; SLY, 1997). A figura 10A mostra a eletroforese do produto da primeira PCR, com tamanho de fragmento esperado para o *A. thiooxidans* em torno de 1057 pb. A figura 10B mostra a eletroforese da segunda PCR, com tamanho de fragmento esperado para o *A. thiooxidans* de 1017 pb. Foram amplificadas duas repetições (R1 e R2) do DNA metagenômico extraído dos tratamentos Brasília (BRA), Anhembi (ANB) e Rondonópolis (RDP) acrescidos de 10 g de S⁰ kg⁻¹ de solo, após 0 e 102 dias de incubação. Foram utilizadas como controle positivo da reação os isolados de *A. thiooxidans* ELC1 e FG01 (GARCIA JR, 1991). C- = controle negativo da primeira reação, C-1 = controle negativo da primeira reação reamplificado pela *nested* PCR, C-2 = controle negativo da segunda reação. M= Marcador molecular (Low DNA Mass Ladderr, Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos)

2.3.3.2 Análise da estrutura das comunidades de Bacteria nos solos tratados com S⁰

A análise dos perfis de amplicons do gene rRNA 16S após DGGE permitiu a observação da alteração na estrutura das comunidades de Bacteria em resposta a adição de S⁰ nas amostras de solos estudadas (Figuras 11, 12 e 13). De maneira geral, foi observada uma pequena redução no número de amplicons nos solos que receberam S⁰ a partir 54 dias de incubação. A maior alteração na estrutura da comunidade foi notada no solo de Rondonópolis.

As análises dos géis para a comparação dos perfis das comunidades bacterianas entre os diferentes tratamentos levaram em consideração apenas a presença e ausência de amplicons, sendo desconsiderada a intensidade das bandas. Entretanto, visualmente não foram observadas alterações expressivas da intensidade de amplicons nos tratamentos com S⁰, sugerindo que sua adição não favoreceu um grupo específico de bactérias.

A análise de agrupamento hierárquico, com base no perfil de amplicons, mostrou o agrupamento das amostras em função do tempo de incubação e do tratamento com S⁰. As repetições dos tratamentos foram bastante fiéis, sendo agrupadas no mesmo clado, mostrando a sensibilidade da técnica de DGGE em detectar alterações na estrutura das comunidades de bactérias no solo.

Figura 11 - Separação dos amplicons de fragmentos do gene rRNA 16S por Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) das amostras de solo de Anhembi, não tratadas (-S⁰) e tratadas com 10 g de S⁰ kg⁻¹ de solo (+S⁰), incubadas durante 0, 54 e 102 dias em microcosmo. Agrupamento hierárquico com base em matriz binária, pelo método de concordância simples ("simple matching"), com base no algoritmo Ward e distância Euclidiana. M = Marcador molecular, R1 = Repetição 1 e R2 = Repetição 2

Figura 12 - Separação dos amplicons de fragmentos do gene rRNA 16S por Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) das amostras de solo de Brasília, não tratadas (-S⁰) e tratadas com 10 g de S⁰ kg⁻¹ de solo (+S⁰), incubadas durante 0, 54 e 102 dias em microcosmo. Agrupamento hierárquico com base em matriz binária, pelo método de concordância simples ("simple matching"), com base no algoritmo Ward e distância Euclidiana. M = Marcador molecular, R1 = Repetição 1 e R2 = Repetição 2

Figura 13 - Separação dos amplicons de fragmentos do gene rRNA 16S por Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) das amostras de solo de Rondonópolis, não tratadas (-S⁰) e tratadas com 10 g de S⁰ kg⁻¹ de solo (+S⁰), incubadas durante 0, 54 e 102 dias em microcosmo. Agrupamento hierárquico com base em matriz binária, pelo método de concordância simples ("simple matching"), com base no algoritmo Ward e distância Euclidiana. M = Marcador molecular, R1 = Repetição 1 e R2 = Repetição 2

Estudos da estrutura de comunidades e diversidade de bactérias oxidantes de formas reduzidas de S são escassos e se concentram, em sua maioria, em ambientes de drenagem de minas ácidas e biorreatores (FERRERA; SÁNCHEZ; MAS, 2007; HE et al., 2007; TAN et al., 2007). Apenas em um trabalho foi utilizada a técnica de PCR-DGGE de fragmentos do gene rRNA 16S para avaliação da estrutura de comunidades de bactérias em função da adição de S^0 no solo. Wang et al. (2008), em estudo sobre o efeito do S na disponibilização do Cu e Zn no solo, avaliaram as alterações na estrutura da comunidade bacteriana após a adição de 20 g de $S^0 \text{ kg}^{-1}$ e períodos de incubação variando entre 1 e 64 dias. Os autores observaram a redução do pH do solo em até 3 unidades após 64 dias de incubação e evidente alteração da estrutura da comunidade bacteriana após 31 dias de incubação, com redução significativa do números de amplicons nas amostras tratadas com S^0 . Os autores atribuíram a alteração da estrutura da comunidade à redução do pH causada pela oxidação do S^0 por alguma espécie de bactéria presente no solo.

Wakelin e colaboradores (2008) analisaram a estrutura das comunidades de bactérias e fungos através de PCR-DGGE e a capacidade metabólica em 22 solos nativos e agrícolas australianos. Os autores concluíram que o pH foi o principal fator associado à variação da diversidade microbiológica, além de afetar a capacidade dos microrganismos em catabolizar compostos orgânicos simples, como aminoácidos.

Jesus et al. (2009), estudando as variações na estrutura das comunidades bacterianas no solo em função dos diferentes usos da terra na Amazônia, concluíram que as alterações observadas foram significativamente relacionadas a alterações nos atributos químicos do solo, principalmente à acidez.

2.3.3.3 Análise da diversidade de Bacteria nos solos tratados com S^0

Para o estudo do efeito da aplicação do S^0 sobre a diversidade das comunidades bacterianas nas amostras de solo de Anhembi (ANB), Brasília (BRA) e Rondonópolis (RDP), tratados com S^0 ($+S^0$) e não tratados ($-S^0$), após 102 dias de incubação, foram

sequeenciadas 12 bibliotecas de 96 clones de fragmentos do gene rRNA 16S, totalizando 811 sequências válidas.

Apesar da quantidade de sequências obtidas, em um ambiente tão diverso como o solo, ainda se faz necessário um grande esforço de sequenciamento para a melhor cobertura da diversidade bacteriana das amostras analisadas (Figura 14). A porcentagem de cobertura calculada para as bibliotecas de clones de rRNA 16S variou entre 32 e 54% (Tabela 4).

Os estimadores não-paramétricos de riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) Chao-1 e ACE, indicaram um aumento significativo no número de UTOs no solo de Anhembi em resposta ao tratamento com S^0 . Não foram observadas alterações na estimativa de riqueza de UTOs nos outros dois solos (Tabela 4).

Por outro lado, a adição de S^0 provocou a redução da diversidade e uma possível dominância de espécies no solo de Rondonópolis, indicada pelos valores dos índices de Shannon e Recíproco de Simpson (Tabela 4).

Os resultados do teste de Monte Carlo após 10000 permutações, pelo programa S-Libshuff (SCHLOSS; LARGET; HANDELSMAN, 2004) mostraram que os valores de p calculados foram menores que o valor de p ao nível de significância de 0,01% de probabilidade, indicando que todas as bibliotecas obtidas foram diferentes entre si (dados não mostrados).

Figura 14 - Curva de rarefação determinada pelo programa DOTUR (SCHLOSS; HANDELMAN, 2005), mostrando o número estimado de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs, distancia evolutiva 0,03) em função do esforço de sequenciamento das bibliotecas de fragmentos do gene rRNA 16S de Bacteria dos solos de Anhembi (A), Brasília (B) e Rondonópolis (C), não tratados (-S⁰) e tratados com 10 g de S⁰ kg⁻¹ (+S⁰), após 102 dias de incubação em condições de microcosmo

Tabela 4 - Estimativas de riqueza e diversidade de UTOs e cobertura das bibliotecas de fragmentos do gene rRNA 16S de Bacteria dos solos de Anhembi (ANB), Brasília (BRA) e Rondonópolis (RDP), sem adição de S⁰ (-S⁰) ou com 10 g de S⁰ kg⁻¹ de solo (+S⁰), após 102 dias de incubação em condições de microcosmo

Solo	Estimativa de Riqueza de UTOs		Índices de Diversidade		% Cobertura ^c	N seq. ^d	UTOS ^e
	Chao-1 ^a	ACE ^a	1/D ^b	Shannon ^b			
ANB -S ⁰	212,9 (143,0; 359,0)	242,4 (164,8; 390,0)	31,0 (19,3; 77,9)	4,0 (3,8; 4,2)	54,3	129	79
ANB +S ⁰	949,4 (441,3; 2220,4)	995,4 (473,8; 2250,5)	49,2 (33,6; 91,4)	4,4 (4,2; 4,5)	32,4	136	103
BRA -S ⁰	337,0 (217,5; 575,3)	376,5 (247,9; 614,9)	56,9 (40,3; 96,9)	4,4 (4,3; 4,5)	40,2	132	97
BRA +S ⁰	393,2 (240,4; 706,5)	433,7 (271,4; 745,3)	46,4 (30,3; 99,2)	4,3 (4,2; 4,5)	35,7	126	95
RDP -S ⁰	495,2 (294,9; 910,1)	539,2 (328,7; 950,5)	67,6 (50,8; 100,9)	4,5 (4,4; 4,6)	40,5	144	108
RDP +S ⁰	287,0 (179,9; 512,9)	320,5 (204,9; 545,9)	20,7 (13,5; 45,0)	3,9 (3,7; 4,1)	52,1	139	83

^a Estimadores não-paramétricos de riqueza de espécies: Chao-1 e ACE. ^b Índices de diversidade: Recíproco de Simpson (1/D) e Shannon, estimador “Maximum Likelihood Estimation” (MLE). ^c Percentual de cobertura da população amostrada. ^d Número de sequências válidas analisadas por biblioteca. ^e Número de Unidades Taxonômicas Operacionais (>97% similaridade). Valores entre parênteses representam intervalo de confiança a 95% probabilidade.

A afiliação taxonômica das sequências das bibliotecas obtidas foi realizada pela ferramenta Classifier do *Ribosomal Database Project* (limite de confiança de 95%) utilizando o modelo hierárquico “naive Bayes” (WANG et al., 2007).

Os principais filos detectados nos solos foram: Acidobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria e Bacteria incertae sedis. No solo BRA -S⁰ foram detectados ainda os filos: Gemmatimonadetes, Planctomycetes e Verrucomicrobia, e no solo ANB -S⁰ foi detectado o filo Bacteroidetes. Grande parte das sequências não foi classificada, e provavelmente representam novas espécies bacterianas (Figura 15).

Apesar dos índices de diversidade de Shannon e recíproco de Simpson calculados (Tabela 4) não terem demonstrado alterações significativas em função do tratamento com S⁰ (exceto no solo BRA), alterações nas estruturas das comunidades ao nível de filo foram observadas.

O tratamento com S⁰ aumentou o número de sequências de rRNA 16S de organismo afiliados a Firmicutes no solo ANB +S⁰. No mesmo solo, não foi observada a presença de representantes dos filos Acidobacteria, Proteobacteria, TM7 e Bacteroidetes, os quais haviam sido detectados no solo natural (ANB -S⁰). O contrário aconteceu com Bacteria Incertae sedis, só detectada no solo tratado com S⁰.

No solo de Brasília houve uma redução da diversidade de filos após adição de S⁰ (BRA +S⁰), em comparação o solo sem S⁰ (BRA -S⁰), não sendo identificados representantes dos filos Gemmatimonadetes, Planctomycetes e Verrucomicrobia. Nesse solo, a frequência de grupos afiliados aos filos Acidobacteria e Firmicutes diminuiu, enquanto que a presença de Actinobacteria e Bacteria Incertae sedis foi estimulada.

A população de Acidobacteria também foi afetada após o tratamento com S⁰ no solo de Rondonópolis (RDP +S⁰), juntamente com a diminuição da população de Proteobacteria. A população de Firmicutes foi sensivelmente favorecida pela adição do enxofre.

Figura 15 - Frequência relativa dos filos do domínio Bacteria detectados nos solos de Anhembi (ANB), Brasília (BRA) e Rondonópolis (RDP) tratados com enxofre elementar (+S⁰) e não tratados (-S⁰) classificados pela ferramenta Classifier do *Ribosomal Database Project* (limite de confiança de 95%) utilizando o modelo hierárquico “naive Bayes” (WANG et al., 2007)

As 811 sequências obtidas foram agrupadas em 518 Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs), levando-se em consideração 97% de similaridade entre as sequências para a definição de espécie. Dentro das 518 UTOs, 59, 93, 81, 83, 90 e 75 foram compostas por sequências exclusivas dos solos ANB +S⁰, ANB -S⁰, BRA +S⁰, RDP -S⁰ e RDP +S⁰, respectivamente (Anexo A).

As 518 UTOs foram distribuídas entre os filos: Firmicutes (183), Proteobacteria (113), Actinobacteria (95), Acidobacteria (76), Bacteria Incertae sedis (42), Gemmatimonadetes (3), Verrucomicrobia (3), Planctomycetes (2), Cyanobacteria (1) e TM7 (1) (Anexo A).

Dentro do filo Firmicutes, 70% das UTOs foram afiliadas à ordem Bacillales, sendo os principais gêneros detectados: *Alicyclobacillus*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Tumebacillus*, *Pullulanibacillus*, *Cohnella* e *Paenibacillus*.

As UTOs 84, 153, 460 e 470 estiveram associadas principalmente aos solos ANB +S⁰ e RDP +S⁰, e apresentaram similaridade com as sequências de *Bacillus* sp. e *Alicyclobacillus* (Figura 16). Yahya e colaboradores (2008) descreveram um isolado de *Alicyclobacillus* extremamente versátil, capaz de utilizar fontes orgânicas e inorgânicas de energia e carbono, inclusive formas reduzidas de enxofre isolado de rejeitos de uma mina de ouro norte americana. Em 2009, Guo e colegas reportaram o isolamento de *Alicyclobacillus aeris* de uma mina de cobre na China. Essa bactéria apresentava capacidade de crescimento heterotrófico ou quimiolitotrófico, oxidando ferro férrico, enxofre elementar e tetrionato.

Apesar das condições de aerobiose do experimento, 25% das UTOs foram classificadas na ordem Clostridiales (Anexo A). Escoffier e colaboradores (2001) descreveram um *Clostridium* com capacidade de redução de tiosulfato e S⁰, mas incapacidade de reduzir sulfato isolado de campos de arroz. A espécie *Clostridium sulfidigenes*, isolada em sedimentos de lagos, também foi descrita apresentando capacidade de redução de tiosulfato e S⁰ (SALLAM; STEINBUCHER, 2009).

A UTO 92 (2,94% de sequências do solo ANB +S⁰) apresentou similaridade com uma bactéria clostridiaceae isolada do lodo de fermentação de dejetos bovinos do Japão (acesso AB298768) e um *Clostridium* isolado de microcosmos contendo solo de arroz anóxico (AJ229234) (Figura 16). A UTO 139, também exclusiva do solo ANB+S⁰,

apresentou similaridade com a bactéria *Desulfibacter alkalitolerans* (aceso AY538171). Nielsen; Kjeldsen; Ingvorsen (2006) descreveram este organismo como sendo capaz de utilizar S^0 , sulfito, tiosulfato, nitrato e pequenas quantidades de nitrito como aceptores de elétrons.

No filo Proteobacteria, a classe Alphaproteobacteria foi a mais representativa (62%), principalmente a ordem Rhizobiales. Algumas UTOs mostraram similaridade com membros da família Beijerinckiaceae (acesso: EU044137 e FM252035). El-Tarabily et al. (2006) descreveram pela primeira vez uma bactéria da espécie *Rhizobium* capaz de oxidar S^0 em solos dos Emirados Árabes Unidos.

As UTOs 3 e 13 apresentaram similaridade com *Rhodoplanes* sp. (EF663359) e Rhodospirillales (EU297894), bactérias fototróficas púrpuras não-sulfurosas identificadas em amostras de solo. Segundo Imhoff (2006), o crescimento quimiotrófico em condição microaeróbia e aeróbia, no escuro, é comum neste tipo de bactéria. Algumas bactérias ainda podem utilizar hidrogênio molecular, sulfeto ou tiosulfato com doadores de elétrons para a fotossíntese.

A UTO 203 foi afiliada à Alphaproteobacteria *Paracoccus panthotrophus*, uma importante bactéria oxidante de enxofre mixotrófica isolada de solos (DEB et al., 2004; EL-TARABILY et al., 2006; GHOSH; MANDAL; ROY, 2006; GHOSH; ROY, 2007b). Essa UTO só foi observada no solo BRA.

A classe Gammaproteobacteria, representou 15% das UTOs, sendo a ordem Xanthomonadales a mais observada.

Cinco UTOs foram afiliadas ao gênero *Dyella*, recentemente associado com a oxidação de enxofre no solo. A UTO 272, representando 6,35% das sequências do solo BRA + S^0 , apresentou 98% de identidade com a Gammaproteobacteria *Dyella marensis* (AM939778). Anandham e colaboradores (2008) observaram similaridade de isolados de solo rizosférico na Coreia do Sul com bactérias pertencentes ao gênero *Dyella*, capazes de oxidar tiosulfato, juntamente com outras proteobactérias como: *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Microbacterium* e *Leifsonia*. Recentemente uma nova espécie do gênero *Dyella*, *Dyella thiooxidans*, com característica quimiolitotrófica facultativa e capacidade de oxidação de tiosulfato, foi isolada da rizosfera de girassol em solos agrícolas na Coreia do Sul (ANANDHAM et al., 2010a).

Nenhuma das UTO detectadas apresentou similaridade com *Acidithiobacillus thiooxidans*, também uma Gammaproteobacteria.

Em relação ao filo Actinobacteria, a sub-classe Actinobacteridae correspondeu a 72% das UTOs, seguida pela sub-classe Rubrobacteridae (12%) e Acidimicrobidae (8%).

As UTOs 93 e 122, representando cerca de 7% e 28% das sequências dos solos ANB+S⁰ e RDP+S⁰, respectivamente, apresentaram similaridade com uma Actinobacteria rizosférica não cultivada isolada das Ilhas Falkland (acesso EF220685). Quando filtradas as sequências de organismos não cultivados na busca, observou-se a similaridade com uma *Actinomadura* isolada da rizosfera de uma planta medicinal na Tailândia (acesso FJ150688). Não foi possível associar esta UTO tão representativa com uma eventual capacidade de oxidação de S⁰.

O filo Acidobacteria foi representado principalmente pela classe Acidobacteria Gp1 (72%). As UTOs mais abundantes (203, 182, 413) foram constituídas principalmente por sequências provenientes dos solos de Brasília e Rondonópolis não tratados com S⁰, e apresentaram similaridade maior com Acidobacteria não cultivadas desconhecidas.

Como descrito anteriormente, o filo Acidobacteria foi o mais afetado pelo tratamento dos três solos analisados com S⁰. Jangid et al. (2008) observaram uma redução significativa da frequência do filo Acidobacteria em solos onde foram aplicados fertilizantes, em comparação com solos de floresta. Segundo os autores, as características oligotróficas e de crescimento lento das Acidobacteria não oferecem vantagem quando o ambiente é exposto a uma condição de estresse, sugerindo sua melhor adaptação a solos de ambientes florestais.

De maneira geral, a frequência do filo Acidobacteria foi diminuiu consideravelmente em função da adição do S⁰. A frequência de Proteobacteria foi reduzida nos solos de estrutura arenosa (ANB e RDP). Nesses casos, a oxidação do S⁰ pode estar sendo realizada por representantes dos filos Firmicutes e Actinobacteria. No solo de textura argilosa, houve o estímulo do filo Proteobacteria, Firmicutes e Bacteria Incertae sedis, possivelmente sendo destes filios os principais oxidantes de S⁰.

Figura 16 - Árvore filogenética das UTOs mais abundantes, agrupadas pelo método de Neighbor-Joining, distância evolutiva computada pelo método Kimura-2 e teste de bootstrap com 1000 repetições. A porcentagem relativa das sequências de cada biblioteca na composição da UTO é mostrada entre parênteses (ANB -S⁰, ANB+S⁰, BRA -S⁰, BRA +S⁰, RDP -S⁰, RDP +S⁰, respectivamente)

2.3.4 Análise da diversidade de Archaea nos solos tratados com S⁰

A exemplo do estudo de diversidade de Bacteria, as comunidades de Archaea nos solos de Anhembi, Brasília e Rondonópolis, 102 dias tratamento com S⁰, também foram analisadas através de métodos moleculares independentes de cultivo.

Bibliotecas de fragmentos do gene do rRNA 16S de Archaea foram sequenciadas, totalizando 463 sequências válidas agrupadas em 39 UTOs. Apesar do pequeno esforço de sequenciamento, as bibliotecas mostraram tendência à saturação (Figura 17) e alta taxa de cobertura das comunidades (Tabela 5), com exceção da biblioteca RDP +S⁰. A biblioteca RDP +S⁰ apresentou algumas anomalias em comparação com as demais. Foram sequenciadas 288 clones desta biblioteca, com a geração de 200 sequências válidas apresentando qualidade acima de 20, determinada pelo programa *PHRED* (EWING; GREEN, 1998). Entretanto, dentre estas 200 sequências, apenas 12 foram classificadas como Archaea, quando comparadas aos bancos de dados do NCBI (ALTSCHUL et al., 1990) e *Ribosomal Database Project* (*Classifier*, WANG et al., 2007). Não foram classificadas 188 sequências, mesmo apresentando cromatogramas confiáveis. A maior parte das sequências não indicou similaridade com sequências do banco de dados do NCBI, enquanto que 75 apresentaram alta similaridade com uma proteína desconhecida do organismo *Catenulispora acidiphila* (Acesso CP001700). Este fato pode ser decorrente da utilização de primers degenerados para a amplificação dos fragmentos do gene rRNA 16S que podem ter se pareado de maneira inespecífica em outras regiões do genoma de organismos presentes na amostra. Outra possibilidade, mais difícil de ser comprovada devido às dificuldades de cultivo de Archaea, é a presença de espécies totalmente desconhecidas. Por precaução, apenas as 12 sequências classificadas como Archaea foram utilizadas nas análises posteriores.

Como já comentado acima, os estimadores não-paramétricos de riqueza de espécies (Chao-1 e ACE,) além do número de UTOS calculado (97% similaridade para a definição de espécie) demonstram a baixa diversidade de Archaea nos solos estudados, havendo a dominância de um pequeno grupo de espécies (Shannon e

Recíproco de Simpson). Os índices de riqueza ACE e de diversidade de Shannon indicaram a redução do número de espécies e a maior dominância nos solos ANB e RDP +S⁰, em relação solos não tratadas com S⁰ (Tabela 5). Essas diferenças podem advir da grande diferença entre o número de clones sequenciados. Nas bibliotecas do solo de Brasília, houve uma redução de praticamente 50% do número de UTOs estimadas em função do tratamento com S⁰, entretanto os índices de riqueza e diversidade de espécies não foram alterados significativamente.

Os resultados da análise realizada pelo programa S-libshuff (Tabela 6) demonstraram que as comunidades de Archaea amostradas nos 3 solos sem S⁰ foram estatisticamente diferentes. Os resultados também apontam que a adição de S⁰ não alterou as comunidades de Archaea dos mesmos solos. Nos solos tratados com S⁰, apenas as comunidades de Archaea em ANB +S⁰ e BRA +S⁰ foram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,01$).

Figura 17 - Curva de rarefação determinada pelo programa DOTUR (SCHLOSS; HANDELMAN, 2005), mostrando o número estimado de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs, distancia evolutiva 0,03) em função do esforço de sequenciamento de clones de fragmentos do gene rRNA 16S de Archaea dos solos de Anhembi (ANB), Brasília (BRA) e Rondonópolis (RDP), não tratados ($-S^0$) e tratados com 10 g de $S^0 \text{ kg}^{-1}$ ($+S^0$), após 102 dias de incubação em condições de microcosmo

Tabela 5 - Estimativas dos índices de riqueza e diversidade de UTOs e cobertura de amostragem com base no sequenciamento de clones do gene rRNA 16S de Archaea dos solos de Anhembi (ANB), Brasília (BRA) e Rondonópolis (RDP), sem adição de S^0 ($-S^0$) ou com 10 g de S^0 kg^{-1} de solo ($+S^0$), após 102 dias de incubação em condições de microcosmo

Solo	Estimativa de Riqueza de UTOS		Índices de Diversidade		% Cobertura ^c	N seq. ^d	UTOs ^e
	Chao-1 ^a	ACE ^a	1/D ^b	Shannon ^b			
ANB - S^0	16,0 (9,0; 72,8)	18,0 (9,5; 74,6)	1,3 (0,5; 2,8)	0,5 (0,3; 0,7)	97,3	147	8
ANB + S^0	17,0 (8,9; 58,7)	7,0 (7,0; 7,0)	2,3 (1,2; 36,9)	1,0 (0,8; 1,2)	92,8	69	7
BRA - S^0	14,0 (12,3; 26,4)	21,1 (16,2; 46)	3,4 (2,1; 8,0)	1,8 (1,5; 2,0)	91,1	79	15
BRA + S^0	10,3 (8,3; 27,0)	11,8 (8,6; 30,4)	3,1 (1,7; 14,2)	1,3 (1,2 1,5)	96,4	83	8
RDP - S^0	30,0 (17,0; 98,8)	34,0 (18,5; 102,3)	2,6 (1,6; 7,6)	1,5 (1,2; 1,9)	89,0	73	14
RDP + S^0	11,0 (6,0; 42)	5,0 (5,0 ;5,0)	1,2 (1,1; 16,4)	1,1 (0,5; 1,7)	66,7	12	5

^a Estimadores não-paramétricos de riqueza de espécies: Chao-1 e ACE. ^b Índices de diversidade: Recíproco de Simpson (1/D) e Shannon, estimador “Maximum Likelihood Estimation” (MLE). ^c Percentual de cobertura da população amostrada. ^d Número de sequências válidas analisadas por biblioteca. ^e Número de Unidades Taxonômicas Operacionais (>97% similaridade). Valores entre parênteses representam intervalo de confiança a 95% probabilidade

Tabela 6 - Valores de P calculados pelo programa S-Libshuff (SCHLOSS; LARGET; HANDELSMAN, 2004) para comparação das bibliotecas de clones rRNA 16S de Archaea em solos de Anhembi, SP (ANB), Brasília, DF (BRA) e Rondonópolis, MT (RDP), sem adição de S^0 ($-S^0$) ou com 10 g de S^0 kg^{-1} de solo ($+S^0$), após 102 dias de incubação em condições de microcosmo

	ANB $-S^0$	ANB $+S^0$	BRA $-S^0$	BRA $+S^0$	RDP $-S^0$	RDP $+S^0$
ANB $-S^0$	-	0,0177	0,0000	0,0000	0,0002	0,0001
ANB $+S^0$	0,5124	-	0,0000	0,0000	0,0001	0,0134
BRA $-S^0$	0,0000	0,0000	-	0,0003	0,0000	0,0611
BRA $+S^0$	0,0000	0,0000	0,0082	-	0,0000	0,0017
RDP $-S^0$	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	-	0,0000
RDP $+S^0$	0,0280	0,0170	0,0285	0,1031	0,3387	-

Valores estimados para $p < 0,05 = 0,0017$ e $p < 0,01 = 0,0003$

Apesar da baixa diversidade de espécies, pouca informação pôde ser obtida do ponto de vista filogenético, visto que mais de 95% das sequências foram afiliadas como Archaea não-classificadas (Figura 18), mostrando uma lacuna no entendimento funcional destes organismos no solo.

Recentemente tem-se creditado novas funções ao domínio Archaea além das já bem estudadas em ambientes extremos, como drenagem ácida de minas, fossas termais, lagos salinos e profundezas de oceanos. Em condições não extremas, como os solos, as arqueias estão associadas com as transformações biogeoquímicas de minerais. Um exemplo é a grande contribuição no processo de nitrificação dada pela oxidação da amônia (ZHANG et al., 2010). Não foram encontradas informações a respeito de oxidação de enxofre por arqueias em solos, indicando mais uma vez que ainda há muito o quê ser descoberto nesta área.

A análise filogenética demonstrou similaridade das UTOs quase em sua totalidade com Archaea não cultivadas (Figura 19). A UTO 3, apresentando 99% de identidade com uma arqueia não-cultivada de solo rizosférico de gramíneas (Acesso AF512961), concentrou quase 38% de todas as sequências de Archaea analisadas e a maior parte das sequências do solo ANB (Tabela 7). A UTO 14 foi composta por cerca de 15% de todas as sequências, principalmente do solo de Brasília (Tabela 7), apresentando 100% de identidade com o acesso DQ791525, uma arqueia não-cultivada de solo aquecido do vulcão Kilauea, no Havaí (Figura 19). Algumas UTOs, como a UTO 39, apresentaram similaridade com arqueias oxidantes de amônia em solos ácidos (FJ174743), indicando que esse processo pode ocorrer nos solos estudados. Poucas UTOs apresentaram sequências exclusivas das bibliotecas tratadas com S⁰ indicando pouca sensibilidade dessas populações ao enxofre elementar, no período de incubação avaliado.

Figura 18 - Frequência relativa dos filos do domínio Archaea detectados nos solos de Anhembi (ANB), Brasília (BRA) e Rondonópolis (RDP), tratados com enxofre elementar (+S⁰) e não tratados (-S⁰) classificados pela ferramenta Classifier do *Ribosomal Database Project* (limite de confiança de 95%) utilizando o modelo hierárquico “naive Bayes” (WANG et al., 2007)

Figura 19 - Árvore filogenética determinada pelo método de Neighbor-Joining, distância evolutiva computada pelo método Kimura-2 e teste de bootstrap com 1000 repetições. UTOS mais abundantes com a porcentagem de sequência na UTO entre parênteses (ANB -S⁰, ANB+S⁰, BRA -S⁰, BRA +S⁰, RDP -S⁰, RDP+S⁰, respectivamente)

Tabela 7 - Afiliação taxonômica e frequência de UTOs representando Archaea nos solos avaliados

(continua)

UTO	Domínio	Filo	ANB -S ⁰	ANB +S ⁰	BRA -S ⁰	BRA +S ⁰	RDP -S ⁰	RDP +S ⁰
1	Archaea	ND	4,76	0,00	10,13	38,55	0,00	0,00
2	Archaea	ND	23,13	18,84	0,00	0,00	0,00	0,00
3	Archaea	ND	65,31	73,91	0,00	14,46	10,96	66,67
4	Archaea	ND	1,36	0,00	5,06	3,61	8,22	0,00
5	Archaea	Euryarchaeota	1,36	0,00	0,00	1,20	0,00	0,00
6	Archaea	ND	2,04	0,00	0,00	0,00	4,11	0,00
7	Archaea	Euryarchaeota	0,68	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	Archaea	Euryarchaeota	0,68	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	Archaea	Euryarchaeota	0,68	1,45	0,00	0,00	0,00	0,00
10	Archaea	ND	0,00	1,45	0,00	0,00	0,00	0,00
11	Archaea	ND	0,00	1,45	0,00	0,00	0,00	0,00
12	Archaea	ND	0,00	1,45	0,00	0,00	0,00	0,00
13	Archaea	Euryarchaeota	0,00	1,45	0,00	0,00	0,00	0,00
14	Archaea	ND	0,00	0,00	50,63	34,94	0,00	8,33
15	Archaea	ND	0,00	0,00	1,27	0,00	0,00	0,00
16	Archaea	ND	0,00	0,00	7,59	0,00	60,27	0,00
17	Archaea	ND	0,00	0,00	1,27	0,00	0,00	0,00
18	Archaea	ND	0,00	0,00	2,53	0,00	0,00	0,00
19	Archaea	ND	0,00	0,00	7,59	0,00	0,00	0,00
20	Archaea	ND	0,00	0,00	2,53	0,00	2,74	0,00
21	Archaea	Euryarchaeota	0,00	0,00	1,27	0,00	0,00	0,00
22	Archaea	Euryarchaeota	0,00	0,00	1,27	0,00	0,00	0,00
23	Archaea	ND	0,00	0,00	2,53	0,00	1,37	0,00
24	Archaea	ND	0,00	0,00	1,27	0,00	0,00	0,00
25	Archaea	ND	0,00	0,00	1,27	1,20	0,00	0,00

Tabela 7 - Afiliação taxonômica e frequência de UTOs representando Archaea nos solos avaliados

(conclusão)

UTO	Domínio	Filo	ANB -S ⁰	ANB +S ⁰	BRA -S ⁰	BRA +S ⁰	RDP -S ⁰	RDP +S ⁰
26	Archaea	Euryarchaeota	0,00	0,00	2,53	0,00	0,00	0,00
27	Archaea	ND	0,00	0,00	1,27	0,00	1,37	0,00
28	Archaea	ND	0,00	0,00	0,00	2,41	0,00	0,00
29	Archaea	ND	0,00	0,00	0,00	2,41	1,37	0,00
30	Archaea	ND	0,00	0,00	0,00	1,20	0,00	0,00
31	Archaea	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	1,37	0,00
32	Archaea	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	1,37	0,00
33	Archaea	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	2,74	0,00
34	Archaea	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	1,37	0,00
35	Archaea	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	1,37	0,00
36	Archaea	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	1,37	0,00
37	Archaea	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,33
38	Archaea	Euryarchaeota	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,33
39	Archaea	Euryarchaeota	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,33

O conhecimento sobre oxidação do enxofre em condições aeróbicas por arqueias se restringe aos representantes da ordem Sulfolobales, conhecidamente termoacidófilos (FRIEDRICH et al., 2005). Recentes trabalhos divulgaram um estudo global da distribuição de Archaea no solo e a presença de padrões de distribuição em diferentes ambientes (BATES et al., 2010; AUGUET; BARBERAN; CASAMAYOR, 2010). Bates e colaboradores (2010), através da técnica de pirosequenciamento, avaliaram a comunidade de Bacteria e Archaea de solos coletados em 146 locais diferentes, entre a América do Norte, América do Sul e Antártica, além de dois solos fertilizados com N por longos períodos. Foram obtidas mais de 159 mil sequências, sendo identificados mais de 15000 filotipos. Desse total, 2672 sequências foram identificadas como Archaea, em 127 solos, sendo 90% delas agrupadas como Crenarchaeota. Neste trabalho também foi observada a dominância de poucos grupos, sendo que apenas dois filotipos representaram mais que 70% de todas as sequências de Archaea obtidas. A similaridade com sequências descritas anteriormente sugerem o potencial de oxidação de amônia pelos filotipos identificados. Euryarchaeota representaram apenas 1,5% das sequências obtidas.

A abordagem de Auguet, Barberan e Casamayor (2010) foi a de avaliação do padrão de distribuição global de Archaea através de análises *in silico*, dividindo as sequências existentes nos bancos de dados em sete categorias de ambientes, incluindo o solo. Os autores observaram que as fossas hidrotermais e os ambientes planctônicos são os principais reservatórios de diversidade desse domínio. No solo, as sequências foram filogeneticamente mais próximas, resultando um maior agrupamento de espécies.

Nossos resultados sugerem que ainda se faz necessário um esforço maior de identificação e principalmente isolamento/cultivo de Archaea em ambientes não extremos para a melhor compreensão da importância desses organismos nas transformações biogeoquímica dos elementos, por exemplo, o enxofre.

2.3.5 Isolamento e cultivo de bactérias oxidantes de S

Foram utilizados quatro meios de cultura contendo apenas formas reduzidas de S e características diferentes para a tentativa de isolamento de bactérias oxidantes de S mais amplo. O meio de cultura sólido descrito por Colmer, Temple e Hinkle (1950), tendo o tiosulfato de sódio como fonte de S, foi descrito para o isolamento de bactérias do gênero *Thiobacillus*, presentes em drenagem ácida de minas, sendo o pH final deste meio 4,8. Garcia Jr. (1991) descreveu a utilização deste meio de cultura para o cultivo de *Acidithiobacillus thiooxidans* isolados de minas de carvão e urânio brasileiras. O meio de cultura descrito por Mukhopadhyaya (2000) também utiliza o tiosulfato como fonte única de energia e elétrons para os microrganismos, a diferença é o pH final deste meio próximo a 7,5. Este meio foi utilizado pelo autor para o cultivo de diversas bactérias oxidantes de S, inclusive as do gênero *Paracoccus*. O indicador de pH vermelho fenol é utilizado para sinalizar a acidificação do meio, e consequente oxidação do tiosulfato.

Devido ao fato de alguns microrganismos apresentarem capacidade de oxidação do tiosulfato, mas não conseguirem utilizar o S^0 como fonte de energia e elétrons, optou-se também pela utilização de meios de cultura contendo esta forma de S. O meio de cultura descrito por Wieringa (1966) é constituído por duas camadas, sendo a inferior contendo HCl e a superior contendo uma solução de polissulfeto. O polissulfeto é precipitado em uma fina camada opaca de S^0 na porção superior pela percolação do HCl, sendo o pH final próxima entre 3,5 a 4. A oxidação do S^0 provoca a formação de um halo.

Apesar da utilização de S^0 em pó não ser usual em meios de cultura sólidos, essa forma de S foi incorporada na mesma solução de sais usada por Mukhopadhyaya (2000) em substituição do tiosulfato, uma vez que o maior objetivo do trabalho era o isolamento de bactérias oxidantes do S^0 .

A incubação por 30 dias das suspensões de solos tratados com S^0 mostrou um pequeno número de bactérias oxidantes de formas reduzidas de enxofre, sendo o máximo na ordem de 10^3 UFC por grama de solo (Tabelas 8 - 10). O maior número de bactérias isoladas foi observado quando se utilizou o tiosulfato como fonte de S em

meio com pH 7-7,5 (meio MS + tiosulfato, MUKHOPADHYAYA, 2000), principalmente no solo de Rondonópolis (Figura 22). O solo de Brasília foi o que apresentou o menor número de UFCs (Figura 21). Poucas colônias foram observadas nos demais meios de cultura. As colônias obtidas foram replicadas em novas placas para obtenção de colônias puras.

Muitas dificuldades foram encontradas na tentativa de cultivo dos isolados em meio de cultura líquido, impossibilitando o processo de determinação da taxa de oxidação do S^0 . Para a avaliação da oxidação de S^0 o critério adotado foi a utilização do indicador de pH Vermelho Fenol. Quando em pH 7 o meio de cultura apresenta cor laranja avermelhado, mudando para amarelo em pH < 7 (Figura 23). O tempo de replicação e produção de biomassa também foi um critério utilizado para a escolha dos melhores isolados.

Tabela 8 - Número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) após 30 dias de incubação a 28 °C, de alíquotas das diluições da 10^{-2} e 10^{-3} da suspensão de solo de Anhembi (ANB + S^0) nos meios de cultura contendo tiosulfato: MS+Tiosulfato (MUKHOPADHYAYA, 2000) e Colmer (COLMER; TEMPLE; KINCKLE, 1950) e nos meios de cultura contendo S^0 : MS + S^0 (adaptado de MUKHOPADHYAYA, 2000) e Polissulfeto dupla camada (WIERINGA, 1966)

ANB	MS + Tiosulfato		Colmer		MS+ S^0		Wieringa	
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}
R1	178	3	0	0	14	0	0	0
R2	184	2	0	0	11	0	0	0
R3	0	0	0	0	1	0	0	0
R4	0	0	0	0	0	0	1	0
R5	0	0	3	0	0	0	1	0
R6	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 9 - Número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) após 30 dias de incubação a 28 °C, de alíquotas das diluições da 10^{-2} e 10^{-3} da suspensão de solo de Brasília (BRA +S⁰) nos meios de cultura contendo tiossulfato: MS+Tiossulfato (MUKHOPADHYAYA, 2000) e Colmer (COLMER; TEMPLE; KINCKLE, 1950) e nos meios de cultura contendo S⁰: MS +S⁰ (adaptado de MUKHOPADHYAYA, 2000) e Polissulfeto dupla camada (WIERINGA, 1966)

BRA	MS + Tiossulfato		Colmer		MS+S ⁰		Wieringa	
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}
R1	0	0	0	0	0	0	0	0
R2	0	0	0	0	1	0	1	0
R3	1	0	2	0	0	0	0	0
R4	0	0	0	0	0	0	0	0
R5	0	0	0	0	0	0	0	0
R6	0	0	2	0	0	0	0	0

Tabela 10 - Número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) após 30 dias de incubação a 28 °C, de alíquotas das diluições da 10^{-2} e 10^{-3} da suspensão de solo de Rondonópolis (RDP +S⁰) nos meios de cultura contendo tiossulfato: MS+Tiossulfato (MUKHOPADHYAYA, 2000) e Colmer (COLMER; TEMPLE; KINCKLE, 1950) e nos meios de cultura contendo S⁰: MS +S⁰ (adaptado de MUKHOPADHYAYA, 2000) e Polissulfeto dupla camada (WIERINGA, 1966)

RDP	MS+ Tiossulfato		Colmer		MS+S ⁰		Wieringa	
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}
R1	220	0	0	0	6	0	0	0
R2	104	0	4	0	11	0	0	0
R3	181	1	1	0	4	0	0	0
R4	145	0	0	0	2	0	0	0
R5	176	0	0	0	3	0	0	0
R6	79	5	0	0	2	0	0	0

Figura 20 - Diversidade de bactérias oxidantes de enxofre isoladas da amostra de solo de Anhembi após plaqueamento de extrato do solo na diluição 10^{-2} e 30 dias de incubação a 28 °C. A e B – Meio de cultura MS+Tiosulfato (MUKHOPADHYAYA, 2000). C e D – Meio de cultura MS +S⁰ (adaptado de MUKHOPADHYAYA, 2000). E – Meio de cultura Colmer (COLMER; TEMPLE; KINCKLE, 1950). A, B, C, D receberam indicador de pH Vermelho Fenol

Figura 21 - Diversidade de bactérias oxidantes de enxofre isoladas da amostra de solo de Brasília após plaqueamento de extrato do solo na diluição 10^{-2} e 30 dias de incubação a 28 °C. A – Meio de cultura MS+Tiosulfato (MUKHOPADHYAYA, 2000). B – Meio de cultura MS +S⁰ (adaptado de MUKHOPADHYAYA, 2000). C – Meio de cultura Colmer (COLMER; TEMPLE; KINCKLE, 1950). D – Meio Polissulfeto dupla camada (WIERINGA, 1966). A e B receberam indicador de pH Vermelho Fenol

Figura 22 - Diversidade de bactérias oxidantes de enxofre isoladas da amostra de solo de Rondonópolis após plaqueamento de extrato do solo na diluição 10^{-2} e 30 dias de incubação a 28 °C. A e B – Meio de cultura MS+Tiosulfato (MUKHOPADHYAYA, 2000). C e D – Meio de cultura MS +S⁰ (adaptado de MUKHOPADHYAYA, 2000). E – Meio de cultura Colmer (COLMER; TEMPLE; KINCKLE, 1950)

Figura 23 - Acidificação diferencial do meio de cultura MS +S⁰ (adaptado de MUKHOPADHYAYA, 2000), indicada pela alteração da coloração do indicador Vermelho Fenol, pelo crescimento dos isolados *Aurantimonas* (A) e *Micrococcus* (B) após 14 dias de incubação.

Fragmentos do gene rRNA 16S de 50 isolados em cultura pura foram sequenciados para fins de identificação. Após processadas, as sequências foram comparadas com o banco de dados do NCBI (Tabela 11).

A afiliação genética demonstrou o grande predomínio do filo Proteobacteria entre os isolados, representando 68% dos mesmos. Os dois únicos filos representados além de Proteobacteria foram Actinobacteria e Firmicutes, com 18 e 14% dos isolados. Dentro do filo Proteobacteria foram isoladas as Alphaproteobacterias: *Aurantimonas*, *Novosphingobium*, *Methylobacterium* *Paracoccus* e *Bradyrhizobium*, além da Gammaproteobacteria: *Acinetobacter*. No filo Actinobacteria foram isoladas bactérias apresentando similaridade com os gêneros *Mycobacterium* e *Micrococcus* e em Firmicutes com o gênero *Bacillus*.

Como já descrito anteriormente as bactérias do gênero *Paracoccus* tem sido utilizadas como organismos modelos para estudo do papel do operon SOX na oxidação de formas reduzidas de S, além de terem sido isoladas de vários solos e rizosfera de plantas (GHOSH; DAM, 2009; FRIEDRICH et al., 2001; FRIEDRICH et al., 2005; GHOSH; ROY, 2006b; GHOSH; MANDAL; ROY, 2006; GHOSH; ROY, 2007b). O isolado ANB 12 apresentou identidade com a bactéria *Paracoccus* sp (acesso

FN811323.1), indicando a presença desta espécie na amostra de Anhembi. Uma UTO apresentando similaridade com *Paracoccus* foi anteriormente observada no solo de Brasília.

Em estudos sobre as características do genoma de bactérias marinhas oxidantes de Mn^{2+} do gênero *Aurantimonas*, Dick e colaboradores (2008) observaram a presença do operon Sox completo, de maneira idêntica ao encontrado em *Paracoccus panthotrophus*.

O operon Sox também foi identificado em *Bradhyrhizobium japonicum* (GHOSH; MALLICK; DasGUPTA, 2009), condizente com sua habilidade de crescimento quimiolitotrófico em tiosulfato (MASUDA et al., 2010). Curiosamente, Li et al., (2010) observaram a oxidação de enxofre elementar por uma linhagem de *Fusarium solani* carregando endofiticamente a bactéria *Bradyrhizobium* sp. A função da bactéria na oxidação do S^0 ainda não está totalmente compreendida.

Bactérias do gênero *Acinetobacter* foram encontradas em lagoas de tratamento de rejeitos de curtume no México apresentando capacidade de oxidação de formas reduzidas de S (PACHECO; PEÑA; MALDONADO, 2008). Muito embora espécies clínicas do gênero *Acinetobacter* tenham sido mais identificadas, recentemente a espécie *Aurantimonas brisouii* foi isolada em um solo turfoso da Coréia do Sul, entretanto a sua capacidade de oxidação de S não foi descrita (ANANDHAM et al., 2010b).

Anandham e colegas (2007) descreveram anteriormente o isolamento de *Methylobacterium oryzae* com capacidade de crescimento mixotrófico em meio de cultura contendo tiosulfato e succinato de sódio. Em 2009, o crescimento mixotrófico em meio de cultura contendo metanol e tiosulfato foi descrito para *Methylobacterium goesingensis* e *Methylobacterium fujisawaense* (ANANDHAM et. al., 2009).

Entre as Actinobacteria, Vitolins e Swaby (1969) identificaram *Micrococcus* em 3% das 206 linhagens de bactérias testadas em meio de cultura contendo S^0 e tiosulfato. Entre os Firmicutes, foram identificadas *Bacillus licheniformis*, *B. brevis* e *B. coagulans*.

Tabela 11 - Afiliação genética dos isolados de bactérias oxidantes de S, com base no sequenciamento de fragmentos do gene rRNA 16S

(continua)

Isolado	Acesso	Descrição	Score	E- value	Filo
ANB1	EU294142.1	<i>Acinetobacter</i> sp. strain CRF14	832	0.0	Proteobacteria
ANB2	FJ389742.1	<i>Acinetobacter</i> sp. ZHT42	861	0.0	Proteobacteria
ANB3	HM044352.1	<i>Bacillus</i> sp. ISP5-41-3	887	0.0	Firmicutes
ANB4	FJ389742.1	<i>Acinetobacter</i> sp. ZHT42	861	0.0	Proteobacteria
ANB5	FN658986.1	<i>Aurantimonas altamirensis</i>	761	0.0	Proteobacteria
ANB6	EU810873.1	Firmicutes bacterium 01QG4	876	0.0	Firmicutes
ANB7	GU932939.1	<i>Bacillus</i> sp. SOK27	887	0.0	Firmicutes
ANB9	EU294142.1	<i>Acinetobacter</i> sp. strain CRF14	845	0.0	Proteobacteria
ANB10	EU294142.1	<i>Acinetobacter</i> sp. strain CRF14	845	0.0	Proteobacteria
ANB11	AY526696.1	<i>Acinetobacter</i> sp. Muzt-E02	856	0.0	Proteobacteria
ANB12	FN811323.1	<i>Paracoccus</i> sp. p1s1	761	0.0	Proteobacteria
ANB13	FN658986.1	<i>Aurantimonas altamirensis</i>	756	0.0	Proteobacteria
ANB14	GU294327.1	<i>Methylobacterium komagatae</i>	758	0.0	Proteobacteria
ANB15	FN658986.1	<i>Aurantimonas altamirensis</i>	765	0.0	Proteobacteria
ANB16	FN658986.1	<i>Aurantimonas altamirensis</i>	765	0.0	Proteobacteria
ANB17	DQ883810.1	<i>Aurantimonas ureilytica</i>	756	0.0	Proteobacteria
ANB18	FN658986.1	<i>Aurantimonas altamirensis</i>	761	0.0	Proteobacteria
ANB19	FN658986.1	<i>Aurantimonas altamirensis</i>	638	9,00E-180	Proteobacteria
ANB20	EF373540.1	<i>Aurantimonas kwangyangensis</i> strain CW5	732	0.0	Proteobacteria
ANB21	FN658986.1	<i>Aurantimonas altamirensis</i>	765	0.0	Proteobacteria
ANB22	FN658986.1	<i>Aurantimonas altamirensis</i>	765	0.0	Proteobacteria
ANB23	HM044352.1	<i>Bacillus</i> sp. ISP5-41-3	883	0.0	Firmicutes
ANB24	AJ746076.1	<i>Mycobacterium</i> sp. MG19	769	0.0	Actinobacteria
ANB27	AJ746101.1	<i>Novosphingobium</i> sp. MG44	754	0.0	Proteobacteria
ANB28	AJ746101.1	<i>Novosphingobium</i> sp. MG44	765	0.0	Proteobacteria

Tabela 11 - Afiliação genética dos isolados de bactérias oxidantes de S, com base no sequenciamento de fragmentos do gene rRNA 16S

(continuação)					
Isolado	Acesso	Descrição	Score	E- value	Filo
ANB29	AJ746101.1	<i>Novosphingobium</i> sp. MG44	765	0.0	Proteobacteria
ANB30	AJ746101.1	<i>Novosphingobium</i> sp. MG44	765	0.0	Proteobacteria
RDP1	GU213502.1	<i>Micrococcus</i> sp. HB241	826	0.0	Actinobacteria
RDP2	GU213502.1	<i>Micrococcus</i> sp. HB241	826	0.0	Actinobacteria
RDP3	GU213502.1	<i>Micrococcus</i> sp. HB241	826	0.0	Actinobacteria
RDP5	HM028665.1	<i>Mycobacterium</i> sp. II_B37	819	0.0	Actinobacteria
RDP6	HM057461.1	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> strain CCBAU 05727	769	0.0	Proteobacteria
RDP7	AJ785572.1	<i>Methylobacterium aquaticum</i> strain GP32	760	0.0	Proteobacteria
RDP8	NR_025631.1	<i>Methylobacterium aquaticum</i> strain GR16 1	750	0.0	Proteobacteria
RDP9	AJ785572.1	<i>Methylobacterium aquaticum</i> strain GP32	695	0.0	Proteobacteria
RDP10	NR_025631.1	<i>Methylobacterium aquaticum</i> strain GR16 1	761	0.0	Proteobacteria
RDP11	AB531473.1	<i>Agromonas</i> sp. S42	749	0.0	Proteobacteria
RDP13	AJ746101.1	<i>Novosphingobium</i> sp. MG44	760	0.0	Proteobacteria
RDP15	AJ746101.1	<i>Novosphingobium</i> sp. MG44	756	0.0	Proteobacteria
RDP16	AJ746101.1	<i>Novosphingobium</i> sp. MG44	756	0.0	Proteobacteria
BRA1	HM032850.1	<i>Bacillus simplex</i> strain R53002	881	0.0	Firmicutes
BRA2	AJ575817.1	<i>Sphingomonas abaci</i> strain C42	760	0.0	Proteobacteria
BRA3	HM032807.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain M530013	885	0.0	Firmicutes
BRAC4	HM054484.1	<i>Bacillus</i> sp. JSM 082107	861	0.0	Firmicutes
RDPC1	GQ891713.1	<i>Novosphingobium capsulatum</i> strain W2 16S	665	0.0	Proteobacteria
RDPC2	HM028665.1	<i>Mycobacterium</i> sp. II_B37	819	0.0	Actinobacteria
RDPC3	HM028665.1	<i>Mycobacterium</i> sp. II_B37	658	0.0	Actinobacteria
RDPC4	HM028665.1	<i>Mycobacterium</i> sp. II_B37	810	0.0	Actinobacteria
RDPC5	HM028665.1	<i>Mycobacterium</i> sp. II_B37	821	0.0	Actinobacteria
ANB1	EU294142.1	<i>Acinetobacter</i> sp. strain CRF14	832	0.0	Proteobacteria

A maior parte dos isolados apresentou capacidade de crescimento no meio de cultura adaptado contendo S^0 , alterando a coloração do indicador de pH (Figura 24) em função da acidificação do meio. Os isolados *Acinetobacter* e *Mycobacterium* apresentaram grande produção de biomassa após 48 horas de incubação à 28 °C. O isolado classificado como *Methylobacterium* apresentou o crescimento mais lento, juntamente com o isolado de *Paracoccus*. Todos os isolados apresentaram capacidade de crescimento oxidando o tiosulfato (MS+tiosulfato, dado não apresentado).

Os isolados também foram avaliados quanto à sua capacidade de crescimento heterotrófico no meio de cultura Ágar-nutriente, contendo triptona e extrato de levedura como fonte de carbono (Figura 25). Todos os isolados conseguiram se desenvolver de maneira adequada e rápida (72 horas de incubação a 28 °C), mostrando que sua capacidade de crescimento quimiolitotrófico é facultativa.

Em um dos únicos trabalhos sobre populações microbianas envolvidas no ciclo do S em solos brasileiros, Pinto e Nahas (2002) utilizaram a técnica do Número Mais Provável (NMP) para avaliar amostras de solo sob floresta integrada e solos cultivados. Foram identificadas, por este método, as presenças de bactérias autotróficas oxidantes de S^0 em pH 5,0 e bactérias heterotróficas oxidantes de tiosulfato, na ordem de 10^5 por grama de solo. Estes grupos corresponderam a apenas 0,1% do total das bactérias presentes. As bactérias autotróficas oxidantes de tiosulfato em pH 5,0 e 7,0 e de S^0 em pH 5,0, bem como as heterotróficas oxidantes de S^0 não foram encontradas. A conclusão dos autores é de que as condições do solo sob pastagem, floresta integrada e eucalipto favoreceram o crescimento das populações de bactérias autotróficas oxidantes de S^0 enquanto que a condição de floresta favoreceu a população de heterotróficos oxidantes de tiosulfato.

No entanto, Chapman (1990) chama a atenção para a falta de confirmação da eficiência da técnica do NMP na enumeração de bactérias oxidantes de S. Segundo o autor, muitos organismos heterotróficos, inclusive fungos e bactérias, possuem a capacidade de oxidação de formas reduzidas de S na ausência de C, levando a geração de falsos positivos na contagem de organismos autotróficos.

Figura 24 - Gêneros putativos dos isolados de bactérias oxidantes de S⁰ e alteração do pH do meio de cultura MS +S⁰ (adaptado de MUKHOPADHYAYA, 2000) + vermelho fenol após 7 dias de incubação a 28 °C

Figura 25 – Gêneros putativos dos isolados de bactérias oxidantes de S^0 e aspecto das colônias em meio de cultura Ágar-Nutriente após 72 horas de incubação (exceto *Methilobactecterium*, incubado por 15 dias) a 28 °C

2.3.6 Encapsulamento de bactérias oxidantes de S⁰ e ensaios de inoculação

2.3.6.1 Ensaio piloto de encapsulamento das bactérias oxidantes de S⁰

Como já citado anteriormente, o processo de oxidação do S⁰ é afetado pela composição da comunidade microbiana do solo e pelo tamanho da sua partícula (WAINWRIGHT, 1984). A aplicação de partículas pequenas de S⁰ no campo é difícil em função da deriva causada pelo vento, além de dificultar o acesso aos microrganismos pela difícil homogeneização (GERMIDA; JANZEN, 1993). Por outro lado, a utilização de partículas maiores ou do S⁰ associado a outras formas de dispersão reduzem a área de contato e consequentemente a taxa de oxidação (BOSWELL; FRIESEN, 1993; BOSWELL; SWANNEY; BRAITHWAITE, 1996).

Uma alternativa é aplicar a bactéria oxidante do enxofre junto com partículas pequenas de S⁰ em um mesmo grão, facilitando o acesso do microrganismo e proporcionando oxidação máxima.

Micro-esferas de alginato podem ser utilizadas no carreamento de drogas anti-tuberculose (QURRAT-UL-AIN et al., 2003; AHMAD et al., 2005), liberação de bactérias probióticas (LI et al., 2008) rações animais (ROSS; GUSILS; GONZALEZ, 2008), degradação de poluentes, como a Atrazina (VANCOV; JURY; VAN ZWIETEN, 2005), como biofertilizantes na promoção do crescimento de plantas (BASHAN, 1986) e solubilização de fosfato no solo (LIU; WU; CHANG, 2008).

Em relação às bactérias oxidantes do S⁰, Curutchet et al., (2001) descreveram o encapsulamento em matriz de alginato de *Acidithiobacillus ferrooxidans* com a finalidade de produção de ácido sulfúrico, em reatores, para utilização em biomineração.

Devido à falta de informação sobre o comportamento de bactérias oxidantes do S⁰ encapsuladas em alginato no solo, optou-se por realizar um experimento de curta duração (14 dias) em microcosmos usando areia lavada e autoclavada para melhor controle das variáveis. Um isolado do solo de Anhembi (ANB9, similaridade com *Acinetobacter sp.*) e um isolados do solo de Rondonópolis (RDP5, similaridade com

Mycobacterium sp) foram escolhidos pelo seu rápido crescimento e acidificação do pH *in vitro*.

O isolado FG01 de *A. thiooxidans* (GARCIA JR., 1991) também foi encapsulado e utilizado nos experimentos de inoculação.

Como resultado, o tratamento contendo *Acidithiobacillus thiooxidans* encapsulado com S⁰ (T6) apresentou a maior acidificação do pH após 7 e 14 dias de incubação. O pH foi reduzido de 6,7 para 2,9 após 7 dias de incubação e 2,8 após 14 dias (Figura 26).

O tratamento 4, contendo o isolado RDP5 +S⁰, apresentou acidificação média significativa ($p<0,05$) quando comparado ao seu controle negativo mas numa escala muito menor, reduzindo o pH de 6,7 para 6,3 após 14 dias (Figura 26).

A quantidade de sulfato produzida pelo tratamento contendo a bactéria *Acidithiobacillus thiooxidans* foi de 1036 e 1125 mg SO₄²⁻ dm⁻³ após 7 e 14 dias de incubação. A quantidade de sulfato produzida pelo isolado RDP5 (T4) foi de 51 e 76 mg SO₄²⁻ dm⁻³ e do isolado ANB9 (T3) 19 e 30 mg SO₄²⁻ dm⁻³ após 7 e 14 dias, respectivamente (Figura 27). Embora em uma escala muito menor, o incremento em sulfato pelos tratamentos T3 e T4 quando comparados ao controle negativo (T2) foi de 111% e 430%, respectivamente, sendo estatisticamente significativo ao nível de probabilidade de 5%.

A acidificação expressiva do pH e a enorme quantidade de sulfato produzida em tão pouco tempo mostra a grande capacidade da bactéria *A. thiooxidans* em oxidar o S⁰. A taxa de oxidação calculada com base na recuperação do SO₄²⁻ do tratamento levando essa espécie foi de 48 µg S cm⁻² dia⁻¹ após 7 dias e 26 µg S cm⁻² dia⁻¹ após 14 dias. A taxa de oxidação dos isolados RDP5 e ANB9 foi de 1,4 e 0,4 µg S cm⁻² dia⁻¹ após os mesmos 14 dias, respectivamente (Figura 28).

Essa alta taxa de oxidação do *A. thiooxidans* (T6) resultou na oxidação total de quase 7% do S⁰ aplicado em apenas 14 dias, enquanto que o isolado RDP5 (T4) conseguiu oxidar 0,4% e o isolado ANB9 (T3) apenas 0,1% do S⁰ total aplicado (Figura 29).

A comparação da capacidade de oxidação do tiosulfato e do S⁰ entre *Acidithiobacillus thiooxidans* e duas bactérias heterotróficas classificadas como

Micrococcus foi testada em solo autoclavado por Pepper e Miller (1978). Os autores mostraram que os dois isolados heterotróficos foram capazes de produzir sulfato a partir da oxidação de tiosulfato e S^0 , nas duas condições, sendo estimulados pela adição de 2% de glicose. Um dos isolados apresentou quantidade de sulfato equivalente a produzida pelo *A. thiooxidans* no solo autoclavado, demonstrando segundo eles, a importância de organismos heterotróficos na oxidação do S em condições de pH neutros ou alcalinos.

Figura 26 - Valores de pH em CaCl₂ 0,01M do solo dos microcosmos. T1 - Areia lavada sem a adição das micro-esferas. T2 - Micro-esferas de alginato compostas de meio MS (MUKHOPADHYAYA, 2000) + 10 g S⁰ kg solo⁻¹. T3 e T4 idem T3 acrescidos dos isolados bacterianos ANB9 e RDP5 respectivamente. T5 - Micro-esferas de alginato compostas de meio 9K + 10 g S⁰ kg solo⁻¹ e T6 idem T5 acrescido de *Acidithiobacillus thiooxidans*. Os microcosmos foram incubados a 28°C durante 7 e 14 dias. Os valores são referentes à média de quatro repetições ± desvio padrão. Coeficiente de Variação (CV) = 0,88%

Figura 27 - Concentração de SO_4^{2-} do solo dos microcosmos. T1 - Areia lavada sem a adição das micro-esferas. T2 – Micro-esferas de alginato compostas de meio MS (MUKHOPADHYAYA, 2000) + $10 \text{ g S}^0 \text{ kg solo}^{-1}$. T3 e T4 idem T3 acrescidos dos isolados bacterianos ANB9 e RDP5 respectivamente. T5 – Micro-esferas de alginato compostas de meio 9K + $10 \text{ g S}^0 \text{ kg solo}^{-1}$ e T6 idem T5 acrescido de *Acidithiobacillus thiooxidans*. Os microcosmos foram incubados a 28°C durante 7 e 14 dias. Os valores são referentes à média de quatro repetições $\pm$ desvio padrão. Coeficiente de Variação (CV) = 5,17%

Figura 28 - Taxa de oxidação do S^0 ($\mu\text{g S cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$) calculada com base na média da concentração de SO_4^{2-} (JANZEN; BETTANY, 1987). T1 - Areia lavada sem a adição das micro-esferas. T2 – Micro-esferas de alginato compostas de meio MS (MUKHOPADHYAYA, 2000) + $10 \text{ g S}^0 \text{ kg solo}^{-1}$. T3 e T4 idem T3 acrescidos dos isolados bacterianos ANB9 e RDP5 respectivamente. T5 – Micro-esferas de alginato compostas de meio 9K + $10 \text{ g S}^0 \text{ kg solo}^{-1}$ e T6 idem T5 acrescido de *Acidithiobacillus thiooxidans*. Os microcosmos foram incubados a 28°C durante 7 e 14 dias

Figura 29 – Percentual médio de S^0 oxidado nos microcosmos. T1 - Areia lavada sem a adição das micro-esferas. T2 – Micro-esferas de alginato compostas de meio MS (MUKHOPADHYAYA, 2000) + 10 g S^0 kg solo⁻¹. T3 e T4 idem T3 acrescidos dos isolados bacterianos ANB9 e RDP5 respectivamente. T5 – Micro-esferas de alginato compostas de meio 9K + 10 g S^0 kg solo⁻¹ e T6 idem T5 acrescido de *Acidithiobacillus thiooxidans*. Os microcosmos foram incubados a 28°C durante 7 e 14 dias

2.3.6.2 Inoculação de micro-esferas contendo bactérias oxidantes de S^0 em solo

Comprovada a eficiência da técnica de encapsulamento das bactérias oxidantes de S^0 em matriz de alginato, testadas em areia durante o ensaio piloto, um experimento utilizando os solos de Anhembi e Brasília, com período de incubação mais longo, foi realizado. O solo de Rondonópolis não foi utilizado por apresentar um comportamento da oxidação do S^0 parecido com o solo de Anhembi.

Aproveitando a grande quantidade de sulfato produzido pelas esferas contendo *A. thiooxidans*, uma nova versão do biofertilizante contendo S^0 e rocha fosfática foi desenvolvida. A adição de rocha fosfática aos outros isolados de bactérias oxidantes de S^0 também foi testada (Figura 30).

Assim como no experimento em areia lavada, os tratamentos contendo a bactéria *A. thiooxidans* encapsulado nas micro-esferas + S^0 (T2) e contendo *A. thiooxidans* + S^0 + Fosfato de Araxá (T4) foram os que apresentaram a maior acidificação do pH nos dois solos avaliados. Após 54 dias de incubação, o pH foi reduzido de 3,8 para 1,8 no solo mais arenoso (ANB) e de 4,5 para 3,8 no solo argiloso (BRA) no tratamento 2. Já no T4, como parte do ácido sulfúrico foi utilizado na solubilização da rocha fosfática, o pH caiu de 4 para 3 no solo ANB e de 4,6 para 4,1 no solo BRA após 54 dias de incubação. A alteração do pH pelos demais tratamentos foi pouco percebida após os 54 dias de incubação (Figuras 31 e 32).

Figura 30 - Desenvolvimento de micro-esferas de alginato para o encapsulamento de bactérias oxidantes do S^0 . A – Micro-esferas contendo 10 g kg^{-1} de S^0 . B – Tamanho médio das micro-esferas contendo apenas S^0 (3 mm). C - Micro-esferas contendo 5 g kg^{-1} de S^0 + 50 g kg^{-1} de Apatita de Araxá (35% de P_2O_5). D – Tamanho médio das micro-esferas contendo apenas S^0 + Apatita de Araxá (3 mm). E – Inoculação das micro-esferas em microcosmo contendo 50 g de solo de Anhembi. F - Inoculação das micro-esferas em microcosmo contendo 50 g de solo de Brasília

Figura 31 - Valores de pH em CaCl_2 0,01M dos microcosmos com solo de Anhembi acrescidos de micro-esferas sob diferentes tratamentos. Tratamentos T1, T2, T5, T6 e T6 receberam dose de $10 \text{ g S}^0 \text{ kg}^{-1}$ de solo. Tratamentos T3, T4, T8, T9 e T10 receberam dose de $5 \text{ g S}^0 \text{ kg}^{-1}$ de solo + 50 g kg^{-1} de Fosfato de Araxá (35% de P_2O_5). Os microcosmos foram incubados a 28°C durante 0, 6, 22, 38 e 54 dias. Os valores são referentes à média de três repetições $\pm$ desvio padrão

Figura 32 - Valores de pH em CaCl_2 0,01M dos microcosmos com solo de Brasília acrescidos de microesferas sob diferentes tratamentos. Tratamentos T1, T2, T5, T6 e T6 receberam dose de $10 \text{ g S}^0 \text{ kg}^{-1}$ de solo. Tratamentos T3, T4, T8, T9 e T10 receberam dose de $5 \text{ g S}^0 \text{ kg}^{-1}$ de solo + 50 g kg^{-1} de Fosfato de Araxá (35% de P_2O_5). Os microcosmos foram incubados a 28°C durante 0, 6, 22, 38 e 54 dias. Os valores são referentes à média de três repetições $\pm$ desvio padrão

O teor de argila do solo apresentou efeito inversamente proporcional à oxidação do S^0 . A quantidade de SO_4^{2-} recuperada no tratamento contendo *A. thiooxidans* + S^0 (T2) no solo de textura argilosa (BRA) foi 3 vezes menor do que no solo de textura arenosa (RDP) após 54 dias de incubação. A quantidade de sulfato neste tratamento apresentou um comportamento linear atingindo 4247 mg de SO_4^{2-} dm^{-3} e 1269 mg de SO_4^{2-} dm^{-3} nos solos ANB e BRA, após 54 dias de incubação. Nos tratamentos contendo os isolados ANB9 + S^0 (T6) e RDP5 + S^0 (T7) a quantidade de sulfato recuperada após 54 dias de incubação foi de 88 e 40 mg de SO_4^{2-} dm^{-3} no solo ANB e 52 e 16 mg de SO_4^{2-} dm^{-3} no solo BRA, respectivamente. Mesmo na presença da rocha fosfática a quantidade de sulfato produzida no tratamento 4 ainda foi muito elevada, sendo recuperado 486 mg de SO_4^{2-} dm^{-3} no solo RDP e 699 mg de SO_4^{2-} dm^{-3} no solo BRA (Figuras 33 e 34).

A taxa de oxidação do tratamento 2 (*A. thiooxidans* + S^0) na amostra ANB foi crescente até o trigésimo oitavo dia, atingindo a taxa máxima de 34 $\mu g S cm^{-2} dia^{-1}$ e a taxa final após 54 dias de 28,5 $\mu g S cm^{-2} dia^{-1}$. Já na amostra de Brasília a taxa de oxidação iniciou em 22 $\mu g S cm^{-2} dia^{-1}$ aos 6 dias, caiu no vigésimo segundo dia e terminou em 12,7 $\mu g S cm^{-2} dia^{-1}$ ao final do período de incubação. No outro tratamento com *A. thiooxidans* + S^0 + Apatita de Araxá (T4) a taxa de oxidação foi praticamente constante no solo ANB, terminando em 6,2 $\mu g S cm^{-2} dia^{-1}$ e crescente no solo BRA, terminando em 14,7 $\mu g S cm^{-2} dia^{-1}$ após 54 dias de incubação. No caso dos isolados, maiores taxas de oxidação foram observadas nos tratamentos contendo a rocha fosfática (T9 e T10) e no solo de Brasília, sendo elas 5,0 e 3,0 $\mu g S cm^{-2} dia^{-1}$ respectivamente (Figuras 35 e 36).

A quantidade máxima de S^0 oxidada foi de 30% do S^0 aplicado no início do experimento, realizada pelo tratamento com *A. thiooxidans* + S^0 após 54 dias de incubação no solo ANB (Figuras 37 e 38).

Figura 33 - Concentração de sulfato (SO_4^{2-}) determinado pelo método turbidimétrico dos microcosmos com solo de Anhembi, acrescidos de micro-esferas sob diferentes tratamentos. Tratamentos T1, T2, T5, T6 e T6 receberam dose de $10 \text{ g S}^0 \text{ kg}^{-1}$ de solo. Tratamentos T3, T4, T8, T9 e T10 receberam dose de $5 \text{ g S}^0 \text{ kg}^{-1}$ de solo + 50 g kg^{-1} de Fosfato de Araxá (35% de P_2O_5). Os microcosmos foram incubados a 28°C durante 0, 6, 22, 38 e 54 dias. Os valores são referentes à média de três repetições $\pm$ desvio padrão

Figura 34 - Concentração de sulfato (SO_4^{2-}) determinado pelo método turbidimétrico dos microcosmos com solo de Brasília, acrescidos de micro-esferas sob diferentes tratamentos. Tratamentos T1, T2, T5, T6 e T6 receberam dose de $10 \text{ g S}^0 \text{ kg}^{-1}$ de solo. Tratamentos T3, T4, T8, T9 e T10 receberam dose de $5 \text{ g S}^0 \text{ kg}^{-1}$ de solo + 50 g kg^{-1} de Fosfato de Araxá (35% de P_2O_5). Os microcosmos foram incubados a 28°C durante 0, 6, 22, 38 e 54 dias. Os valores são referentes à média de três repetições $\pm$ desvio padrão

Figura 35 - Taxa de oxidação do S^0 ($\mu\text{g S cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$) calculada com base na média da concentração de SO_4^{2-} (JANZEN; BETTANY, 1987) dos microcosmos com solo de Anhembi, acrescidos de micro-esferas sob diferentes tratamentos. Tratamentos T1, T2, T5, T6 e T6 receberam dose de $10 \text{ g S}^0 \text{ kg}^{-1}$ de solo. Tratamentos T3, T4, T8, T9 e T10 receberam dose de $5 \text{ g S}^0 \text{ kg}^{-1}$ de solo + 50 g kg^{-1} de Fosfato de Araxá (35% de P_2O_5). Os microcosmos foram incubados a 28°C durante 0, 6, 22, 38 e 54 dias

Figura 36 - Taxa de oxidação do S^0 (ug S cm⁻² dia⁻¹) calculada com base na média da concentração de SO_4^{2-} (JANZEN; BETTANY, 1987) dos microcosmos com solo de Brasília, acrescidos de micro-esferas sob diferentes tratamentos. Tratamentos T1, T2, T5, T6 e T6 receberam dose de 10 g S^0 kg⁻¹ de solo. Tratamentos T3, T4, T8, T9 e T10 receberam dose de 5 g S^0 kg⁻¹ de solo + 50 g kg⁻¹ de Fosfato de Araxá (35% de P_2O_5). Os microcosmos foram incubados a 28°C durante 0, 6, 22, 38 e 54 dias

Figura 37 - Percentual de S^0 oxidado nos microcosmos com solo de Anhembi, acrescidos de microesferas sob diferentes tratamentos. Tratamentos T1, T2, T5, T6 e T6 receberam dose de 10 g S^0 kg⁻¹ de solo. Tratamentos T3, T4, T8, T9 e T10 receberam dose de 5 g S^0 kg⁻¹ de solo + 50 g kg⁻¹ de Fosfato de Araxá (35% de P_2O_5). Os microcosmos foram incubados a 28°C durante 0, 6, 22, 38 e 54 dias

Figura 38 - Percentual de S^0 oxidado nos microcosmos com solo de Brasília, acrescidos de micro-esferas sob diferentes tratamentos. Tratamentos T1, T2, T5, T6 e T6 receberam dose de $10 \text{ g } S^0 \text{ kg}^{-1}$ de solo. Tratamentos T3, T4, T8, T9 e T10 receberam dose de $5 \text{ g } S^0 \text{ kg}^{-1}$ de solo + 50 g kg^{-1} de Fosfato de Araxá (35% de P_2O_5). Os microcosmos foram incubados a 28°C durante 0, 6, 22, 38 e 54 dias

O tratamento contendo o isolado de *A. thiooxidans* +S⁰ + Apatita de Araxá (T4) foi o que apresentou a maior quantidade de fósforo solúvel, 447 mg dm⁻³ no solo ANB e 161 mg dm⁻³ no solo BRA, após 54 dias de incubação, ou 15 e 7,5 vezes maior do que o controle não inoculado (T3) nos solos RDP e BRA, respectivamente (Figura 39 e 40).

A quantidade equivalente calculada em mg de P₂O₅ kg⁻¹ de solo foi 320 para o solo ANB e 172 para o BRA.

A quantidade de P solúvel no solo de Anhembi foi praticamente a mesma entre os isolados ANB9, RDP5 e o controle negativo, próxima a 35 mg de P dm⁻³ (Figuras 39).

Já no solo de Brasília o tratamento contendo o isolado ANB9 +S⁰ + Apatita de Araxá (T9) apresentou 71 mg de P dm⁻³ (e 40) ou 1,8 x mais do que o controle negativo. Mais uma vez o isolado RDP5 não apresentou diferenças significativas na quantidade de P em relação ao controle negativo.

Figura 39 - Concentração de Fósforo determinado pelo método resina dos microcosmos com solo de Anhembi, acrescidos de micro-esferas sob diferentes tratamentos. Tratamentos T1, T2, T5, T6 e T6 receberam dose de 10 g S⁰ kg⁻¹ de solo. Tratamentos T3, T4, T8, T9 e T10 receberam dose de 5 g S⁰ kg⁻¹ de solo + 50 g kg⁻¹ de Fosfato de Araxá (35% de P₂O₅). Os microcosmos foram incubados a 28°C durante 0, 6, 22, 38 e 54 dias. Os valores são referentes à média de três repetições ± desvio padrão

Figura 40 - Concentração de Fósforo determinado pelo método resina dos microcosmos com solo de Anhembi, acrescidos de micro-esferas sob diferentes tratamentos. Tratamentos T1, T2, T5, T6 e T6 receberam dose de 10 g S⁰ kg⁻¹ de solo. Tratamentos T3, T4, T8, T9 e T10 receberam dose de 5 g S⁰ kg⁻¹ de solo + 50 g kg⁻¹ de Fosfato de Araxá (35% de P₂O₅). Os microcosmos foram incubados a 28°C durante 0, 6, 22, 38 e 54 dias. Os valores são referentes à média de três repetições ± desvio padrão

O experimento de inoculação dos solos deixou evidente a diferença da capacidade de oxidação do S^0 da bactéria quimiolitotrófica obrigatória *A. thiooxidans* em relação aos isolados de bactérias oxidantes de S^0 heterotróficos facultativos apresentando similaridade com a Proteobacteria *Acinetobacter* (ANB9) e a Actinobacteria *Mycobacterium* (RDP5).

A média da taxa de oxidação nos solos de Anhembi e Brasília determinada após 54 dias de incubação após a aplicação de $10 \text{ g } S^0 \text{ kg solo}^{-1}$ no primeiro experimento em microcosmos foi de 2,3 e $1,9 \mu\text{g S cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$, respectivamente. A inoculação dos mesmos solos, sob as mesmas condições com o *A. thiooxidans* elevou a taxa de oxidação no solo de Anhembi para $28,5 \mu\text{g S cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ e a do solo de Brasília para $12,7 \mu\text{g S cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$, proporcionando um aumento acima de 12 vezes e de 6,7 vezes na taxa de oxidação nesses solos, respectivamente. Mesmo assim, a taxa de oxidação observada ainda é abaixo das descritas em solos australianos e neozelandeses, entre 48 e $76 \mu\text{g } S^0 \text{ cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ após 70 dias de incubação, onde *A. thiooxidans* foi descrita como a principal oxidante de S^0 (LEE et al., 1987; WATKINSON, 1989) e $54 \mu\text{g } S^0 \text{ cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ descrita por Blair (1987).

Por outro lado, a taxa de oxidação do S^0 nos solos obtida com a inoculação dos isolados heterotróficos facultativos ANB9 (T6) e RDP5 (T7) foi menor do que a taxa apresentada nos solos ANB e BRA incubados apenas com o S^0 durante o mesmo período no experimento inicial.

Robertson e Kuenen (2006a) relatam que, na Austrália, *Thiobacillus* acidófilos são escassos em áreas deficientes em enxofre. Os autores comentam que a contribuição de organismos mixotróficos e heterotróficos para o processo de oxidação de compostos reduzidos de S pode ser igualmente importante em condições ambientais particulares. Em ambientes de água doce, as espécies versáteis (mixotróficos) são favorecidas quando a quantidade de compostos orgânicos é equivalente à quantidade de compostos inorgânicos. Quando há um domínio da quantidade de substâncias inorgânicas no ambiente, os organismos autotróficos obrigatórios são favorecidos, assim como os microrganismos heterotróficos são favorecidos quando há o domínio de substratos orgânicos.

No caso dos solos estudados neste trabalho, não foi determinada a presença de S^0 na condição natural pela metodologia aplicada, além de não existir o histórico de aplicação de S^0 na área coletada.

A adição de S^0 causou alterações na estrutura das comunidades microbianas presentes no solo e resultou na sua oxidação, determinada pelo aumento da quantidade de sulfato e redução do pH.

A presença de *A. thiooxidans* não foi observada pela utilização de ferramentas moleculares, tanto pela amplificação utilizando iniciadores específicos, bem como, pelo sequenciamento de bibliotecas de clones de fragmentos do gene rRNA 16S. Tampouco foi possível isolar esta espécie, mesmo com a utilização de meio de cultura específico.

O sequenciamento das bibliotecas de clones de fragmentos do gene rRNA 16S provenientes das amostras de solo tratadas com S^0 apontou o possível envolvimento de bactérias dos filos Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria no processo de oxidação do enxofre. Bactérias do gêneros *Dyella* e *Alycyclobacillus* podem ter papel importante na oxidação do S^0 em solos argilosos e arenosos, respectivamente.

Ainda existe uma grande lacuna na possível participação de arqueias na oxidação de formas reduzidas de S em ambientes não extremos, evidenciada pela falta de informações nos bancos de dados para comparação.

A utilização da técnica de cultivo em meios de cultura seletivos sugere pequenas populações de bactérias oxidantes de formas reduzidas de S nos solos estudados, sendo a maior parte delas isoladas em meio de cultura contendo tiosulfato como fonte de S. Após o sequenciamento parcial do gene rRNA 16S dos 50 isolados, 68%, 18% e 14% deles foram classificados como Proteobacteria, Actinobacteria e Firmicutes, respectivamente. Os principais gêneros isolados foram *Aurantimonas*, *Acinetobacter*, *Novosphingobium*, *Methylobacterium*, *Paracoccus*, *Mycobacterium*, *Micrococcus* e *Bacillus*. Além da capacidade de oxidação do S mostrada pelo cultivo em meio mineral, todos os isolados tiveram capacidade de sobreviver heterotroficamente em meio de cultura contendo fonte de carbono orgânico.

A inoculação dos solos ANB e BRA com a espécie *A. thiooxidans* encapsulado em micro-esferas de alginato elevou a taxa de oxidação do S^0 nos solos, produziu uma

enorme quantidade de sulfato e reduziu o pH para valores muito baixos, próximos aos valores ótimos para o desenvolvimento da bactéria. O fosfato de Araxá foi solubilizado pelo ácido sulfúrico produzido por *A. thiooxidans* nas micro-esferas.

A inoculação dos mesmos solos com os isolados heterotróficos facultativos apresentando similaridade com *Acinetobacter* e *Mycobacterium*, resultou numa baixa taxa de oxidação do S^0 , comparativamente ao tratamento com *A. thiooxidans*, pequena alteração o pH, mas quantidades de SO_4^{2-} adequadas do ponto de vista da fertilidade dos solos.

Os resultados obtidos sugerem que *A. thiooxidans* não foi a responsável pela oxidação microbiológica do S^0 nas amostras de solo de Anhembi, SP, Brasília, DF e Rondonópolis, MT.

Do ponto de vista agrônomo, uma liberação menor e mais regular de sulfato e fosfato ao longo do ciclo da cultura, como observado no solo com a inoculação de bactérias heterotróficas facultativas ou mixotróficas, pode ser mais vantajosa do que uma liberação rápida, como observado no solo inoculado com *A. thiooxidans*. A acidificação do solo causada pela atividade do *A. thiooxidans* pode resultar na indisponibilidade de alguns nutrientes como o cálcio e magnésio, aumento do alumínio tóxico e a lixiviação de SO_4^{2-} . Novos esforços devem ser realizados para o isolamento de uma maior diversidade de bactérias heterotróficas facultativas ou quimiolitotróficas com taxas de oxidação do S^0 compatíveis com as demandas das culturas agrícolas.

3 CONCLUSÕES

Os baixos níveis de oxidação do S^0 observados nos solos brasileiros estudados após a incubação com S^0 , são provavelmente decorrentes da pequena quantidade de bactérias eficientes na oxidação de formas reduzidas de S. Os métodos moleculares e dependentes de cultivo não identificaram a presença da espécie *A. thiooxidans*, uma das mais eficientes conhecidas na oxidação de S^0 nos solos estudadas.

Este é provavelmente o primeiro trabalho realizado no Brasil e talvez um dos poucos no mundo a utilizar técnicas moleculares independentes de cultivo para a avaliação de alterações na estrutura das comunidades e diversidade bacterianas e de arqueias em solos tratados com S^0 .

A inoculação dos solos com micro-esferas contendo *A. thiooxidans* elevou significativamente a taxa de oxidação de S^0 , em concordância com a literatura, além de permitir a solubilização de rocha fosfática. A inoculação dos solos com os outros isolados manteve a taxa de oxidação a níveis mais baixos, mostrando que provavelmente os mesmos não sejam organismos especializados nessa função, sendo a oxidação do S^0 um complemento para o seu metabolismo.

Entretanto a rápida e grande produção de sulfato e acidificação do solo causada pelo *A. thiooxidans* nos deixa em dúvida sobre sua real vantagem agronômica, sendo talvez mais vantajosa a utilização de um isolado com taxa de oxidação menor e constante ao longo do ciclo das culturas.

O protótipo para um novo biofertilizante para suprir SO_4^{2-} e P foi desenvolvido com sucesso, devendo ser testado na presença de plantas e em condições de campo para determinar sua eficiência agronômica.

REFERÊNCIAS

ADAMCZYK-WINIARSKA, Z.; KRÓL, M.; KOBUS, J. Microbial oxidation of elemental sulphur in brown soil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 43, p. 95-100, 1975.

AHMAD, Z.; ZAHOOOR, A.; SHARMA, S.; KHULLER, G.K. Inhalable alginate nanoparticles as antitubercular drug carriers against experimental tuberculosis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 26, n. 4, p. 298-303, 2005.

ALBUQUERQUE, G.A.S.C. de; AZAMBUJA, R.S.L; LINS, F.A.F. Agrominerais – Enxofre. In: LUZ, A.B. da; LINS, F.A.F. **Rochas:minerais industriais: uso e especificações**. 2. ed. Rio de Janeiro: Centro de Tecnologia Mineral – CETEM, 2008. p. 577-590.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. "Basic local alignment search tool." **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 215, p. 403-410, 1990.

ANANDHAM, R.; INDIRAGANDHI, P.; MADHAIYAN, M.; RYU, K.Y.; JEE, H.J.; SA, T.M. Chemolithoautotrophic oxidation of thiosulfate and phylogenetic distribution of sulfur oxidation gene (*soxB*) in rhizobacteria isolated from crop plants. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 159, p. 579-589, 2008.

ANANDHAM, R.; INDIRAGANDHI, P.; MADHAIYAN, M.; CHUNG, J.; RYU, K.; JEE, H.; SA, T. Thiosulfate Oxidation and mixotrophic growth of *Methylobacterium goesingense* and *Methylobacterium fujisawaense*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 19, p. 17-22, 2009.

ANANDHAM, R.; INDIRAGANDHI, P.; MADHAIYAN, M.; KIM, K.; YIM, W.; SARAVANAN, V.S.; CHUNG, J.; SA, T. Thiosulfate oxidation and mixotrophic growth of *Methylobacterium oryzae*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, p. 869–876, 2007.

ANANDHAM, R.; KWON, S.W.; INDIRA GANDHI, P.; KIM, S.J.; WEON, H.Y.; KIM, Y.S.; SA, T.M.; KIM, Y.K.; JEE, H.J. *Dyella thiooxydans* sp. nov., a facultative chemolithotrophic thiosulfate oxidizing bacterium isolated from rhizosphere soil of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, 2010a. In press.

ANANDHAM, R.; WEON, H.Y.; KIM, S.J.; KIM, Y.S.; KIM, B.Y.; KWON, S.W. *Acinetobacter brisouii* sp. nov., isolated from a wetland in Korea. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 48, p. 36-39, 2010b.

AUGUET, J.C.; BARBERAN, A.; CASAMAYOR, E.O. Global ecological patterns in uncultured Archaea. **The ISME Journal**, London, v. 4, p. 182-90, 2010.

BAGCHI, A.; ROY, P. Structural insight into SoxC and SoxD interaction and their role in electron transport process in the novel global sulfur cycle in *Paracoccus pantotrophus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 33, p. 1107-13, 2005.

BALDENSPERGER, J. Use of respirometry to evaluate sulphur oxidation in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 8, p. 423-427, 1976.

BARROW, N.J. Determination of elemental sulphur in soils. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 19, p. 454-456, 1968.

BARROW, N.J. Note on incomplete extraction of elemental sulphur from wet soil by chloroform. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 21, p. 439-440, 1970.

BASHAN, Y. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 51, p. 1089-1098, 1986.

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**, London, p. 1-10, 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/ismej/journal/vaop/ncurrent/abs/ismej2010171a.html>>. Acesso em: 8 dez. 2010.

BEIJERINCK, M. Phenomenes de reduction produits par les microbes. **Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles** (Section 2), La Haye, v. 9, p. 131-157, 1904.

BELLY, R.T.; BROCK, T.D. Ecology of iron-oxidizing bacteria in pyritic materials associated with coal. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 17, p. 726-732, 1974.

BESHARATI, H.; ATASHNAMA, K.; HATAMI, S. Biosuper as a phosphate fertilizer in a calcareous soil with low available phosphorus. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 6, p. 1325-1329, 2007.

BLAIR, G.J. International Symposium Elemental Sulfur in Agriculture, 1987. Nice. **Proceedings**. Nice: Syndicat Français du Soufre, 1987. v. 2. p. 483-91.

BLAIR, G.J.; LEFROY, R.B.; DANA, M.; ANDERSON, G.C. Modelling of sulfur oxidation from elemental sulfur. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 155-156, p. 379-382, 1993.

- BOSWELL, C.C.; SWANNEY, B.; BRAITHWAITE, A.C. The effects of different manufacturing techniques on the availability of sulfate to pasture from mixtures of elemental sulfur with either triple superphosphate or partially acidulated reactive phosphate rock. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Wageningen, v. 44, p. 255-263, 1996.
- BOSWELL, C.C.; FRIESEN, D.K. Elemental sulfur fertilizers and their use on crops and pastures. **Fertilizer Research**, Wageningen, v. 35, p. 127-149, 1993.
- BURTON, E.D. Iron-monosulfide oxidation in natural sediments: resolving microbially mediated S transformations using XANES, electron microscopy, and selective extractions. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 43, p. 3128-34, 2009.
- CANTERELLA, H.; PROCHNOW, L.I. Determinação de sulfato em solos. In: VAN RAIJ, B.; ANDRADE, J.C. de; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas – IAC, 2001. cap. 14. p. 225-230.
- CHAO, A.; SHEN, T.J. **Program SPADE (Species Prediction and Diversity Estimation)**. User's guide for program Spade (Species Prediction and Diversity Estimation), Disponível em: <http://chao.stat.nthu.edu.tw/spade_userguide.pdf>. 2003-2008. Acesso em: 07 dez. 2010.
- CHAO, A.; SHEN, T.J. Nonparametric estimation of Shannon's index of diversity when there are unseen species in sample. **Environmental and Ecologic Statistics**, London, v.10, p.429-443, 2003.
- CHAPMAN, S.J. *Thiobacillus* populations in some agricultural soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 22, p. 479-482, 1990.
- CLARCK, P.; LESAGE, K.L.D. Quantitative determination of elemental sulfur in hydrocarbons, soils, and other materials. **Journal of Chromatographic Science**, Evaston, v. 27, p. 259– 326, 1989.
- COLE, J.R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; MCGARRELL, D.M.; MARSH, T.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, M.J. The Ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 37, (Database issue): D141-D145, 2009.
- COLMER, A.R.; TEMPLE, K.L.; KINCKLE, M.E. An iron-oxidizing bacterium from the acidic drainage of some bituminous coal mine. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 59, p. 317-328, 1950.
- CURUTCHET, G.; DONATI, E.; OLIVER, C.; POGLIANI, C.; VIERA, M.R. Development of *Thiobacillus* Biofilms for Metal Recovery. **Methods in Enzymology**, New York, v. 337, p. 171-186, 2001.

CZABAN, J.; KOBUS, J. Oxidation of elemental sulfur by bacteria and fungi in soil. **Acta Microbiologica Polonica**, Warszawa, v. 49, p. 135-47, 2000.

DAM, B.; MANDAL, S.; GHOSH, W.; Das GUPTA, S.K.; ROY, P. The S₄-intermediate pathway for the oxidation of thiosulfate by the chemolithoautotroph *Tetrathibacter kashmirensis* and inhibition of tetrathionate oxidation by sulfite. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 158, p. 330-338, 2007.

DE WULF-DURAND, P.; BRYANT, L.J.; SLY, L.I. PCR-mediated detection of acidophilic, bioleaching-associated bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 2944-2948, 1997.

DEB, C.; STACKEBRANDT, E.; PRADELLA, S.; SAHA, A.; ROY, P. Phylogenetically diverse new sulfur chemolithotrophs of Proteobacteria isolated from Indian soils. **Current Microbiology**, New York, v. 48, p. 452-458, 2004.

DICK, G.; PODELL, S.; JOHNSON, H.; RIVERA-ESPINOZA, Y.; BERNIER-LATMANI, R.; MCCARTHY, J.; TORPEY, J.; CLEMENT, B.; GAASTERLAND, T.; TEBO, B. Genomic insights into Mn(II) oxidation by the marine Alphaproteobacterium *Aurantimonas* sp. strain SI85-9A1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 2646-2658, 2008.

DNADIST. **DNADIST V.3.69 - Program to compute distance matrix from nucleotide sequences**. Washington, 2008. Disponível em: <<http://cmgm.stanford.edu/phylip/dnadist.html>> Acesso em : 08 dez. 2010.

EL-TARABILY, K.A.; SOAUD, A.A.; SALEH, M.E.; MATSUMOTO, S. Isolation and characterization of sulfur-oxidizing bacteria, including strains of *Rhizobium*, from calcareous sandy soils and their effects on nutrient uptake and growth of maize (*Zea mays* L.). **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 57, p. 101-111, 2006.

ERIKSEN, J. Soil sulfur cycling in temperate agricultural systems. In: JEZ, J. **Sulfur: a missing link between soils, crops and nutrition**. Madison, American Society of Agronomy, 2008. chap. 3. p. 25-44.

ERIKSEN, J.; MURPHY, M.D.; SCHNUG, E. The soil sulphur cycle. In: SCHNUG, E. **Sulphur in Agroecosystems**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1998. p. 39-74.

ESCOFFIER, S.; CAYOL, J-L.; OLLIVIER, B.; PATEL, B.K.C.; FARDEAU, M-L.; THOMAS, P.; ROGER, P.A. Identification of thiosulfate- and sulfur-reducing bacteria unable to reduce sulfate in rice field soils. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 37, p. 145-156, 2001.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II error probabilities. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, p. 186-194, 1998.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, Lancaster, v. 39, p. 783-791, 1985.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.

FERRERA, I.; SÁNCHEZ, O.; MAS, J. Characterization of a sulfide-oxidizing biofilm developed in a packed-column reactor. **International Journal of Microbiology**, Nars City, v. 10, p. 29-37, 2007.

FONSECA, D.S.; BACIC, I.R. Enxofre. In: RODRIGUES, A.F. da S. **Economia mineral do Brasil**. 2. ed. Brasília: Departamento Nacional de Produção Mineral – DNPM, 2009. p. 126-141.

FRENEY, J.R. Oxidation of sulphur in soils. **Mineralium Deposita**, Berlin, v. 2, p. 181-187, 1967.

FRIEDRICH, C.G.; BARDISCHEWSKY, F.; ROTHER, D.; QUENTMEIER, A.; FISCHER, J. Prokaryotic sulfur oxidation. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 8, p. 253–259, 2005.

FRIEDRICH, C.G.; ROTHER, D.; BARDISCHEWSKY, F.; QUENTMEIER, A.; FISCHER, J. Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2873–2882, 2001.

GARCIA JR.O. Isolation and purification of the *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 22, p. 1-6, 1991.

GERMIDA, J.J.; JANZEN, H.H. Factors affecting the oxidation of elemental sulfur in soils. **Fertilizer Research**, Wageningen, v. 35, p. 101-114, 1993.

GHOSH, W.; MALLICK, S.; DasGUPTA, S.K. Origin of Sox multienzyme complex system in ancient thermophilic bacteria and coevolution of its constituent proteins. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 160, p. 409-420, 2009.

GHOSH, W.; ROY, P. *Mesorhizobium thiogametum* sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph from rhizosphere soil of an Indian tropical leguminous plant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 91-97, 2006a.

GHOSH, W.; ROY, P. Ubiquitous presence and activity of sulfur-oxidizing lithoautotrophic microorganisms in the rhizospheres of tropical plants. **Current Science**, Bangalore, v. 91, p. 159–161, 2006b.

GHOSH, W.; ROY, P. Chemolithoautotrophic oxidation of thiosulfate and tetrathionate by novel strains of *Azospirillum* and *Pseudoxanthomonas* isolated from the rhizosphere of an Indian tropical leguminous plant. **Current Science**, Bangalore, v. 93, p. 1613–1615, 2007a.

GHOSH, W.; ROY, P. Chemolithoautotrophic oxidation of thiosulfate, tetrathionate and thiocyanate by a novel rhizobacterium belonging to the genus *Paracoccus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 270, p. 124–13, 2007b.

GHOSH, W.; DAM, B. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur-oxidation by taxonomically and ecologically diverse Bacteria and Archaea. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 33, p. 999–1043, 2009.

GHOSH, W.; MANDAL, S.; ROY, P. *Paracoccus bengalensis* sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph from the rhizospheric soil of an Indian tropical leguminous plant. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, p. 396–403, 2006.

GHOSH, W.; MALLICK, S.; GUPTA, S.K.D. Origin of the Sox multienzyme complex system in ancient thermophilic bacteria and coevolution of its constituent proteins **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 160, p. 409–420, 2009.

GHOSH, W.; MALLICK, S.; GUPTA, S.K.D.; PETRI, R.; PODGORSEK, L.; IMHOFF, J.F. Phylogeny and distribution of the *soxB* gene among thiosulfate-oxidizing bacteria, **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 197, p. 171–178, 2001.

GRAFF, A.; STUBNER, S. Isolation and molecular characterization of thiosulfate-oxidizing bacteria from an Italian rice field soil. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 26, p. 445–452, 2003.

GRAYSTON, S.J.; NEVELL, W.; WAINWRIGHT, M. Sulphur oxidation by fungi. **Transactions of the British Mycological Society**. London, v. 87, p. 193–198. 1986.

GUBRY-RANGIN, C.; NICOL, G.W.; PROSSER, J.I. Archaea rather than Bacteria control nitrification in two agricultural acidic soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 74, p. 566–574, 2010.

GUO, X.; YOU, X. Y.; LIU, L. J.; ZHANG, J. Y.; LIU, S. J.; JIANG, C. Y. *Alicyclobacillus aeris* sp. nov., a novel ferrous- and sulfur-oxidizing bacterium isolated from a copper mine. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, p. 2415–2420, 2009.

HART, M.G.R. A turbidimetric method for determining elemental sulfur. **The Analyst**, Cambridge, v. 86, p. 472-475, 1961.

HAVLIN, J.L.; BEATON, J.D.; TISDALE, S.L; NELSON, W.L. **Soil fertility and fertilizers**: an introduction to nutrient management. 7.ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2005. chap. 7. 528p.

HE, Z.; XIAO, S.; XIE, X.; ZHONG, H.; HU, Y.; LI, Q.; GAO, F.; LI, G.; LIU, J.; QIU, G. Molecular diversity of microbial community in acid mine drainages of Yunfu sulfide mine. **Extremophiles**, Berlin, v.7, p.305-14, 2007.

HOROWITZ, N. **Oxidação e eficiência agrônômica do enxofre elementar em solos do Brasil**. 2003. 109p. Tese (Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

HOROWITZ, N.; MEURER, E.J. Oxidação do enxofre elementar em solos tropicais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, p.822-828, 2006.

HURSE, T.J.; ABEYDEERA, W.P.P. Quantification of sulfur and sulfurcontaining compounds in wastewater by means of a combination of liquid chromatographic methods. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 942, p. 201-210, 2002.

IMHOFF, J.F. The phototrophic Alpha-proteobacteria, In: DWORKIN. M; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria**. 3rd.ed. New York. Springer. 2006. v. 5:Proteobacteria: Alpha and Beta subclasses. chap. 3.1.1. p. 41-64.

JANGID, K.; WILLIAMS, M.A.; FRANZLEUBBERS, A.J.; SANDERLIN, J.S.; REEVES, J.H.; JENKINS, M.B.; ENDALE, D.M.; COLEMAN, D.C.; WHITMAN, W. B. Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 2843-2853, 2008.

JANZEN, H.H.; BETTANY, J.R. Measurement of sulfur oxidation in soils. **Soil Science**, Baltimore, v. 143, p. 444-452, 1987.

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

JIANG, C.Y.; LIU, Y.; LIU, Y.Y.; YOU, X.Y.; GUO, X.; LIU, S.J. *Alicyclobacillus ferrooxidans* sp. nov., a novel ferrous-oxidizing bacterium from solfataric soil, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 2898–2903, 2008.

JUKES, T.H.; CANTOR, C.R. Evolution of protein molecules. In: MUNRO, H.N.(Ed.). **Mammalian protein metabolism**. New York: Academic Press, 1969. p. 21-132.

KELLY, D.P.; WOOD, A.P. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designate genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, p. 511-516, 2000.

KELLY, D.P.; WOOD, A.P. The chemolithotrophic prokaryotes. In: DWORKIN. M; FALKOW. S; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria**. 3.ed. New York: Springer, 2006. v. 2: Ecophysiology and biochemistry. chap. 1.15 p. 441-456.

KELLY, D.P.; SHERGILL, J.K.; LU, W.P.; WOOD, A.P. Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 71, p. 95–107, 1997.

KERTESZ, M.A.; MIRLEAU, P. The role of soil microbes in plant sulphur nutrition. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p.1939-1945, 2004.

KERTESZ, M.A.; FELLOWS, E.; SCHMALENBERGER, A. Rhizobacteria and plant sulfur supply. **Advances in Applied Microbiology**, New York, v. 62, p. 235-268, 2007.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v. 16, p. 111-120, 1980.

LAHIRI, C.; MANDAL, S.; GHOSH, W.; DAM, B.; ROY, P. A novel gene cluster *soxSRT* is essential for the chemolithotrophic oxidation of thiosulfate and tetrathionate by *Pseudaminobacter salicylatoxidans* KCT001. **Current Microbiology**, New York, v. 52, p. 267–273, 2006.

LAUREN, N.R.; WATKINSON, J.H. Elemental sulphur analysis using high-performance liquid chromatography on 10-µm rigid polymer particles. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 348, p. 317-320, 1985.

LAWRENCE, J.R.; GERMIDA, J.J. Relationship between microbial biomass and elemental sulfur oxidation in agricultural soil. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 52, p. 672-677, 1988.

LAWRENCE, J.R.; GERMIDA, J.J. Enumeration of sulfur-oxidizing populations in Saskatchewan agricultural soils. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 71, p. 127-136, 1991.

LEE, A.; WATKINSON, J.H.; ORBELL, G.; BAGYARAJ, J.; LAUREN, D.R. Factors influencing dissolution of phosphate rock and oxidation of elemental sulfur in some New Zealand soils. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 30, p. 373-385, 1987.

LEHMANN, J. Atmospheric SO₂ emissions since the late 1800s change organic sulfur forms in humic substance extracts of soils. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 42, p. 3550-3555, 2008.

LI, S.; LIN, B.; ZHOU, W. Effects of previous elemental sulfur application on oxidation of additional applied elemental sulfur in soils. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 42, p. 146-152, 2005.

LI, X.S.; SATO, T.; OOIWA, Y.; KUSUMI, A.; GU, J.D.; KATAYAMA, Y. Oxidation of elemental sulfur by *Fusarium solani* Strain THIF01 Harboring Endobacterium *Bradyrhizobium* sp. **Microbial Ecology**, New York, v. 60, p. 96-104, 2010.

LI, X.Y.; CHEN, X.G.; CHA, D.S.; PARK, H.J.; LIU, C.S. Microencapsulation of a probiotic bacteria with alginate-gelatin and its properties. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 26, p. 315-324, 2008.

LIPMAN, J.G.; McLEAN, H.C.; LINT, H.C. Sulfur oxidation in soils and its effect on the availability of mineral phosphates. **Soil Science**, Baltimore, v. 2, p. 499-538, 1916.

LIU, C.H.; WU, J.Y.; CHANG, J.S. Diffusion characteristics and controlled release of bacterial fertilizers from modified calcium alginate capsules. **Bioresource Technology**, Braking, v. 99, p.1904-1910, 2008.

LOPEZ-AGUIRRE, J.G.; FARIAS-LARIOS, J.; GUZMAN-GONZALEZ, S.; MICHEL-ROSALES, A.; de FREITAS, J.R. Effect of sulfur application on chemical properties and microbial population in a tropical alkaline soil. **Pedobiologia**, Jena, v. 43, p. 183-191, 1999.

MALAKOFF, D. Air pollution. Taking the sting out of acid rain. **Science**, Washington, v. 330, p. 910-911, 2010.

MASSOUMI, A.; CORNFIELD, A.H.A. A rapid method for determining sulphate in water extracts of soils. **The Analyst**, Cambridge, v. 88, p. 321-322, 1963.

MASUDA, S.; EDA, S.; IKEDA, S.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Thiosulfate-dependent chemolithoautotrophic growth of *Bradyrhizobium japonicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, p. 2402-2409, 2010.

McCASKILL, M.R.; BLAIR, G.J. Particle size and soil texture effects on elemental sulfur oxidation. **Agronomy Journal**, Madison, v. 79, p. 1079-1083, 1987.

MCGUIRE, M.M.; HAMERS, R.J. Extraction and quantitative analysis of elemental sulfur from sulfide mineral surfaces by high-performance liquid chromatography. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 34, p. 4651-4655, 2000.

MEYER, B.; IMHOFF, J.F.; KUEVER, J. Molecular analysis of the distribution and phylogeny of the *soxB* gene among sulfur-oxidizing bacteria evolution of the Sox sulfur oxidation enzyme system. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 9, p. 2957-2977, 2007.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2.ed. Lavras:Editora UFLA, 2006. 729p.

MOURA, P.M. de; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E. de R.e S.; DUENHAS, L.H.; G.H. de S.N. Eficiência de biofertilizantes de rochas com *Acidithiobacillus* em melão no vale do São Francisco. **Ciência Agrária**, Recife, v. 2, p. 1-7, 2007.

MUKHOPADHYAYA, P.N.; DEB, C.; LAHIRI, C.; ROY, P. A *soxA* gene, encoding a diheme cytochrome c, and a *sox* locus, essential for sulfur oxidation in a new sulfur lithotrophic bacterium. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, p. 478-487, 2000.

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.

MYERS, R.M.; MANIATIS, T.; LERMAN, L.S. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. **Methods in Enzymology**. New York, v. 155, p. 501-527, 1987.

NEILSEN, D.; HOGUE, E.J.; HOYT, P.B.; DROUGHT, B.G. Oxidation of elemental sulfur and acidulation of calcareous orchard soil in southern British Columbia. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 73, p. 103-114, 1993.

NIELSEN, M.B.; KJELDSEN, K.U.; INGVORSEN, K. *Desulfitibacter alkalitolerans* gen., sp. nov, an anaerobic, alkalitolerant, sulfite-reducing bacterium isolated from a district heating plant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 2831-2836, 2006.

NOR, Y.M.; TABATABAI, M.A. Oxidation of elemental sulfur in soils. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 41, p. 736-741, 1977.

OHIRA, S.I.; TODA, K. Ion chromatographic measurement of sulfide, methanethiolate, sulfite and sulfate in aqueous and air samples **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 1121, p. 280-284, 2006.

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

PACHECO, A. J.; PEÑA, C. J.; MALDONADO V. M. Identification and characterization of sulfur-oxidizing bacteria in an artificial wetland that treats wastewater from a tannery. **International Journal of Phytoremediation**, Boca Raton, v. 10, p. 359-370, 2008.

PARTRIDGE, I.J. The efficacy of biosuper made from different forms of phosphate on forage legumes in Hill Land in Fiji. **Tropical Grasslands**, Sta Lucia, v. 14, p. 87-94, 1980.

PEPPER, I. L.; MILLER, R. H. Comparison of the oxidation of thiosulfate and elemental sulfur by two heterotrophic bacteria and *Thiobacillus thiooxidans*. **Soil Science**, Baltimore, v. 126, p. 9-14, 1978.

PINTO, C.R.O.; NAHAS, E. Atividade e população microbiana envolvida nas transformações do enxofre em solos com diferentes vegetações. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 37, p. 1751-1756, 2002.

PROCHNOW, L.I.; BOARETTO, A.E.; VITTI, G.C. Utilização de resina trocadora de íons para a avaliação do enxofre disponível do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 21, p. 335-339, 1997.

QURRAT-UL-AIN; SHARMA, S; KHULLER, GK; GARG, SK. Alginate-based oral drug delivery system for tuberculosis: pharmacokinetics and therapeutic effects. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 51, p. 931-938, 2003.

RAJAN, S.S.S. Use of low grade phosphate rock as biosuper fertilizer. **Fertilizer Research**, Wageningen, v. 8, p.147-155, 1981.

RETHMEIER, J.; RABENSTEIN, A.; LANGER, M.; FISCHER, U. Detection of traces of oxidized and reduced sulfur compounds in small samples by combination of different high-performance liquid chromatography methods. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 760, p. 295-302, 1997.

RICHARD, J.J.; VICK, R.D.; JUNK, G.A. Determination of elemental sulfur by gas chromatography. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 11, p. 1084-1086, 1977.

ROBBINS, G.B.; BUSHELL, J.J.; COMPTON, J.F. Nutrient concentrations of a Grass-legume pasture fertilized with single superphosphate or biosuper. **Tropical Grasslands**, Sta Lucia, v. 18, p. 100-102, 1984.

ROBERTSON, L.A.; KUENEN, J.G. The colorless sulfur bacteria. In: DWORKIN. M; FALKOW. S; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes**: A handbook on the biology of bacteria. . 3.ed. New York:Springer, 2006a v.2:Ecophysiology and biochemistry. chap. 1.31. p. 985-1011.

ROBERTSON, L.A.; KUENEN, J.G. The genus *Thiobacillus*. In: DWORKIN. M; FALKOW. S; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes**: A handbook on the biology of bacteria. New York. 3.ed. New York: Springer, 2006b. v.5:Proteobacteria: Alpha and Beta subclasses. chap. 3.3.13. p. 812-827.

ROSS, GR; GUSILS, C; GONZALEZ, SN. Microencapsulation of probiotic strains for swine feeding. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 31, p. 2121-2125, 2008.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, p. 406-425, 1987.

SALLAM, A.; STEINBUHEL, A. *Clostridium sulfidigen* sp., a mesophilic, proteolytic, thiosulfate- and sulfur-reducing bacterium isolated from pond sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, p. 1661-1665, 2009.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York:Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 545p.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

SCHLOSS, P.D.; LARGET, B.R.; HANDELSMAN, J. Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 5485- 5492, 2004.

SCHMALENBERGER, A.; KERTESZ, M.A. Desulfurization of aromatic sulfonates by rhizosphere bacteria: high diversity of the *asfA* gene. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 9, p. 535-545, 2007.

SCHOENAU, J.J.; MALHI, S.S. Sulfur forms and cycling processes in soil and their relationship to sulfur fertility. In: JEZ. J. **Sulfur**: a missing link between soils, crops and nutrition. Madison:American Society of Agronomy, 2008. chap. 1. p. 1-10.

SILVERMAN, M.P.; LUNDGREN, D.G. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*: i. an improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 77, p. 642-647, 1959.

SOLBERG E, D.; MALHI S, S.; NYBORG, M.; GILL K, G.; HENRIQUEZ, B. Source, application method, and cultivation effects on recovery of elemental sulfur as sulfate-s in incubated soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 36, p. 847-862, 2005.

SOLOMON, D.; LEHMANN, J.; MARTINEZ, C.E. Sulfur K-edge XANES spectroscopy as a tool for understanding sulfur dynamics in soil organic matter. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 67, p. 1721–1731, 2003.

STAMFORD, N.P.; IZQUIERDO, C.G.; FERNÁNDEZ, M.T.H.; MORENO, M. del C.M. Biofertilizantes de rochas fosfatadas e potássicas com enxofre e *Acidithiobacillus*. In: FIGUEIREDO, M. do V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E. de R e S. **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba:Agrolivros, 2008. cap. 17. p. 401-421.

STAMFORD, N.P.; SANTOS, P.R. dos; MOURA, A.M.M.F. de; SANTOS, C.E. de R. e S.; FREITAS, A.D.S. de. Biofertilizers with natural phosphate, sulphur and *Acidithiobacillus* in a soil with low available-P. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, p. 767-773, 2003.

STAMFORD, N.P.; SANTOS, P.R. dos; SANTOS, C.E. de R. e S.; FREITAS, A.D.S. de; DIAS, S.H.L.; LIRA JÚNIOR, M. de A. Agronomic effectiveness of biofertilizers with phosphate rock, sulphur and *Acidithiobacillus* in a Brazilian tableland acidic soil grown with yam bean. **Bioresource Technology**, Barking, v. 98, p. 1311-1318, 2007.

STARKEY, R.L. Concerning the physiology of *Thiobacillus thiooxidans*, an autotrophic bacterium oxidizing sulfur under acid conditions. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 10, p. 135-163, 1925.

STARKEY, R.L. Oxidation and reduction of sulfur compounds in soils. **Soil Science**, Baltimore, v. 101, p. 297-306, 1966.

SUZUKI, I. Oxidation of inorganic sulfur compounds: Chemical and enzymatic reactions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 45, p. 97-105, 1999.

SWABY, R.J. Biosuper – biological superphosphate. In: HUMPHREYS, F.R.; LAMBERT, M.J.; KELLY, J. **Sulphur in australasian agriculture**. Camberra: K.D. McLachlan, Ed, 1975. p. 213-220.

TABATABAI, M.A. Importance of sulphur in crop production. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 1, p. 45-62, 1984.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TAN, G.L.; SHU, W.S.; HALLBERG, K.B.; LI, F.; LAN, C.Y.; HUANG, L.N. Cultivation-dependent and cultivation-independent characterization of the microbial community in acid mine drainage associated with acidic Pb/Zn mine tailings at Lechang, Guangdong, China. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 59, p. 118-26, 2007.

TEMPLE, K.L.; COLMER, A.R. The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 62, p. 605-611, 1951.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

VANCOV, T.; JURY, K.; VAN ZWIETEN, L. Atrazine degradation by encapsulated *Rhodococcus erythropolis* NI86/21. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 99, p. 767-75, 2005.

VITOLINS, M.I.; SWABY, R.J. Activity of sulphur-oxidizing microorganisms in some Australian soils. **Australian Journal of Soil Research**, Collingwood, v. 7, p. 171-183, 1969.

VITTI, G.C. **Avaliação e interpretação do enxofre no solo e na planta**. Jaboticabal: FUNEP, 1988. p.37.

VITTI, G.C.; FAVARIN, J.L.; GALLO, L.A.; PIEDADE, S.M. de S.; FARIA, M.R.M. de; CICARONE, F. Assimilação foliar do enxofre elementar pela soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 225-229, 2007.

VOGLER, K.G.; UMBREIT, W.W. The necessity for direct contact in sulfur oxidation by *Thiobacillus thiooxidans*. **Soil Science**, Baltimore, v. 51, p. 331- 337, 1941.

WAINWRIGHT, M. Sulfur oxidation in soils. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 37, p. 349-396, 1984.

WAINWRIGHT, M.; KILLHAM, K. Sulfur oxidation by *Fusarium solani*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 12, p. 555-558, 1980.

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.

WAKSMAN, S.A.; JOFFE, J.S. Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil. II. *Thiobacillus thiooxidans*, a new sulfuroxidizing organism isolated from the soil. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 7, p. 239-256, 1922.

WANG, Q.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M.; COLE, J.R. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 5261-5267, 2007.

WANG, Y.P.; LI, Q.B.; HUI, W.; SHI, J.I.; LIN, Q.; CHEN, X.C; CHEN, Y.X. Effect of sulphur on soil Cu/Zn availability and microbial community composition. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 159, p. 385-389, 2008.

WATKINSON, J.H. Measurement of the oxidation rate of elemental sulfur in soil. **Australian Journal of Soil Research**, Collingwood, v. 27, p. 365-375, 1989.

WATKINSON, J.H. Oxidation rate of elemental sulfur particles with a wide range of sizes. **Australian Journal of Soil Research**, Collingwood, v. 31, p. 67-72, 1993.

WATKINSON, J.H.; BLAIR, G.J. Modeling the oxidation of elemental sulfur in soil. **Fertilizer Research**, Wageningen, v. 35, p. 115-126, 1993.

WATKINSON, J.H.; LEE, A. Kinetics of field oxidation of elemental sulfur in New Zealand pastoral soils and the effects of soil temperature and moisture. **Fertilizer Research**, Wageningen, v. 37, p. 59-68, 1994.

WATKINSON, J.H.; LEE, A.; LAUREN, D.R. Measurement of elemental sulfur in soil and sediments: Field sampling, sample storage, pre-treatment, extraction and analysis by high-performance liquid chromatography. **Australian Journal of Soil Research**, Collingwood, v. 25, p. 167-78, 1987.

WIERINGA, K.T. Solid media with elemental sulfur for detection of sulphur oxidizing microbes. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 32, p. 183-186, 1966.

WINOGRADSKY, S. Über Schwefelbakterien. **Botanische Zeitung**, Leipzig, v. 45, p. 489-507, 1887.

YAHYA, A.; HALBERG, K.B.; JOHNSON, D.B. Iron and carbon metabolism by a mineral-oxidizing *Alicyclobacillus*-like bacterium. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 189, p. 305-312, 2008.

YANG, Z.; HANEKLAUS, S.; SINGH, B.R.; SCHNUG, E. Effect of repeated applications of elemental sulfur on microbial population, sulfate concentration, and pH in soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 39, p. 124-140, 2008.

YANG, Z.H.; STÖVEN, K.; HANEKLAUS, S.; SINGH, B.R.; SCHNUG, E. Elemental sulfur oxidation by *Thiobacillus spp.* and aerobic heterotrophic sulfur-oxidizing bacteria. **Pedosphere**, Beijing, v. 20., p. 71-79, 2010.

ZHANG, L.M.; OFFRE, P.R.; HE, J.Z.; VERHAMME, D.T.; NICOL, G.W.; PROSSER, J.I. Autotrophic ammonia oxidation by soil *Thaumarchaea*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, p. 17240-17245, 2010.

ZHAO, F.J.; LOKE, S.Y.; CROSLAND, A.R.; MCGRATH, S.P. Method to determine elemental sulphur in soils applied to measure sulphur oxidation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 28, p. 1083-1087, 1996.

ANEXO

Anexo A - Afiliação taxonômica e frequência de UTOs representando Bacteria nos solos avaliados.

(continua)

UTO	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	ANB -S ⁰	ANB +S ⁰	BRA -S ⁰	BRA +S ⁰	RDP -S ⁰	RDP +S ⁰
1	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1	1,55	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
2	Actinobacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiales	ND	ND	1,55	0,00	0,00	0,00	0,69	0,72
3	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	13,18	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
4	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomycetaceae	Streptacidiphilus	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	ND	ND	ND	1,55	0,00	1,52	0,79	0,69	0,00
6	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomycetaceae	Streptomyces	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp2	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp2	1,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Sorangineae	ND	0,78	0,00	0,00	0,79	0,69	0,00
10	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	ND	4,65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	ND	ND	ND	2,33	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
13	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,78	0,00	9,09	8,73	0,00	0,00
14	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,78	0,74	0,00	0,00	0,00	0,72
15	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micromonosporaceae	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
16	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	5,43	0,00	0,76	0,00	2,08	0,00
18	Bacteroidetes	ND	ND	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
19	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	ND	3,88	0,74	3,79	0,00	0,69	0,00
20	Proteobacteria	ND	ND	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
21	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	ND	ND	ND	1,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
23	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	1,55	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
24	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacteriales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
25	Firmicutes	ND	ND	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ND= Não determinado

Anexo A - Afiliação taxonômica e frequência de UTOs representando Bacteria nos solos avaliados.

(continuação)

UTO	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	ANB -S ⁰	ANB +S ⁰	BRA -S ⁰	BRA +S ⁰	RDP -S ⁰	RDP +S ⁰
26	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,78	0,74	0,76	0,00	0,00	0,00
27	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,78	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
28	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	2,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
29	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
30	Actinobacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiales	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
31	TM7	ND	ND	ND	TM7_genera_incertae_sedis	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
32	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
33	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
34	Cyanobacteria	Cyanobacteria	Chloroplast	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
35	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
36	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
37	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	ND	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	1,39	0,00
38	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Thermomonosporaceae	Actinoallomurus	1,55	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
39	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
40	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomycetaceae	Streptomyces	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
41	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	ND	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
42	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp14	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp14	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
43	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
44	ND	ND	ND	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
45	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	ND	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
46	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	ND	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
47	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
48	Actinobacteria	Actinobacteria	Solirubrobacterales	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
49	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
50	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Lysinibacillus	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ND= Não determinado

Anexo A - Afiliação taxonômica e frequência de UTOs representando Bacteria nos solos avaliados.

(continuação)

UTO	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	ANB -S ⁰	ANB +S ⁰	BRA -S ⁰	BRA +S ⁰	RDP -S ⁰	RDP +S ⁰
51	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,78	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
52	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,79	0,00	0,72
53	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
54	Firmicutes	ND	ND	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
55	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp3	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp3	1,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
56	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
57	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
58	Actinobacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiales	ND	ND	1,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
59	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
60	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp13	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp13	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
61	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
62	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	Clostridium	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
63	Actinobacteria	Actinobacteria	ND	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
64	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
65	Actinobacteria	Actinobacteria	ND	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
66	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
67	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micromonosporaceae	ND	0,78	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
68	ND	ND	ND	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
69	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	ND	ND	1,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
70	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
71	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
72	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Alicyclobacillaceae	Alicyclobacillus	1,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
73	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micromonosporaceae	ND	1,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
74	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomycetaceae	Streptomyces	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
75	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ND= Não determinado

Anexo A - Afiliação taxonômica e frequência de UTOs representando Bacteria nos solos avaliados.

(continuação)

UTO	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	ANB -S ⁰	ANB +S ⁰	BRA -S ⁰	BRA +S ⁰	RDP -S ⁰	RDP +S ⁰
76	Actinobacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiales	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
77	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp2	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp2	1,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
78	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0,78	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
79	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
80	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
81	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0,78	1,47	0,00	0,00	0,00	0,00
82	Firmicutes	ND	ND	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
83	Firmicutes	ND	ND	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
84	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0,00	8,09	0,00	0,00	0,00	0,72
85	Firmicutes	ND	ND	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
86	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
87	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
88	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
89	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptococcaceae	Desulfosporosinus	0,00	2,21	0,00	0,00	0,00	0,00
90	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Sporobacter	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
91	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
92	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	ND	0,00	2,94	0,00	0,00	0,00	0,00
93	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	6,62	0,00	0,00	0,00	24,46
94	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
95	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
96	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
97	Firmicutes	Clostridia	ND	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
98	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
99	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Cohnella	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
100	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00

ND= Não determinado

Anexo A - Afiliação taxonômica e frequência de UTOs representando Bacteria nos solos avaliados.

(continuação)

UTO	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	ANB -S ⁰	ANB +S ⁰	BRA -S ⁰	BRA +S ⁰	RDP -S ⁰	RDP +S ⁰
101	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	ND	0,00	1,47	0,00	0,00	0,00	0,00
102	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
103	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Cohnella	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
104	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Sporacetigenium	0,00	2,21	0,00	0,00	0,00	0,00
105	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
106	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus	0,00	2,21	0,00	0,00	0,00	0,00
107	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
108	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	ND	0,00	1,47	0,00	0,00	0,00	0,00
109	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Cohnella	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
110	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
111	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
112	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
113	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
114	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
115	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
116	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
117	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
118	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Cohnella	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
119	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Anaerostipes	0,00	1,47	0,00	0,00	0,00	0,00
120	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptococcaceae	Peptococcaceae 1	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
121	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
122	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	3,60
123	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Incertae Sedis XIII	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
124	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
125	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00

ND= Não determinado

Anexo A - Afiliação taxonômica e frequência de UTOs representando Bacteria nos solos avaliados.

(continuação)

UTO	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	ANB -S ⁰	ANB +S ⁰	BRA -S ⁰	BRA +S ⁰	RDP -S ⁰	RDP +S ⁰
126	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Tumebacillus	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
127	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
128	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
129	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
130	Firmicutes	Clostridia	ND	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
131	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
132	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
133	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	ND	ND	0,00	1,47	0,00	0,00	0,00	0,00
134	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	1,47	0,00	0,00	0,00	0,00
135	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
136	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
137	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
138	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
139	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
140	Firmicutes	Bacilli	ND	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
141	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
142	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Lysinibacillus	0,00	1,47	0,00	0,00	0,00	0,00
143	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
144	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
145	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
146	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
147	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
148	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
149	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Cohnella	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
150	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00

ND= Não determinado

Anexo A - Afiliação taxonômica e frequência de UTOs representando Bacteria nos solos avaliados.

(continuação)

UTO	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	ANB -S ⁰	ANB +S ⁰	BRA -S ⁰	BRA +S ⁰	RDP -S ⁰	RDP +S ⁰
151	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
152	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
153	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0,00	0,74	0,00	0,00	1,39	2,16
154	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Cohnella	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
155	Firmicutes	Bacilli	ND	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
156	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	Atopostipes	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
157	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
158	Firmicutes	Bacilli	ND	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
159	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptococcaceae	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
160	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
161	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
162	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
163	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
164	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
165	Firmicutes	Bacilli	ND	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
166	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
167	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
168	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptococcaceae	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
169	Firmicutes	Bacilli	ND	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
170	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
171	Firmicutes	Bacilli	ND	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
172	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
173	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micromonosporaceae	Hamadaea	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
174	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
175	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00

ND= Não determinado

Anexo A - Afiliação taxonômica e frequência de UTOs representando Bacteria nos solos avaliados.

(continuação)

UTO	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	ANB -S ⁰	ANB +S ⁰	BRA -S ⁰	BRA +S ⁰	RDP -S ⁰	RDP +S ⁰
176	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
177	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00
178	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
179	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1	0,00	0,00	0,76	0,79	0,00	0,00
180	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
181	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
182	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1	0,00	0,00	3,79	0,79	0,00	0,00
183	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
184	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	Phenylobacterium	0,00	0,00	1,52	0,00	0,00	0,00
185	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
186	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	1,52	0,79	0,00	0,00
187	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
188	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
189	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
190	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
191	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
192	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	1,52	0,00	0,00	0,00
193	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
194	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,79	0,00	0,00
195	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,69	0,00
196	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
197	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
198	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	Gemmatimonas	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
199	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
200	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	ND	ND	0,00	0,00	1,52	0,00	0,00	0,00

ND= Não determinado

Anexo A - Afiliação taxonômica e frequência de UTOs representando Bacteria nos solos avaliados.

(continuação)

UTO	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	ANB -S ⁰	ANB +S ⁰	BRA -S ⁰	BRA +S ⁰	RDP -S ⁰	RDP +S ⁰
201	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia	0,00	0,00	1,52	0,00	0,00	0,00
202	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
203	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1	0,00	0,00	3,03	0,79	0,00	0,00
204	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
205	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	1,52	0,00	0,00	0,00
206	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
207	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
208	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	ND	0,00	0,00	1,52	0,00	0,00	0,00
209	Proteobacteria	Betaproteobacteria	ND	ND	ND	0,00	0,00	1,52	0,00	0,00	0,00
210	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
211	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1	0,00	0,00	1,52	0,00	0,00	0,00
212	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
213	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1	0,00	0,00	1,52	0,00	0,00	0,00
214	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
215	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	Gemmatimonas	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
216	Proteobacteria	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
217	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
218	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
219	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
220	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
221	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp3	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp3	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
222	Verrucomicrobia	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	1,52	0,00	0,00	0,00
223	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
224	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1	0,00	0,00	1,52	0,00	0,00	0,00
225	Actinobacteria	Actinobacteria	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00

ND= Não determinado

Anexo A - Afiliação taxonômica e frequência de UTOs representando Bacteria nos solos avaliados.

(continuação)

UTO	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	ANB -S ⁰	ANB +S ⁰	BRA -S ⁰	BRA +S ⁰	RDP -S ⁰	RDP +S ⁰
226	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp3	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp3	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
227	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp2	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp2	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
228	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
229	Actinobacteria	Actinobacteria	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
230	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
231	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
232	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
233	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
234	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
235	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Ramlibacter	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
236	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
237	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
238	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,69	0,00
239	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
240	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
241	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
242	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
243	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
244	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
245	Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
246	Verrucomicrobia	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
247	Verrucomicrobia	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
248	Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
249	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
250	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00

ND= Não determinado

Anexo A - Afiliação taxonômica e frequência de UTOs representando Bacteria nos solos avaliados.

(continuação)

UTO	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	ANB -S ⁰	ANB +S ⁰	BRA -S ⁰	BRA +S ⁰	RDP -S ⁰	RDP +S ⁰
251	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Acetivibrio	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
252	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
253	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Cystobacterineae	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
254	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
255	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
256	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
257	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
258	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
259	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
260	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
261	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp2	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp2	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
262	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
263	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Ralstonia	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
264	Actinobacteria	Actinobacteria	Solirubrobacterales	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
265	Firmicutes	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
266	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00
267	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
268	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
269	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
270	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
271	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
272	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Dyella	0,00	0,00	0,00	6,35	0,00	0,00
273	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
274	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
275	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Cystobacterineae	Cystobacteraceae	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00

ND= Não determinado

Anexo A - Afiliação taxonômica e frequência de UTOs representando Bacteria nos solos avaliados.

(continuação)

UTO	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	ANB -S ⁰	ANB +S ⁰	BRA -S ⁰	BRA +S ⁰	RDP -S ⁰	RDP +S ⁰
276	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
277	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
278	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
279	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Cohnella	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
280	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Dyella	0,00	0,00	0,00	2,38	0,00	0,00
281	Actinobacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
282	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
283	Actinobacteria	Actinobacteria	Solirubrobacterales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
284	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
285	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
286	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
287	Actinobacteria	Actinobacteria	Solirubrobacterales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
288	Actinobacteria	Actinobacteria	Solirubrobacterales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
289	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
290	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
291	Actinobacteria	Actinobacteria	Solirubrobacterales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	1,59	0,00	0,00
292	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
293	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
294	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
295	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
296	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	1,59	0,00	0,00
297	Actinobacteria	Actinobacteria	Solirubrobacterales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
298	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	ND	0,00	0,00	0,00	1,59	0,00	0,00
299	Actinobacteria	Actinobacteria	Solirubrobacterales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
300	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00

ND= Não determinado

Anexo A - Afiliação taxonômica e frequência de UTOs representando Bacteria nos solos avaliados.

(continuação)

UTO	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	ANB -S ⁰	ANB +S ⁰	BRA -S ⁰	BRA +S ⁰	RDP -S ⁰	RDP +S ⁰
301	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
302	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Dyella	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
303	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
304	Actinobacteria	Actinobacteria	Solirubrobacterales	Conexibacteraceae	Conexibacter	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
305	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
306	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp5	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp5	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
307	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
308	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
309	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
310	Actinobacteria	Actinobacteria	Solirubrobacterales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
311	Proteobacteria	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
312	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
313	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,69	0,00
314	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
315	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
316	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
317	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
318	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
319	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
320	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
321	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
322	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
323	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
324	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
325	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00

ND= Não determinado

Anexo A - Afiliação taxonômica e frequência de UTOs representando Bacteria nos solos avaliados.

(continuação)

UTO	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	ANB -S ⁰	ANB +S ⁰	BRA -S ⁰	BRA +S ⁰	RDP -S ⁰	RDP +S ⁰
326	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Dyella	0,00	0,00	0,00	1,59	0,00	0,00
327	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
328	Actinobacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	1,59	0,00	0,00
329	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	1,59	0,00	0,00
330	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,69	0,00
331	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
332	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
333	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
334	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
335	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Dyella	0,00	0,00	0,00	1,59	0,00	0,00
336	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
337	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
338	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
339	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia	0,00	0,00	0,00	1,59	0,00	0,00
340	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
341	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	Telmatospirillum	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
342	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
343	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	1,59	0,00	0,00
344	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
345	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Propionibacteriaceae	Propionibacterium	0,00	0,00	0,00	0,79	0,69	0,00
346	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
347	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	1,59	0,00	0,00
348	Actinobacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiales	lamiaceae	lamia	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
349	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
350	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00

ND= Não determinado

Anexo A - Afiliação taxonômica e frequência de UTOs representando Bacteria nos solos avaliados.

(continuação)

UTO	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	ANB -S ⁰	ANB +S ⁰	BRA -S ⁰	BRA +S ⁰	RDP -S ⁰	RDP +S ⁰
351	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
352	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Dyella	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,00
353	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillales_incertae_sedis	Pullulanibacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
354	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Tumebacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	1,39	0,00
355	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Tumebacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
356	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
357	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Tumebacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
358	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillales_incertae_sedis	Pullulanibacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
359	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Tumebacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	6,25	0,00
360	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Salirhabdus	0,00	0,00	0,00	0,00	1,39	0,00
361	Proteobacteria	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
362	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Tumebacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
363	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomycetaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	2,08	0,00
364	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Tumebacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
365	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillales_incertae_sedis	Pullulanibacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	1,39	0,00
366	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
367	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
368	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
369	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
370	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	2,08	0,00
371	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Tumebacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	2,78	0,00
372	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
373	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillales_incertae_sedis	Pullulanibacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
374	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillales_incertae_sedis	Pullulanibacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
375	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Tumebacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00

ND= Não determinado

Anexo A - Afiliação taxonômica e frequência de UTOs representando Bacteria nos solos avaliados.

(continuação)

UTO	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	ANB -S ⁰	ANB +S ⁰	BRA -S ⁰	BRA +S ⁰	RDP -S ⁰	RDP +S ⁰
376	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Tumebacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
377	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
378	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Tumebacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
379	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillales_incertae_sedis	Pullulanibacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	2,08	0,00
380	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
381	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
382	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Alicyclobacillaceae	Alicyclobacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
383	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
384	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Tumebacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
385	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Tumebacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
386	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Tumebacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
387	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	2,08	0,00
388	Firmicutes	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
389	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Tumebacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
390	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Tumebacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
391	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
392	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillales_incertae_sedis	Pullulanibacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
393	Proteobacteria	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	2,08	0,00
394	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
395	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Tumebacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
396	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
397	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	1,39	0,00
398	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	1,39	0,00
399	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
400	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Agromonas	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00

ND= Não determinado

Anexo A - Afiliação taxonômica e frequência de UTOs representando Bacteria nos solos avaliados.

(continuação)

UTO	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	ANB -S ⁰	ANB +S ⁰	BRA -S ⁰	BRA +S ⁰	RDP -S ⁰	RDP +S ⁰
401	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
402	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
403	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
404	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
405	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
406	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
407	Actinobacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
408	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
409	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
410	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
411	Proteobacteria	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
412	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Mycobacteriaceae	Mycobacterium	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,72
413	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1	0,00	0,00	0,00	0,00	4,17	0,00
414	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
415	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
416	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
417	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
418	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
419	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptosporangiaceae	Nonomuraea	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
420	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Cystobacterineae	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
421	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
422	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
423	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
424	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
425	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,00	1,39	0,00

ND= Não determinado

Anexo A - Afiliação taxonômica e frequência de UTOs representando Bacteria nos solos avaliados.

(continuação)

UTO	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	ANB -S ⁰	ANB +S ⁰	BRA -S ⁰	BRA +S ⁰	RDP -S ⁰	RDP +S ⁰
426	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
427	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
428	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
429	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Sorangineae	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
430	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
431	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
432	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillales_incertae_sedis	Pullulanibacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
433	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	Gemmatimonas	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
434	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
435	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
436	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,72
437	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
438	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillales_incertae_sedis	Pullulanibacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
439	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
440	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
441	Acidobacteria	Acidobacteria_Gp1	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Gp1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
442	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
443	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00
444	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Tumebacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	1,39	0,00
445	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micromonosporaceae	Micromonospora	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,44
446	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
447	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
448	Actinobacteria	Actinobacteria	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,44
449	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,44
450	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72

ND= Não determinado

Anexo A - Afiliação taxonômica e frequência de UTOs representando Bacteria nos solos avaliados.

(continuação)

UTO	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	ANB -S ⁰	ANB +S ⁰	BRA -S ⁰	BRA +S ⁰	RDP -S ⁰	RDP +S ⁰
451	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,44
452	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
453	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
454	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
455	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,44
456	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
457	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
458	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
459	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
460	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Alicyclobacillaceae	Alicyclobacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,88
461	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
462	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
463	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
464	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
465	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,44
466	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Legionellales	Legionellaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
467	Bacteria_incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,44
468	Firmicutes	Clostridia	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
469	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,44
470	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Tumebacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,88
471	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomycetaceae	Streptomyces	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
472	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
473	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
474	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
475	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72

ND= Não determinado

Anexo A - Afiliação taxonômica e frequência de UTOs representando Bacteria nos solos avaliados.

(continuação)

UTO	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	ANB -S ⁰	ANB +S ⁰	BRA -S ⁰	BRA +S ⁰	RDP -S ⁰	RDP +S ⁰
476	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
477	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
478	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Tumebacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
479	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Cohnella	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
480	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
481	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
482	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
483	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Tumebacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
484	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
485	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Cohnella	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
486	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
487	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
488	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Veillonellaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
489	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
490	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
491	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
492	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
493	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillales_incertae_sedis	Pullulanibacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
494	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
495	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
496	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
497	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
498	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
499	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
500	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72

ND= Não determinado

Anexo A - Afiliação taxonômica e frequência de UTOs representando Bacteria nos solos avaliados.

(conclusão)

UTO	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	ANB -S ⁰	ANB +S ⁰	BRA -S ⁰	BRA +S ⁰	RDP -S ⁰	RDP +S ⁰
501	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
502	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
503	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Thurberibacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,44
504	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
505	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,44
506	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
507	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
508	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
509	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
510	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
511	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
512	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
513	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
514	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
515	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
516	Firmicutes	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
517	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72
518	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72

ND= Não determinado