UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

ANDRESSA MONTEIRO VENTURINI

**Efeito do uso do solo e da rizosfera de cana-de-açúcar na estrutura e
abundância de comunidades de *Bacteria* e do filo *Verrucomicrobia***

Piracicaba

2014

ANDRESSA MONTEIRO VENTURINI

**Efeito do uso do solo e da rizosfera de cana-de-açúcar na estrutura e
abundância de comunidades de *Bacteria* e do filo *Verrucomicrobia***

**Dissertação apresentada ao Centro de Energia
Nuclear na Agricultura da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

**Área de Concentração: Biologia na Agricultura e
no Ambiente**

Orientadora: Profa. Dra. Siu Mui Tsai

Piracicaba

2014

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Venturini, Andressa Monteiro

Efeito do uso do solo e da rizosfera de cana-de-açúcar na estrutura e abundância de comunidades de *Bacteria* e do filo *Verrucomicrobia* / Andressa Monteiro Venturini; orientadora Siu Mui Tsai. - - Piracicaba, 2014.

107 p. : il.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) - - Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Bactérias 2. Biodiversidade 3. Biologia molecular 4. DNA 5. Ecologia microbiana 6. Microbiologia do solo I. Título

CDU 579.26

*Dedico este trabalho aos meus pais, Roberto (in memoriam) e Marise, por uma história
construída com muito amor.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por tudo.

Aos meus queridos pais, Roberto (*in memoriam*) e Marise, pelo amor incondicional que sempre demonstraram, mesmo nos momentos mais difíceis das nossas vidas. Por dedicarem tanto tempo, recursos e carinho para me criar e educar. Por acreditarem em mim e nos meus sonhos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Siu Mui Tsai, pelo suporte e ensinamentos concedidos durante toda a minha trajetória profissional. Pela amizade e grandes conselhos que me ofereceu ao longo de todos esses anos. Pelo apoio e por todas as oportunidades concedidas, pelas quais sou muito grata.

Ao meu noivo, Jaime, por ser mais do que um namorado, mas o meu melhor amigo e companheiro, que sempre entende e apoia as minhas escolhas. Mais ainda, que me protege, ajuda e acalma em todos os momentos.

Aos meus grandes amigos, sempre ao meu lado, especialmente a Ana Laura, por fazer, diariamente, o complicado papel de melhor amiga. Por estar sempre disposta a fazer parte do meu cotidiano, mesmo quando estou pouco presente.

Aos queridos Aline, Caio, Fernanda, Marcela, Marília e Naissa, que conseguem fazer o meu dia sempre mais feliz. Pela grande ajuda em importantes etapas do projeto.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Acácio, Andreza, Bia, Camila, Carol, Clóvis, Danielle, Dennis, Enéas, Fabiana, Felipe, Fernanda Cassieri, Gustavo, Helena, Janne, Letícia, Lina, Lucas, Lucas Palma, Marina, Maria Júlia, Paula e Rosineide, pelo companheirismo e apoio em todos os momentos.

Aos funcionários do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Elias, Fábio, Ludmila e Wagner, pela amizade e ajuda em diferentes etapas do projeto.

Aos funcionários do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Daiane, Fábio, Neuda e Marília, por todo o apoio nos processos administrativos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2013/05087-7) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de mestrado concedida.

A todos, que de alguma forma, tornaram esse momento possível.

“A ciência possui grande beleza. Um cientista em seu laboratório não é apenas um técnico: é também uma criança colocada perante fenômenos naturais que a impressionam como um conto de fadas.”

Marie Curie (1867-1934)

RESUMO

VENTURINI, A. M. **Efeito do uso do solo e da rizosfera de cana-de-açúcar na estrutura e abundância de comunidades de *Bacteria* e do filo *Verrucomicrobia***. 2014. 107 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

A abundância e diversidade dos microrganismos do solo podem ser influenciadas por grande número de fatores, associados, principalmente, ao tipo de solo, sua cobertura e uso. A microbiota do solo apresenta grande importância pelos processos desempenhados pelos seus organismos, essenciais para todos os ecossistemas terrestres. Apesar da grande complexidade associada a esses estudos, os fatores que influenciam as comunidades microbianas podem ser melhor elucidados pela pesquisa com grupos específicos. Nesse sentido, o filo bacteriano *Verrucomicrobia*, grupo ubíquo em solos, apresenta elevada abundância em diferentes ambientes, o que sugere sua grande importância ecológica. Mas, pela dificuldade de isolamento de seus organismos, ainda pouco se sabe a respeito da ecologia do filo. O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de analisar os efeitos do uso do solo e da rizosfera de cana-de-açúcar nas comunidades de *Bacteria* e do filo *Verrucomicrobia*. Com essa finalidade, amostras de solo foram coletadas em áreas sob diferentes usos em uma usina sucroalcooleira na cidade de Piracicaba (SP). As amostras foram utilizadas em dois estudos distintos. No primeiro, foram analisadas as comunidades microbianas presentes nas amostras de solo obtidas na coleta das áreas de estudo e, no segundo, retiradas de um experimento controlado conduzido em estufa para analisar o efeito do uso do solo e, principalmente, da rizosfera nas mesmas. As comunidades foram avaliadas quanto a sua abundância, pela técnica de qPCR, e estrutura, pela técnica de T-RFLP. No primeiro estudo, a diversidade do filo também foi acessada pelo desenvolvimento de bibliotecas do seu gene 16S rRNA. Os resultados dos estudos indicam que a comunidade bacteriana e, principalmente, do filo foram afetadas pelo uso do solo e pelo manejo adotado em cada área, o que evidencia a importância de sistemas conservacionistas. A análise das bibliotecas demonstrou que o filo *Verrucomicrobia* apresentou maior diversidade na mata nativa do que nos canaviais. Adicionalmente, a incidência e a abundância das subdivisões do grupo foram alteradas de acordo com o uso do solo. As comunidades também foram influenciadas pela rizosfera em sua estrutura e abundância, resultados de grande interesse para o estudo do filo, pois poucos trabalhos analisaram o efeito rizosférico em seus organismos. Além disso, a sua elevada abundância encontrada no estudo, que tem sido comumente subestimada, ressalta a importância de trabalhos com foco específico em grupos de interesse.

Palavras-chave: Ecologia microbiana. Comunidade bacteriana. Filo *Verrucomicrobia*. Gene 16S rRNA. T-RFLP. PCR em tempo real.

ABSTRACT

VENTURINI, A. M. **Effect of land use change and sugarcane rhizosphere on the structure and abundance of *Bacteria* and *Verrucomicrobia* communities.** 2014. 107 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

The abundance and diversity of soil microbial communities can be influenced by many factors, mainly associated with soil type, its coverage and use. The soil microbiota has great importance due to the processes performed by its organisms, essential for all terrestrial ecosystems. Despite the great complexity associated with these studies, the factors that affect the microbial communities can be better explained through the research of specific groups. In this sense, the bacterial phylum *Verrucomicrobia*, a ubiquitous soil group, presents high abundance in different environments, which suggests its great ecological importance. But due to the difficulty of isolating its organisms, little is known about the ecology of the phylum. The present work was developed with the objective of analyzing the effect of land use changes and sugarcane rhizosphere on the structure and abundance of *Bacteria* and *Verrucomicrobia* communities. For this purpose, soil samples were collected in areas under different land uses in a sugarcane mill in Piracicaba (SP). The samples were used in two separate studies. In the first, the microbial communities present in soil samples obtained in the sampling areas were analyzed and, in the second, taken from a controlled experiment conducted in a greenhouse to analyze the effect of land use and, especially, the rhizosphere on the communities. The communities were evaluated for their abundance, by the qPCR technique, and structure, by T-RFLP. In the first study, the phylum diversity was also accessed with the development of 16S rRNA gene libraries. The results from the studies indicate that bacterial and, especially, the phylum community were affected by land use and the management adopted in each area, which evidences the importance of conservationist systems. The analysis of the clone library demonstrated that the phylum *Verrucomicrobia* presented greater diversity in native vegetation than in the sugarcane fields. Additionally, the incidence and abundance of the group subdivisions have been changed in accordance with land use. The structure and abundance of the communities were also influenced by the rhizosphere, results of great interest to the reserach of the phylum, since few studies have analyzed the rhizosphere effect on its organisms. Furthermore, the high abundance of the phylum found in the study, which has been commonly underestimated, emphasizes the importance of research with specific focus on groups of interest.

Keywords: Microbial ecology. Bacterial community. Phylum *Verrucomicrobia*. 16S rRNA gene. T-RFLP. Real time PCR.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Revisão de literatura	18
1.1.1 Microbiota do solo.....	18
1.1.2 Filo <i>Verrucomicrobia</i>	19
1.1.3 Efeito do uso do solo na microbiota	20
1.1.4 Cultivo de cana-de-açúcar	21
1.1.5 Técnicas moleculares independentes de cultivo em Ecologia Microbiana	22
1.1.6 <i>Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (T-RFLP).....	23
1.1.7 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	24
1.1.8 Bibliotecas de clones	25
REFERÊNCIAS	26
 2 ESTRUTURA E ABUNDÂNCIA DE COMUNIDADES DE <i>BACTERIA</i> E DO FILO <i>VERRUCOMICROBIA</i> EM SOLOS SOB DIFERENTES USOS EM PIRACICABA (SP) ...	34
Resumo	34
Abstract.....	35
2.1 Introdução.....	36
2.2 Objetivos.....	37
2.2.1 Objetivos específicos.....	37
2.3 Material e métodos	37
2.3.1 Coleta e processamento das amostras de solo	37
2.3.2 Análise físico-química das amostras de solo.....	39
2.3.3 Análise do teor de água das amostras de solo	39
2.3.4 Extração e quantificação de DNA das amostras de solo	40
2.3.5 T-RFLP das comunidades de <i>Bacteria</i> e do filo <i>Verrucomicrobia</i>	41
2.3.5.1 PCR dos genes 16S rRNA de <i>Bacteria</i> e do filo <i>Verrucomicrobia</i>	41
2.3.5.2 Purificação dos produtos de PCR	42
2.3.5.3 Reação de restrição dos produtos de PCR purificados	42
2.3.5.4 Precipitação dos produtos de restrição	43
2.3.5.5 Análise dos fragmentos terminais de restrição	43
2.3.5.6 Processamento dos dados de T-RFLP	43
2.3.6 qPCR das comunidades de <i>Bacteria</i> e do filo <i>Verrucomicrobia</i>	44

2.3.6.1 Construção da curva dos genes 16S rRNA de <i>Bacteria</i> e do filo <i>Verrucomicrobia</i>	44
2.3.6.2 qPCR dos genes 16S rRNA de <i>Bacteria</i> e do filo <i>Verrucomicrobia</i>	45
2.3.6.3 Processamento dos dados de qPCR	46
2.3.7 Biblioteca de clones do filo <i>Verrucomicrobia</i>	47
2.3.7.1 PCR do gene 16S rRNA do filo <i>Verrucomicrobia</i>	47
2.3.7.2 Purificação dos produtos de PCR.....	47
2.3.7.3 Ligação dos produtos de PCR	48
2.3.7.4 Transformação em <i>Escherichia coli</i>	48
2.3.7.5 Seleção dos clones e extração do DNA plasmidial	49
2.3.7.6 PCR do inserto	49
2.3.7.7 Purificação dos produtos de PCR.....	49
2.3.7.8 PCR de sequenciamento.....	50
2.3.7.9 Precipitação dos produtos de PCR	50
2.3.7.10 Análise das sequências	51
2.4 Resultados e discussão	51
2.4.1 Análise físico-química das amostras de solo	51
2.4.2 Análise do teor de água das amostras de solo	53
2.4.3 Extração e quantificação de DNA das amostras de solo.....	53
2.4.4 T-RFLP das comunidades de <i>Bacteria</i> e do filo <i>Verrucomicrobia</i>	54
2.4.5 qPCR das comunidades de <i>Bacteria</i> e do filo <i>Verrucomicrobia</i>	60
2.4.6 Biblioteca de clones do filo <i>Verrucomicrobia</i>	63
2.5 Conclusão.....	66
REFERÊNCIAS	67

3 INFLUÊNCIA DO USO DO SOLO E DA RIZOSFERA DE CANA-DE-AÇÚCAR SOBRE COMUNIDADES DE *BACTERIA* E DO FILO *VERRUCOMICROBIA* EM MESOCOSMOS

Resumo.....	74
Abstract	75
3.1 Introdução	76
3.2 Objetivos	76
3.2.1. Objetivos específicos	76
3.3 Material e métodos.....	76
3.3.1 Coleta do solo para o experimento de mesocosmos	76

3.3.2 Experimento de mesocosmos	77
3.3.3 Coleta das amostras de solo.....	77
3.3.4 Extração e quantificação de DNA das amostras de solo	78
3.3.5 T-RFLP das comunidades de <i>Bacteria</i> e do filo <i>Verrucomicrobia</i>	78
3.3.6 qPCR das comunidades de <i>Bacteria</i> e do filo <i>Verrucomicrobia</i>	78
3.4 Resultados e discussão	79
3.4.1 Extração e quantificação de DNA das amostras de solo	79
3.4.2 Análise de T-RFLP das comunidades de <i>Bacteria</i> e do filo <i>Verrucomicrobia</i>	79
3.4.3 qPCR das comunidades de <i>Bacteria</i> e do filo <i>Verrucomicrobia</i>	85
3.5 Conclusão	87
REFERÊNCIAS	87
ANEXOS	91

1 INTRODUÇÃO

O solo pode ser considerado o mais diverso e importante ecossistema existente (ROGER-ESTRADE et al., 2010), caracterizado como um ambiente dinâmico que suporta processos essenciais para os organismos e o funcionamento dos ecossistemas. Sua diversidade é composta, principalmente, por seus microrganismos (TORSVIK; GOKSØYR; DAAE, 1990), que podem ser influenciados por diferentes fatores, associados principalmente ao tipo de solo, seu uso e sua cobertura (GRAYSTON et al., 1998). A microbiota do solo é composta de diferentes grupos, com grande parte das pesquisas relacionadas ao estudo da comunidade bacteriana (PEREIRA E SILVA et al., 2012). Os microrganismos atuam na qualidade dos ecossistemas naturais (ROGER-ESTRADE et al., 2010) e também dos sistemas agrários, onde podem influenciar o crescimento e a qualidade da colheita, além da resistência do sistema frente ao estresse (BRUSSAARD; DE RUITER; BROWN, 2007).

Assim, pela grande importância dos microrganismos, o estudo dos efeitos do uso do solo sobre os mesmos apresenta grande importância na área de Ecologia Microbiana. Os microrganismos podem ser considerados os indicadores mais rápidos associados ao uso da terra (GARCÍA-ORENES et al., 2013). Mais ainda, o estudo da abundância e da diversidade de grupos microbianos específicos também apresenta grande potencial para caracterizar os efeitos de diferentes sistemas sobre a sustentabilidade do solo (BENDING et al., 2004).

Como grupo de interesse, destaca-se o filo bacteriano *Verrucomicrobia*. Recém-adicionado ao Domínio (HEDLUND; GOSINK; STALEY, 1997), e com poucos representantes isolados (SCHLESNER; JENKINS; STALEY, 2006), sua abundância em diferentes ambientes tem sugerido o potencial de seus organismos em exercer grande impacto ecológico (WERTZ et al., 2012). Apesar de sua representatividade, poucos estudos enfocaram na diversidade e abundância do filo (BERGMANN et al., 2011). O grupo é considerado dominante em solos (BERGMANN et al., 2011) e na rizosfera (ROSENBERG et al., 2009), mas pouco se sabe sobre seus nichos preferenciais (DA ROCHA; VAN ELSAS; VAN OVERBEEK, 2011). Contudo, pesquisas indicam que bactérias pertencentes ao filo podem ser afetadas por características ambientais que mudam de acordo com o uso do solo (BUCKLEY; SCHMIDT, 2001).

Dentro desse contexto, o Brasil, país referência do setor sucroalcooleiro, tem seu mercado em crescimento pelo uso do etanol como fonte de energia alternativa. O aumento do cultivo no país tem sido acompanhado pelo sistema de colheita mecanizada. Apesar disso, a queima pré-colheita ainda tem sido amplamente utilizada como forma de reduzir os custos

com o corte e transporte em diversas áreas (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). Assim, faz-se necessário avaliar os seus diferentes sistemas de manejo, na procura por sistemas produtivos e que assegurem a sustentabilidade do solo.

O presente trabalho tem como objetivo analisar a influência do uso do solo e da rizosfera sobre as comunidades de *Bacteria* e do filo *Verrucomicrobia* em solos sob diferentes usos, provenientes de uma usina sucroalcooleira em Piracicaba (SP), através de métodos moleculares independentes de cultivo. Mais especificamente, o Capítulo 2 aborda os efeitos do uso do solo nas comunidades citadas e o Capítulo 3, a influência da rizosfera nestes solos em um experimento controlado de mesocosmos.

1.1 Revisão de literatura

1.1.1 Microbiota do solo

O solo pode ser considerado o mais diverso e importante ecossistema existente (ROGER-ESTRADE et al., 2010). Grande parte da sua diversidade é constituída por sua microbiota (TORSVIK; GOKSØYR; DAAE, 1990), composta, principalmente, por organismos dos Domínios *Archaea* e *Bacteria*, com riqueza e abundância de espécies consideravelmente maiores do que as de eucariotos presentes no solo (TORSVIK; ØVREÅS, 2002). Estima-se que o número de células de microrganismos no solo seja de $2,6 \times 10^{29}$ (WHITMAN; COLEMAN; WIEBE, 1998). As bactérias constituem o grupo mais estudado de microrganismos do solo (PEREIRA E SILVA et al., 2012), com aproximadamente 10^{10} a 10^{11} células (HORNER-DEVINE et al., 2003) e de 6.000 a 50.000 espécies (CURTIS; SLOAN; SCANNELL, 2002) por grama de solo.

A abundância e atividade dos microrganismos do solo podem ser influenciadas por um grande número de fatores, associados ao tipo de solo, como sua estrutura, textura, matéria orgânica, fertilidade, pH, umidade e temperatura; sua cobertura, pelo papel das plantas como principais fornecedoras de fontes de carbono e energia, e ao seu uso, incluindo as práticas de manejo utilizadas (GARBEVA; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004; GRAYSTON et al., 1998). Ademais, a microbiota é também afetada pelo seu relacionamento com os outros componentes da biota do solo (ØVREÅS, 2000; TORSVIK; ØVREAS; THINGSTAD, 2002). Nesse sentido, o entendimento dos fatores associados à diversidade do solo apresenta grande complexidade (TORSVIK; ØVREAS; THINGSTAD, 2002), mas seu estudo é de grande importância para o conhecimento da capacidade funcional do solo e das suas respostas

mediante ao estresse ambiental, seja natural ou antrópico (RANJARD; POLY; NAZARET, 2000; VAN HORN et al., 2013).

Os microrganismos do solo atuam em processos essenciais para o funcionamento de todos os ecossistemas terrestres, realizando a ciclagem de nutrientes, decompondo a matéria orgânica, formando e mantendo a estrutura do solo (JOHNSON; LEE; SCOW, 2003; KENNEDY; PAPENDICK, 1995; VAN DER HEIJDEN; BARDGETT; VAN STRAALLEN, 2008). O estudo da microbiota do solo apresenta grande importância pelos processos desempenhados pelos seus componentes e, conseqüentemente, pelo seu papel no sustento da qualidade e sustentabilidade desse ecossistema (JOHNSON; LEE; SCOW, 2003).

1.1.2 Filo *Verrucomicrobia*

O filo *Verrucomicrobia* constitui um grupo de microrganismos gram-negativos observados, pela primeira vez, há aproximadamente 80 anos (HENRICI; JOHNSON, 1935), mas apenas recentemente adicionados ao Domínio *Bacteria* (HEDLUND; GOSINK; STALEY, 1997). Em 1997, os organismos dos gêneros *Verrucomicrobium* e *Prostheobacter* foram agrupados em um grupo taxonômico de ordem superior (HEDLUND; GOSINK; STALEY, 1997) e, em 2001, o grupo passou a ser classificado como um filo bacteriano (GARRITY; HOLT, 2001).

Desde 1998, o grupo é dividido em cinco subdivisões monofiléticas, de acordo com análises das sequências do gene 16S rRNA de seus representantes (HUGENHOLTZ et al., 1998). Atualmente, o filo apresenta sete subdivisões (SCHLESNER; JENKINS; STALEY, 2006), sendo as subdivisões 1 (classe *Verrucomicrobiae*), 2 (classe *Spartobacteria*), 3 e 4 (classe *Opitutae*) as mais comumente encontrados em diferentes ambientes (FREITAS et al., 2012).

Pouco se sabe sobre a biologia do filo (SANGWAN et al., 2005), o que se deve, principalmente, ao baixo número de representantes cultivados até hoje (SCHLESNER; JENKINS; STALEY, 2006). Os isolados encontrados apresentam grande diversidade morfológica, normalmente em forma esférica ou de bastonete, e metabólica, incluindo organismos aeróbicos, anaeróbicos facultativos ou obrigatórios (ARNDS et al., 2010; SCHLESNER; JENKINS; STALEY, 2006). Através de estudos recentes, também foram detectados organismos metanotróficos presentes no filo, característica que até recentemente era apenas considerada pertencente ao filo *Proteobacteria*, com as classes *Alphaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria* (DUNFIELD et al., 2007; ISLAM et al., 2008;

OP DEN CAMP et al., 2009; POL et al., 2007). Todas as cepas encontradas eram acidófilas, com crescimento até mesmo abaixo de pH 1 (OP DEN CAMP et al., 2009).

Os organismos do filo foram inicialmente observados na água doce (HENRICI; JOHNSON, 1935), mas, atualmente, foram encontrados em ambientes marinhos (URAKAWA; KITA-TSUKAMOTO; OHWADA, 1999) solos (LIESACK; STACKEBRANDT, 1992), rizosferas de plantas (ROSENBERG et al., 2009), amostras fecais (FREY et al., 2006) e associados a outros organismos, incluindo humanos (SUAU et al., 1999). Representantes do filo foram encontrados em locais com diferentes temperaturas (SCHLESNER; JENKINS; STALEY, 2006) e em ambientes extremos, como fontes ricas em sulfeto (ELSHAHED et al., 2003), lagos com alto teor de soda cáustica (HUMAYOUN; BANO; HOLLIBAUGH, 2003) e em áreas geotérmicas na Nova Zelândia, Itália e Rússia (DUNFIELD et al., 2007; ISLAM et al., 2008; POL et al., 2007). A abundância do filo em diferentes ambientes sugere o seu potencial em exercer grande impacto ecológico (WERTZ et al., 2012).

O filo *Verrucomicrobia* é ubíquo em solos (ZHANG; XU, 2008) e comumente representa cerca de 1 a 10% da comunidade bacteriana (ARNDS et al., 2010; BUCKLEY; SCHMIDT, 2001; BUCKLEY; SCHMIDT, 2003; JANSSEN, 2006; KIELAK et al., 2008). Entretanto, estudos recentes indicaram que a abundância do filo tem sido subestimada e, que em muitos solos, o grupo pode ser dominante e encontrado em elevada abundância, chegando a compor até 23% da comunidade (BERGMANN et al., 2011). No solo rizosférico, onde as raízes das plantas exercem grande influência, o filo também é considerado dominante (ROSENBERG et al., 2009), porém, estudos com o grupo pouco indicaram seus ambientes preferenciais (DA ROCHA; VAN ELSAS; VAN OVERBEEK, 2011). Assim, apesar de sua representatividade em solos, poucas pesquisas foram feitas até hoje com foco específico na diversidade e abundância dos organismos do filo (BERGMANN et al., 2011) e, além disso, o conhecimento sobre os diferentes nichos ecológicos ocupados pelos seus subgrupos ainda é bastante limitado (FREITAS et al., 2012).

1.1.3 Efeito do uso do solo na microbiota

A crescente demanda mundial por fontes de energia alternativas e alimentos gera grande necessidade de áreas para as práticas agrícolas e pecuárias, atividades antrópicas essenciais para toda a sociedade (GUALBERTO; DE MELLO; NÓBREGA, 2003). As atividades de uso da terra, que alteram ambientes naturais ou o manejo de ambientes

antrópicos, transformaram grande parte da superfície terrestre (FOLEY et al., 2005) e podem colocar em risco a diversidade, pela perda de habitats naturais associada, principalmente, com o declínio da qualidade do solo e da água (FOLEY et al., 2005; PIMM; RAVEN, 2000).

Muitos estudos demonstraram o efeito do uso da terra na sua microbiota (LAUBER et al., 2008), que regula a estrutura das comunidades por alterar as características originais do solo (WANG et al., 2012). Assim, os microrganismos representam os indicadores mais sensíveis e rápidos associados ao uso da terra (GARCÍA-ORENES et al., 2013). Porém, pouco se sabe sobre como essas atividades têm modelado as comunidades microbianas e os processos por ela desempenhados, especialmente nos trópicos. Adicionalmente, poucas pesquisas foram feitas com enfoque na influência do uso do solo sobre grupos taxonômicos específicos (LAUBER et al., 2008).

Além da complexidade dos muitos fatores inter-relacionados que influenciam a abundância e a estrutura das comunidades microbianas, o estudo do efeito do uso do solo é dificultado pela falta de ecossistemas ou tipos de solos no quais diferentes sistemas de uso da terra podem ser analisados, pois áreas com características físico-químicas muito distintas podem dificultar o isolamento dos efeitos específicos causados pelo seu uso (WANG et al., 2012). Contudo, o estudo dessa influência é fundamental, devido ao papel dos microrganismos na qualidade do solo e na sua sustentabilidade (ROGER-ESTRADE et al., 2010), além da sua importância para os sistemas agrários, onde atuam no crescimento e na qualidade da colheita, e na resistência do sistema frente ao estresse ambiental (BRUSSAARD; DE RUITER, BROWN, 2007).

1.1.4 Cultivo de cana-de-açúcar

O cultivo de cana-de-açúcar, do gênero *Saccharum*, introduzido no Brasil colonial, apresenta grande importância social e econômica devido, principalmente, ao seu uso como matéria-prima para a indústria sucroalcooleira. Atualmente, o Brasil é considerado o seu maior produtor, que devido ao interesse mundial por fontes de energia sustentáveis e o aumento da demanda por biocombustíveis, tem seu mercado em crescimento (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). O Brasil apresenta aproximadamente $7,5 \times 10^6$ hectares cultivados, com o sudeste responsável por aproximadamente 70% do total produzido (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). Mas estimativas realizadas até 2022/2023 indicam um aumento de mais de 2×10^6 hectares nos próximos anos, com novas áreas incorporadas ou substituídas pelo cultivo (BRASIL, 2013).

Historicamente, a queimada na pré-colheita é adotada com o objetivo de reduzir os custos do corte e do transporte (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011), prática que influencia nos atributos físicos, químicos e biológicos do solo, além de causar danos ao meio ambiente e a saúde pública (DE SOUZA et al., 2005). Em 2002, foi aprovada, no Estado de São Paulo, a Lei n.11.241, que tem como objetivo eliminar as queimadas, estabelecendo diferentes metas até 2031, de acordo com as características das áreas plantadas (SÃO PAULO, 2002). Todavia, estudos indicam que apesar das áreas com queimadas serem proporcionalmente menores do que as demais, o tamanho das mesmas é ainda bastante representativo (MATAVELI et al., 2014).

O manejo de colheita com queima elimina a matéria seca e aumenta a quantidade de gás carbônico emitido para a atmosfera, contribuindo com o efeito estufa (DE SOUZA et al., 2005). As queimadas também diminuem o teor de matéria orgânica do solo e afetam a biomassa microbiana, a matéria orgânica particulada e a atividade enzimática do solo (RACHID et al., 2013). Assim, o uso da terra pode afetar a comunidade microbiana (LAUBER et al., 2008), porém o manejo escolhido também causa grande impacto (SOUZA et al., 2012). Nesse sentido, pela importância das atividades agropecuárias, torna-se clara a necessidade de analisar diferentes formas de manejo, na busca por sistemas produtivos e que assegurem a qualidade e sustentabilidade do solo.

1.1.5 Técnicas moleculares independentes de cultivo em Ecologia Microbiana

A diversidade microbiana foi estudada por muitos anos pelo cultivo e isolamento de microrganismos (RANJARD; POLY; NAZARET, 2000). No solo, estima-se que menos de 1% dos microrganismos podem ser cultivados e isolados pelos métodos tradicionais em laboratório, com sua maioria ainda desconhecida (TORSVIK; GOKSØYR; DAAE, 1990; TORSVIK; ØVREÅS, 2002). O progresso no campo da biologia molecular e o consequente desenvolvimento de metodologias independentes de cultivo permitiram a descoberta dos microrganismos incultiváveis do solo e, consequentemente, aumentaram a sensibilidade dos estudos da área (RANJARD; POLY; NAZARET, 2000; TORSVIK; GOKSØYR; DAAE, 1990). Nesse sentido, as técnicas moleculares trouxeram um maior entendimento sobre a diversidade microbiana no solo (HILL et al., 2000), além de possibilitarem o estudo mais detalhado de grupos particulares (KIRK et al., 2004).

As metodologias independentes de cultivo em Ecologia Microbiana comumente consistem em extrair os ácidos nucleicos, DNA ou RNA, do ambiente de interesse e analisar, completa ou parcialmente, o material genético das comunidades microbianas presentes, de acordo com o objetivo do estudo (RANJARD; POLY; NAZARET, 2000). Grande parte das metodologias atuais foi criada a partir da técnica de PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*), que permite amplificar sequências de nucleotídeos de forma rápida e segura (MULLIS, 1990). A sequência a ser amplificada no PCR é definida por pequenos fragmentos, chamados de *primers*, capazes de hibridizar com a sequência de interesse (BIRKENMEYER; MUSHAHWAR, 1991).

Dentre as sequências estudadas na área, destaca-se o gene 16S rRNA, segmento de DNA encontrado em todas os organismos dos Domínios *Archaea* e *Bacteria* (KIRK et al., 2004). O gene 16S rRNA tem sido amplamente utilizado para inferência filogenética, pois apresenta regiões conservadas, que podem ser usadas para agrupar diferentes grupos microbianos, e hipervariáveis, que permitem distinguir grupos específicos dos demais (CLARRIDGE, 2004; MIZRAHI-MAN; DAVENPORT; GILAD, 2013). O gene 16S rRNA apresenta aparente ausência de transferência horizontal e grande quantidade de sequências disponíveis em bancos de dados (AMANN; LUDWIG, 2000).

1.1.6 Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)

A análise de T-RFLP (do inglês *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) determina o polimorfismo no comprimento dos fragmentos terminais obtidos a partir da digestão de um produto de interesse amplificado pela técnica de PCR (LIU et al., 1997). O T-RFLP é amplamente utilizado na área de Ecologia Microbiana, pois permite compreender a estrutura de comunidades de bactérias, arqueias e fungos (SCHÜTTE et al., 2008), além de grupos filogenéticos ou funcionais de interesse (THIES, 2007). A análise comparativa de comunidades por T-RFLP permite diferenciar a estrutura e funcionamento das mesmas e, além disso, experimentos associados a fatores ambientais específicos possibilitam o entendimento dos seus efeitos na comunidade microbiana (MARSH et al., 2000).

Para a metodologia de T-RFLP ser realizada, é necessário, primeiramente, extrair os ácidos nucleicos da amostra e amplificar a sequência de interesse pela técnica de PCR, realizada com um dos *primers*, *forward* ou *reverse*, marcado com um fluoróforo em sua extremidade (LIU et al., 1997), como os corantes HEX, FAM e ROX (THIES, 2007). Apesar de, teoricamente, qualquer gene com sequências disponíveis na literatura e suficientemente

polimórfico poder ser usado (THIES, 2007), o gene 16S rRNA destaca-se como o mais importante no estudo de comunidades de bactérias e arqueias por T-RFLP. Depois, o produto de PCR resultante deve ser purificado e digerido com duas a quatro enzimas, o que aumenta a confiabilidade das inferências filogenéticas da técnica (TIEDJE et al., 1999), com locais de reconhecimento de quatro pares de bases (LIU et al., 1997; SCHÜTTE et al., 2008). Por fim, os fragmentos obtidos devem ser detectados e analisados em sequenciador automatizado (LIU et al., 1997).

O resultado do sequenciador é apresentado na forma de um eletroferograma, em que cada pico representa um fragmento, chamado de T-RF (THIES, 2007). O material genético de diferentes organismos que possuem locais de clivagem distintos produzirá fragmentos de diferentes tamanhos. Porém, como se considera que organismos distintos podem compartilhar T-RFs de mesmo comprimento, cada um é considerado uma unidade taxonômica operacional (UTO) (THIES, 2007).

Atualmente, uma grande variedade de métodos estatísticos multivariados tem sido empregada na análise dos dados de T-RFLP (THIES, 2007). Assim, a metodologia da técnica de T-RFLP pode ser utilizada para a análise da diversidade da comunidade microbiana em diferentes ambientes (LIU et al., 1997), além de ser considerada rápida e altamente reproduzível (THIES, 2007). Mas é importante destacar que essa análise pode subestimar a diversidade das comunidades analisadas, pois como outras metodologias baseadas na técnica de PCR, apenas os organismos numericamente dominantes podem ser detectados pela grande quantidade de material genético disponível (KIRK et al., 2004).

1.1.7 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A metodologia de PCR permite amplificar sequências de forma exponencial. Contudo, diferentes fatores podem alterar essa taxa ao passar dos ciclos, na chamada fase platô, e assim, a quantidade final do produto de interesse pode ser variável entre diferentes reações (GINZINGER, 2002). Nesse sentido, o PCR tradicional mostra-se pouco seguro para o estabelecimento da quantidade inicial de uma amostra, pois os produtos gerados no PCR podem apenas ser quantificados após o seu término (GINZINGER, 2002; HIGUCHI et al., 1993). Derivada do PCR, a metodologia de PCR quantitativo em tempo real permite quantificar as sequências de interesse em sua fase exponencial e, assim, com resultados independentes da fase platô, a quantidade inicial da amostra pode ser extrapolada e calculada

de maneira precisa e com grande reprodutibilidade (GACHON; MINGAM; CHARRIER, 2004; GINZINGER, 2002; NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

O PCR quantitativo em tempo real detecta e mede os produtos formados ao final de cada ciclo (GINZINGER, 2002), com o uso de corantes intercalantes, *primers* ou sondas fluorescentes que hibridizam com a sequência de interesse (GAŠPARIČ et al., 2009). Independente do sistema de fluorescência utilizado, a metodologia de qPCR necessita de uma plataforma composta de termociclador com sistema capaz de capturar a fluorescência emitida em cada ciclo e computador com programa capaz de coletar e gravar os dados (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; SMITH; OSBORN, 2008). O ponto mais importante para o qPCR, chamado de Ct, ocorre na fase exponencial, quando a fluorescência do produto demonstra-se significativamente maior que a fluorescência de fundo (HEID et al., 1996). O ponto Ct representa a origem para a medida correta da quantidade inicial da sequência de interesse na amostra, sendo diretamente proporcional a mesma (GINZINGER, 2002; NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

A determinação da quantidade do gene na amostra inicial pode ser realizada de forma relativa, com a sequência de interesse comparada com um gene de referência conhecido (PFAFFL, 2001), ou absoluta, com a amostra quantificada a partir de uma curva padronizada com diferentes quantidades do gene de interesse (SMITH; OSBORN, 2008).

A metodologia de PCR quantitativo em tempo real tem sido amplamente utilizada em Ecologia Microbiana para determinar a quantidade de diferentes genes em amostras ambientais (SMITH; OSBORN, 2008). O qPCR possibilita determinar a abundância de comunidades de forma segura e robusta (FIERER et al., 2005) e monitorar grupos taxonômicos ou funcionais de interesse em escala temporal ou espacial (SMITH; OSBORN, 2008).

1.1.8 Bibliotecas de clones

O estudo de clones isolados diretamente de ambientes naturais consiste em uma importante metodologia para caracterizar a microbiota do solo, de modo que a diversidade da comunidade pode ser determinada (RANJARD; POLY; NAZARET, 2000; RONDON et al., 2000). O desenvolvimento de uma biblioteca de clones compreende extrair os ácidos nucléicos da amostra, amplificar o gene de interesse por PCR, clonar os produtos resultantes e sequenciar os clones isolados (HEAD; SAUNDERS; PICKUP, 1998).

De maneira detalhada, o PCR resulta em uma mistura heterogênea de sequências que precisam ser separadas para sua análise e, nesse sentido, a clonagem molecular, que consiste em inserir o gene de interesse dentro de células especializadas e as isolar na forma de colônias (LIMA, 2008), permite separar fragmentos de tamanhos idênticos, mas com sequências diferentes (HEAD; SAUNDERS; PICKUP, 1998; WINTZINGERODE; GÖBEL; STACKEBRANDT, 1997). As sequências encontradas podem ser comparadas com as disponíveis em bancos de dados específicos (HEAD; SAUNDERS; PICKUP, 1998; RANJARD; POLY; NAZARET, 2000). A abordagem mais utilizada para analisar a diversidade bacteriana é baseada em bibliotecas de clones do gene 16S rRNA (COTTRELL; KIRCHMAN, 2000). Essa metodologia tem permitido identificar microrganismos desconhecidos e possibilitado o estudo de grupos microbianos pouco representados pelas metodologias tradicionais.

REFERÊNCIAS

- AMANN, R.; LUDWIG, W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, n. 5, p. 555-565, 2000.
- ARNDS, J.; KNITTEL, K.; BUCK, U.; WINKEL, M.; AMANN, R. Development of a 16S rRNA-targeted probe set for *Verrucomicrobia* and its application for fluorescence in situ hybridization in a humic lake. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 33, n. 3, p. 139-148, 2010.
- BENDING, G. D.; TURNER, M. K.; RAYNS, F.; MARX, M.; WOOD, M. Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, n. 11, p. 1785-1792, 2004.
- BERGMANN, G. T.; BATES, S. T.; EILERS, K. G.; LAUBER, C. L.; CAPORASO, J. G.; WALTERS, W. A.; KNIGHT, R.; FIERER, N. The under-recognized dominance of *Verrucomicrobia* in soil bacterial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 43, n. 7, p. 1450-1455, 2011.
- BIRKENMEYER, L. G.; MUSHAHWAR, I. K. DNA probe amplification methods. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 35, n. 2, p. 117-126, 1991.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do agronegócio: Brasil 2012/2013 a 2022/2023**. Brasília, DF: MAPA, ACS, 2013. 96 p.
- BRUSSAARD, L.; DE RUITER, P. C.; BROWN, G. G. Soil biodiversity for agricultural sustainability. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 121, n. 3, p. 233-244, 2007.

BUCKLEY, D. H.; SCHMIDT, T. M. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 6, p. 441-452, 2003.

BUCKLEY, D. H.; SCHMIDT, T. M. Environmental factors influencing the distribution of rRNA from *Verrucomicrobia* in soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 105-112, 2001.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; DE ABREU, H. M. C.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J. C.; BURNQUIST, W. L.; CRESTE, S.; DI CIERO, L.; FERRO, J. A.; FIGUEIRA, A. V. O.; FILGUEIRAS, T. S.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; GUZZO, E. C.; HOFFMANN, H. P.; LANDELL, M. G. A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F. C.; ROMANO, E.; SILVA, W. J.; SILVA FILHO, M. C.; CÉSAR, E. Sugarcane (*Saccharum × officinarum*): A reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 4, n. 1, p. 62-89, 2011.

CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 17, n. 4, p. 840-862, 2004.

COTTRELL, M. T.; KIRCHMAN, D. L. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence *in situ* hybridization. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 66, n. 12, p. 5116-5122, 2000.

CURTIS, T. P.; SLOAN, W. T.; SCANNELL, J. W. Estimating prokaryotic diversity and its limits. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 99, n. 16, p. 10494-10499, 2002.

DA ROCHA, U. N.; VAN ELSAS, J. D.; VAN OVERBEEK, A. S. *Verrucomicrobia* subdivision 1 strains display a difference in the colonization of the leek (*Allium porrum*) rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 78, n. 2, p. 297-305, 2011.

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

DUNFIELD, P. F.; YURYEV, A.; SENIN, P.; SMIRNOVA, A. V.; STOTT, M. B.; HOU, S.; LY, B.; SAW, J. H.; ZHOU, Z.; REN, Y.; WANG, J.; MOUNTAIN, B. W.; CROWE, M. A.; WEATHERBY, T. M.; BODELIER, P. L.; LIESACK, W.; FENG, L.; WANG, L.; ALAM, M. Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum *Verrucomicrobia*. **Nature**, London, v. 450, p. 879-882, 2007.

ELSHAHED, M. S.; SENKO, J. M.; NAJAR, F. Z.; KENTON, S. M.; ROE, B. A.; DEWERS, T. A.; SPEAR, J. R.; KRUMHOLZ, L. R. Bacterial diversity and sulfur cycling in a mesophilic sulfide-rich spring. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 69, n. 9, p. 5609-5621, 2003.

FIERER, N.; JACKSON, J. A.; VILGALYS, R.; JACKSON, R. B. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 71, n. 7, p. 4117-4120, 2005.

FOLEY, J. A.; DEFRIES, R.; ASNER, G. P.; BARFORD, C.; BONAN, G.; CARPENTER, S. R.; CHAPIN, F. C.; COE, M. T.; DAILY, G. C.; GIBBS, H. K.; HELKOWSKI, J. H.; HOLLOWAY, T.; HOWARD, E. A.; CKUCHARIK, C. J.; MONFREDA, C.; PATZ, J. A.; PRENTICE, I. C.; RAMANKUTTY, N.; SNYDER, P. K. Global consequences of land use. **Science**, Washington, DC, v. 309, n. 5734, p. 570-574, 2005.

FREITAS, S.; HATOSY, S.; FUHRMAN, J. A.; HUSE, S. M.; WELCH, D. B. M.; SOGIN, M. L.; MARTINY, A. C. Global distribution and diversity of marine *Verrucomicrobia*. **The ISME Journal**, London, v. 6, p. 1499-1505, 2012.

FREY, J. C.; ROTHMAN, J. M.; PELL, A. N.; NIZEYI, J. B.; CRANFIELD, M. R.; ANGERT, E. R. Fecal bacterial diversity in a wild gorilla. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 72, n. 5, p. 3788-3792, 2006.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: What relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 402, p. 1445-1454, 2004.

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

GARCÍA-ORENES, F.; MORUGÁN-CORONADO, A.; ZORNOZA, R.; SCOW, K. Changes in soil microbial community structure influenced by agricultural management practices in a mediterranean agro-ecosystem. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. 1-9, 2013.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The road map to the Manual. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W.; GARRITY, G. M. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2001. v. 1, p. 119-166.

GAŠPARIČ, M. B.; TENGS, T.; LA PAZ, J. L.; HOLST-JENSEN, A.; PLA, M.; ESTEVE, T.; ŽEL, J.; GRUDEN, K. Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 396, n. 6, p. 2023-2029, 2010.

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, Copenhagen, v. 30, n. 6, p. 503-512, 2002.

GRAYSTON, S. J.; WANG, S.; CAMPBELL, C. D.; EDWARDS, A. C. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 369-378, 1998.

GUALBERTO, V.; DE MELLO, C. R.; NÓBREGA, J. C. A. O uso do solo no contexto agroecológico: Uma pausa para reflexão. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 24, n. 220, p. 18-28, 2003.

HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, New York, v. 35, n. 1, p. 1-21, 1998.

HEDLUND, B. P.; GOSINK, J. J.; STALEY, J. T. *Verrucomicrobia* div. nov., a new division of the *Bacteria* containing three new species of *Prostheobacter*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 72, n. 1, p. 29-38, 1997.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, New York, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

HENRICI, A. T.; JOHNSON, D. E. Studies of freshwater bacteria. II. Stalked bacteria, a new order of *Schizomycetes*. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 30, n. 1, p. 61-93, 1935.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, New York, v. 11, n. 9, p. 1026-1030, 1993.

HILL, G. T.; MITKOWSKI, N. A.; ALDRICH-WOLFE, L.; EMELE, L. R.; JURKONIE, D. D.; FICKE, A.; MALDONADO-RAMIREZ, S.; LYNCH, S. T.; NELSON, E. B. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p. 25-36, 2000.

HORNER-DEVINE, M. C.; LEIBOLD, M. A.; SMITH V. H.; BOHANNAN, B. J. M. Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. **Ecology Letters**, Oxford, v. 6, n. 7, p. 613-622, 2003.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 180, n. 18, p. 4765-4774, 1998.

HUMAYOUN, S. B.; BANO, N.; HOLLIBAUGH, J. T. Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda lake in California. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 69, n. 2, p. 1030-1042, 2003.

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

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

JOHNSON, M. J.; LEE, K. Y.; SCOW, K. M. DNA fingerprinting reveals links among agricultural crops, soil properties, and the composition of soil microbial communities. **Geoderma**, Amsterdam, v. 114, n. 3-4, p. 279-303, 2003.

KENNEDY, A. C.; PAPENDICK, R. I. Microbial characteristics of soil quality. **Journal of Soil and Water Conservation**, Ankeny, v. 50, n. 3, p. 243-248, 1995.

KIELAK, A.; PIJL, A. S.; VAN VEEN, J. A.; KOWALCHUK, G. A. Differences in vegetation composition and plant species identity lead to only minor changes in soil-borne microbial communities in a former arable field. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 63, n. 3, p. 372-382, 2008.

KIRK, J. L.; BEAUDETTEA, L. A.; HARTB, M.; MOUTOGLISC, P.; KLIRONOMOSB, J. N.; LEEA, H.; TREVORSA, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 169-188, 2004.

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

LIESACK, W.; STACKEBRANDT, E. Occurrence of novel groups of the domain *Bacteria* as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 174, n. 15, p. 5072-5078, 1992.

LIMA, L. M. **Conceitos básicos de técnicas em biologia molecular**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2008. 27 p. (Documentos, 191).

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

MARSH, T. L.; SAXMAN, P.; COLE, J.; TIEDJE, J. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 66, n. 8, p. 3616-3620, 2000.

MATAVELI, G. A. V.; OLIVEIRA, B. S.; PEREIRA, G.; MORAES, E. C.; CARDOZO, F. S. Dinâmica dos focos de queimada em cana-de-açúcar no estado de São Paulo entre 2008 e 2011. **Revista Brasileira de Cartografia**, Brasília, DF, v. 66, n. 2, p. 379-392, 2014.

MIZRAHI-MAN, O.; DAVENPORT, E. R.; GILAD, Y. Taxonomic classification of bacterial 16S rRNA genes using short sequencing reads: evaluation of effective study designs. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 1, 2013.

MULLIS, K. B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. **Annales de Biologie Clinique**, Paris, v. 48, n. 8, p. 579-582, 1990.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Anápolis, n. 33, p. 10-13, 2003.

OP DEN CAMP, H. J. M.; ISLAM, T.; STOTT, M. B.; HARHANGI, H. R.; HYNES, A.; SCHOUTEN, S.; JETTEN, M. S. M.; BIRKELAND, N.; POL, A.; DUNFIELD, P. F. Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic *Verrucomicrobia*. **Environmental Microbiology Reports**, Hoboken, v. 1, n. 5, p. 293-306, 2009.

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

PEREIRA E SILVA, M. C.; DIAS, A. C. F.; VAN ELSAS, J. D.; SALLES, J. F. Spatial and temporal variation of archaeal, bacterial and fungal communities in agricultural soils. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 12, 2002.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 9, e.45, 2001.

PIMM, S. L.; RAVEN, P. Biodiversity: Extinction by numbers. **Nature**, London, v. 403, p. 843-845, 2000.

POL, A.; HEIJMANS, K.; HARHANGI, H. R.; TEDESCO, D.; JETTEN, M. S. M.; OP DEN CAMP, H. J. M. Methanotrophy below pH 1 by a new *Verrucomicrobia* species. **Nature**, London, v. 450, p. 874-878, 2007.

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

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, n. 3, p. 167-177, 2000.

ROGER-ESTRADE, J.; ANGER, C.; BERTRAND, M.; RICHARD, G. Tillage and soil ecology: Partners for sustainable agriculture. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 33-40, 2010.

RONDON, M. R.; AUGUST, P. R.; BETTERMANN, A. D.; BRADY, S. F.; GROSSMAN, T. H.; LILES, M. R.; LOIACONO, K. A.; LYNCH, B. A.; MACNEIL, I. A.; MINOR, C.; TIONG, C. L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M. S.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R. M. Cloning the soil metagenome: A strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 66, n. 6, p. 2541-2147, 2000.

ROSENBERG, K.; BERTAUX, J.; KROME, K.; HARTMANN, A.; SCHEU, S.; BONKOWSKI, M. Soil amoebae rapidly change bacterial community composition in the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana*. **The ISME Journal**, London, v. 3, p. 675-684, 2009.

SANGWAN, P.; KOVAC, S.; DAVIS, K. E. R.; SAIT, M.; JANSSEN, P. H. Detection and cultivation of soil *Verrucomicrobia*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 71, n. 12, p. 8402-8410, 2005.

SÃO PAULO (Estado). Lei estadual nº 11.241, de 19 de setembro de 2002. Dispõe sobre a eliminação gradativa da queima da palha da cana-de-açúcar e dá providências correlatas. **Diário Oficial do Estado de São Paulo, Poder Executivo**, São Paulo, SP, 20 set. 2002. Seção I, p. 2.

SCHLESNER, H.; JENKINS, C.; STALEY, J. T. The phylum *Verrucomicrobia*: a phylogenetically heterogeneous bacterial group. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The Prokaryotes**. Vol. 7: Proteobacteria: Delta and Epsilon Subclasses. Deeply Rooting Bacteria. 3. ed. Amsterdam: Springer, 2006. p. 881-896.

SCHÜTTE, U. M. E.; ABDO, Z.; BENT, S. J.; SHYU, C.; WILLIAMS, C. J.; PIERSON, J. D.; FORMEY, L. J. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 80, n. 3, p. 365-380, 2008.

SMITH, C. J.; OSBORN, A. M. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 67, n. 1, p. 6-20, 2009.

SOUZA, R. A.; TELLES, T. S.; MACHADO, W.; HUNGRIA, M.; TAVARES FILHO, J.; GUIMARÃES, M. F. Effects of sugarcane harvesting with burning on the chemical and microbiological properties of the soil. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 155, p. 1-6, 2012.

SUAU, A.; BONNET, R.; SUTREN, M.; GODON, J. J.; GIBSON, G. R.; COLLINS, M. D.; DORÉ, J. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 65, n. 11, p. 4799-807, 1999.

THIES, J. E. Soil microbial community analysis using terminal restriction fragment length polymorphisms. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 71, n. 2, p. 579-591, 2007.

TIEDJE, J. M.; ASUMING-BREMPPONG, S.; NÜSSLEIN, K.; MARSH, T. L.; FLYNN, S. J. Opening the black box of soil microbial diversity. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 109-122, 1999.

TORSVIK, V.; GOKSØYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 56, n. 3, p. 782-787, 1990.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 5, n. 3, p. 240-245, 2002.

TORSVIK, V.; ØVREAS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity - Magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, Washington, DC, v. 296, n. 5570, p. 1064-1066, 2002.

URAKAWA, H.; KITA-TSUKAMOTO, K.; OHWADA, K. Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis. **Microbiology**, Reading, v. 145, p. 3305-3315, 1999.

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

VAN HORN, D. J.; LEE VAN HORN, M.; BARRETT, J. E.; GOOSEFF, M. N.; ALTRICHTER, A. E.; GEYER, K. M.; ZEGLIN, L. H.; TAKACS-VESBACH, C. D. Factors controlling soil microbial biomass and bacterial diversity and community composition in a cold desert ecosystem: Role of geographic scale. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 6, 2013.

WANG, B.; ZHANG, C.; LIU, J.; ZENG, X. W.; LI, F.; WU, Y.; LIN, X.; XIONG, Z.; XU, J.; JIA, Z. Microbial community changes along a land-use gradient of desert soil origin. **Pedosphere**, Beijing, v. 22, n. 5, p. 593-603, 2012.

WERTZ, J. T.; KIM, E.; BREZNAK, J. A.; SCHMIDT, T. M.; RODRIGUES, J. L. M. Genomic and physiological characterization of the *Verrucomicrobia* isolate *Diplosphaera colitermitum* gen. nov., sp. nov., reveals microaerophily and nitrogen fixation genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 78, n. 5, p. 1544-1555, 2012.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: The unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 95, n. 12, p. 6578-6583, 1998.

WINTZINGERODE, F. V.; GÖBEL, U. B.; STACKEBRANDT, E. Determination of microbial diversity in environmental samples: Pitfalls of PCR-based rRNA analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 21, n. 3, p. 213-229, 1997.

ZHANG, L.; XU, Z. Assessing bacterial diversity in soil. **Journal of Soils and Sediments**, Landsberg, v. 8 n. 6, p. 379-388, 2008.

2 ESTRUTURA E ABUNDÂNCIA DE COMUNIDADES DE *BACTERIA* E DO FILO *VERRUCOMICROBIA* EM SOLOS SOB DIFERENTES USOS EM PIRACICABA (SP)

Resumo

O uso do solo pode afetar os microrganismos de diferentes maneiras, mas o estudo dos fatores ambientais e a escala em que alteram a abundância e estrutura das comunidades apresenta grande complexidade. A pesquisa com grupos microbianos específicos pode ajudar a elucidar a dinâmica desses processos, como o filo *Verrucomicrobia*, grupo bacteriano dominante em solos. Diferentes estudos indicam que seus organismos podem ser afetados pelo seu uso, mas ainda pouco se sabe sobre a ecologia do filo e de suas subdivisões. A indústria sucroalcooleira é considerada como uma das principais atividades econômicas do Brasil, e está em crescimento pelo uso do etanol como energia alternativa. Porém, diferentes sistemas de manejo podem ser adotados nos canaviais, com efeitos distintos sobre a sua microbiota. Nesse sentido, o presente trabalho tem como objetivo detectar, quantificar e caracterizar a comunidade de *Bacteria* e do filo *Verrucomicrobia* em solos de uma usina sucroalcooleira na cidade de Piracicaba (SP). A coleta de solo foi realizada em um canavial com manejo de colheita sem queima, com queima e uma área de vegetação nativa. Em cada uma, o solo foi amostrado na camada entre 0 a 10 cm em cinco pontos cardeais, separados por 20 metros cada. Foram determinadas as propriedades físico-químicas e o teor de água de cada ponto amostrado. O DNA total do solo de cada ponto foi extraído em duplicata. Foram realizadas as técnicas de T-RFLP e qPCR do gene 16S rRNA de ambos os grupos e, para acessar a diversidade do filo, desenvolvidas bibliotecas de clones dos seus representantes para cada ambiente estudado. Através dos parâmetros analisados, ambas as comunidades diferiram em sua estrutura e quantidade entre as áreas de estudo. O filo, assim como estudos anteriores indicaram, foi significativamente correlacionado com a umidade dos solos. Sua abundância e diversidade foram maiores nos solos da área de mata nativa, o que melhor demonstrou o efeito das atividades antrópicas do solo no grupo. Além disso, a riqueza e abundância de suas subdivisões diferiram de acordo com o uso do solo. De forma geral, os resultados demonstraram que, além do seu uso, o manejo adotado em cada ambiente apresentou grande efeito nas comunidades, o que evidencia a importância de sistemas conservacionistas.

Palavras-chave: Comunidade bacteriana, filo *Verrucomicrobia*, gene 16S rRNA, T-RFLP, PCR em tempo real, sistemas agrícolas.

2 STRUCTURE AND ABUNDANCE OF *BACTERIA* AND *VERRUCOMICROBIA* COMMUNITIES IN SOILS UNDER DIFFERENT LAND USES IN PIRACICABA (SP)

Abstract

Land use can affect the microorganisms in different manners, but the study of environmental factors and the scale at which alter the abundance and structure of the community has great complexity. The research on specific microbial groups can help to elucidate the dynamics of these processes, as the phylum *Verrucomicrobia*, dominant bacterial group in soil. Different studies indicate that its organisms can be affected by land use, but little is known about the ecology of the phylum and its subdivisions. The sugar and alcohol industry is considered as one of the main economic activities in Brazil, and is growing due to the use of ethanol as an alternative energy. However, different management systems can be adopted in the sugarcane fields, with distinct effects on its microbiota. In this sense, this work aims to detect, quantify and characterize *Bacteria* and *Verrucomicrobia* communities in soils of a sugarcane mill in Piracicaba (SP). The soil sampling was carried out on a sugarcane field with harvest management without burning, with burning and in a native vegetation area. In each one, the soil was sampled from the 0-10 cm layer in five cardinal points, each separated by 20 meters. The physicochemical properties and the water content of each sampled point were determined. The total soil DNA was extracted from each point in duplicate. The techniques of T-RFLP and qPCR of 16S rRNA gene from both groups were performed, and to access the phylum diversity, developed clone libraries of its organisms for each environment studied. Through different parameters analyzed, both communities differed in structure and quantity between the study areas. The phylum, as previous works have indicated, was significantly correlated with soil moisture. Its abundance and diversity were higher in soils of the native vegetation area, which demonstrated the effect of soil anthropic activities on the group. In addition, the richness and abundance of its subdivisions differed according to the land use. Overall, the different results showed that, apart from its use, the management adopted in each environment had a large effect on the communities, which evidences the importance of conservationist systems.

Keywords: Bacterial community, phylum *Verrucomicrobia*, 16S rRNA gene, T-RFLP, real time PCR, agricultural systems.

2.1 Introdução

No Brasil, o setor sucroalcooleiro tem se expandido pelo interesse mundial por fontes de energia sustentáveis, como o etanol (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). O crescimento previsto para os próximos anos necessita ser acompanhado de sistemas de manejo que assegurem a qualidade e sustentabilidade do solo. Atualmente, o manejo de colheita com queima ainda é utilizado com frequência e pode alterar diferentes atributos do solo (DE SOUZA et al., 2005). Nesse sentido, considera-se que determinados sistemas podem alterar a qualidade do solo (ISLAM; WEIL, 2000; VAN BRUGGEN; SEMENOV, 2000), frequentemente associada a uma grande diversidade biológica (KARLEN et al., 1997; VAN BRUGGEN; SEMENOV, 2000).

Os microrganismos constituem grande parte dessa diversidade (TORSVIK; GOKSØYR; DAAE, 1990) e podem ser afetados pelo uso do solo (LAUBER et al., 2008), com influência também do sistema de manejo empregado (GARBEVA; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004). As pesquisas sobre os efeitos do uso do solo na estrutura e abundância das comunidades microbianas comumente se restringem a entender se as comunidades de diferentes ambientes se assemelham ou diferem entre si. Porém, o estudo detalhado desses efeitos em grupos microbianos específicos pode permitir identificar fatores ambientais importantes dentro do sistema e a escala em que esses influenciam a estrutura das comunidades (BUCKLEY; SCHMIDT, 2001b).

Nesse contexto, o filo bacteriano *Verrucomicrobia* pode apresentar grande importância para os estudos sobre o tema, pela sua dominância e grande representatividade em solos (BERGMANN et al., 2011), o que sugere que seus organismos possam exercer grande impacto na ecologia desse e de outros diferentes ecossistemas (WERTZ et al., 2012). Estudos indicam que seus membros podem ser afetados por características ambientais que mudam de acordo com o uso do solo (BUCKLEY; SCHMIDT, 2001a). Porém, poucos estudos foram feitos até hoje com foco específico na sua diversidade e abundância (BERGMANN et al., 2011).

O filo foi recentemente separado em sete subdivisões monofiléticas, com base na análise do gene 16S rRNA de seus representantes (SCHLESNER; JENKINS; STALEY, 2006), contudo pouco se sabe sobre a ecologia desses subgrupos, incluindo quais e como os mesmos podem ser afetados pelo uso do solo e por diferentes sistemas de manejo.

2.2 Objetivos

Entender o efeito do uso do solo sobre comunidades de organismos de *Bacteria* e do filo *Verrucomicrobia* em solos coletados em uma usina sucroalcooleira em Piracicaba (SP) através de métodos moleculares independentes de cultivo.

2.2.1 Objetivos específicos

1. Analisar a estrutura, pela técnica de T-RFLP, e quantificar, pela técnica de qPCR, as comunidades microbianas em solos sob diferentes usos;
2. Caracterizar as comunidades do filo pelo sequenciamento do seu gene 16S rRNA, de forma a elucidar o efeito do uso do solo na sua diversidade.

2.3 Material e métodos

2.3.1 Coleta e processamento das amostras de solo

A área de estudo situa-se nas fazendas adjacentes Padre Guilherme e São Benedito, localizadas no distrito de Artemis, na cidade de Piracicaba, no Noroeste do estado de São Paulo. O município apresenta altitude média de 570 m. Segundo o sistema classificatório do clima de Köppen, Piracicaba possui clima Cwa, subtropical úmido com estiagem no inverno, com temperatura média do mês mais frio inferior a 18° C e temperatura média do mês mais quente acima de 22° C (FURLAN; FOLEGATTI, 2002), com índice pluviométrico entre 1.100 a 1.700 mm (DEMATTE; TOLEDO; SIMÕES, 2004). O clima Cwa é típico do Sudeste do Brasil e abrange 17,4% do estado (ALVARES et al., 2013).

A coleta de solo foi realizada no mês de fevereiro de 2013 em três áreas adjacentes das fazendas: (1) canavial com manejo de colheita sem queima desde o ano de 2002 (S 22°41.423' W 47°47.105'); (2) canavial com manejo de colheita com queima desde a década de 60 (S 22°41.389' W 47°47.839') e (3) área com vegetação nativa (S 22°41.133' W 47°47.445') (Figura 2.1). Em cada área, a coleta de solo foi realizada em cinco pontos, com um ponto central e outros quatro pontos cardeais, direcionados para o Norte, Sul, Leste e Oeste com pelo menos 20 m de distância do ponto central (Figura 2.2). Em cada ponto cardinal, foram determinados cinco subpontos. Em cada subponto, a camada de

serapilheira foi retirada e o solo foi coletado na camada entre 0 a 10 cm, com o uso de tubos esterilizados de 10 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro, introduzidos no solo.

Figura 2.1 - Imagem das três áreas de estudo, registradas no dia da coleta de solo, no mês de fevereiro de 2013

Após a coleta, o material foi transportado para o Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). Os solos coletados nos tubos dos subpontos de um mesmo ponto cardinal foram misturados e homogeneizados. De cada amostra composta, foi armazenada uma alíquota em *ultrafreezer* a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para as análises moleculares posteriores. O solo excedente de cada amostra foi armazenado em câmara fria a $6\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figura 2.2 - Esquema da amostragem realizada em cada área em cinco pontos cardiais, separados por 20 m cada. Em cada ponto, foram coletadas amostras de solo em cinco subpontos da camada entre 0 a 10 cm

2.3.2 Análise físico-química das amostras de solo

De cada ponto, aproximadamente 600 g de solo foram enviadas para o Laboratório de Análises Químicas do Departamento de Ciência do Solo, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), para a análise físico-química. Dentre as propriedades químicas das amostras, foram realizadas as análises de pH em água; pH em cloreto de potássio a 1 mol/L; fósforo, potássio pelo método Mehlich 1; cálcio e magnésio pela extração de acetato de amônio 1 mol/L; alumínio pela extração de cloreto de potássio 1 mol/L; acidez potencial pela extração de acetato de cálcio 1 mol/L; cálculos SB (soma de bases), CTC (capacidade de troca de cátions), V (saturação por bases), m (saturação em alumínio); matéria orgânica, pelo método de dicromato/titulométrico; nitrogênio total, pelo método de digestão sulfúrica/Kjeldahl; nitrato e amônia, pelo método de Liga devarda/Kjeldahl. Foi também realizada a análise física das amostras, na qual foi medida a quantidade de areia, por pesagem, silte e argila, através do uso de densímetro.

Os resultados de cada propriedade analisada entre as diferentes áreas foram analisados no programa estatístico SAS 9.3 (SAS Institute), com nível de significância de 5%. Os dados foram testados quanto a sua normalidade pelo teste de *Shapiro-Wilk* e sua homogeneidade de variâncias. Para os dados que seguiram os pressupostos dos testes paramétricos, foi realizado o teste de *Tukey*, para os demais, o teste de *Kruskal-Wallis*. Foi também realizada a análise de componentes principais (PCA) dos dados pelo programa *PAST 3* (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

2.3.3 Análise do teor de água das amostras de solo

O teor de água de cada ponto amostrado foi determinado em triplicata imediatamente após a coleta e transporte dos solos para o laboratório. Para cada ponto, três alíquotas de 5 g de solo foram dispostas sobre placas de Petri. As placas foram pesadas e colocadas em estufa pré-aquecida a 105 °C. As placas foram pesadas após 24, 48, 72 e 96 horas. Após a massa de cada amostra se estabilizar, a placa foi pesada. O teor de água foi calculado pela fórmula:

$$U = [(M_u - M_s)/M_s] \times 100$$

Onde:

U = Umidade gravimétrica;

M_u = Massa de solo úmido (g);

M_s = Massa de solo seco (g).

Os resultados do teor de água entre as diferentes áreas foram analisados no programa estatístico SAS 9.3 (SAS Institute), com nível de significância de 5%. Os dados foram testados quanto a sua normalidade pelo teste de *Shapiro-Wilk* e sua homogeneidade de variâncias. Para os dados que seguiram os pressupostos dos testes paramétricos, foi realizado o teste de *Tukey*, para os demais, o teste de *Kruskal-Wallis*.

2.3.4 Extração e quantificação de DNA das amostras de solo

O DNA total do solo coletado de cada ponto foi extraído em duplicata através do uso do *PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit* (MoBIO Laboratories). Para isso, foram adicionadas 250 mg do solo de cada amostra em tubos de 2 mL com microesferas de vidro (*Glass Bead Tubes* 0,1 mm). Em cada tubo, foram adicionados 750 µL de *Bead Solution*. Os tubos foram invertidos fracamente. A seguir, foram acrescentados 60 µL da Solução C1 em cada tubo. Os tubos foram invertidos, agitados na velocidade máxima por 15 minutos no *Vortex-Genie 2* (MoBIO Laboratories) e centrifugados a $10.000 \times g$ por 30 segundos na centrífuga *Eppendorf 5417C* (Eppendorf), utilizada em todas as etapas subsequentes. O sobrenadante de cada tubo foi transferido para um tubo de 1,5 mL (*Collection Tube*), ao qual foram adicionados 250 µL da Solução C2. Os tubos foram vortexados por 5 segundos, incubados a 4 °C por 5 minutos e centrifugados a $10.000 \times g$ por 1 minuto. Foram transferidos 600 µL do sobrenadante de cada amostra para outro tubo e adicionados 200 µL da Solução C3. Os tubos foram vortexados, incubados a 4 °C por 5 minutos e centrifugados a $10.000 \times g$ por 1 minuto. Depois, foram transferidos 750 µL do sobrenadante de cada amostra para outro tubo e adicionados 1200 µL da Solução C4. Os tubos foram vortexados por 5 segundos. Foram transferidos 675 µL do sobrenadante de cada tubo para uma coluna com filtro (*Spin Filter*), inserida em outro tubo. Os tubos foram centrifugados a $10.000 \times g$ por 1 minuto e o líquido de cada tubo foi descartado. Mais 675 µL do sobrenadante de cada tubo foram transferidos para a mesma coluna utilizada anteriormente. Os tubos foram centrifugados a $10.000 \times g$ por 1 minuto e o líquido restante de cada tubo foi descartado. O procedimento foi

repetido novamente até o término do sobrenadante de cada tubo. Após essa etapa, foram adicionados 500 µL da Solução C5 em cada tubo. Os tubos foram centrifugados a $10.000 \times g$ por 30 segundos e o sobrenadante foi descartado. Os tubos foram novamente centrifugados a $10.000 \times g$ por 1 minuto. Cada coluna foi transferida para um novo tubo, no qual foram adicionados 100 µL da Solução C6. Por fim, os tubos foram centrifugados a $10.000 \times g$ por 30 segundos.

A qualidade e quantidade aproximada de DNA foram conferidas em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, em TSB (do inglês *Tryptic Soy Broth*) (BRODY; KERN, 2004). Foi utilizado o marcador de peso molecular *Low mass DNA Ladder* (Life Technologies). O gel foi submetido a um campo elétrico de 100 V por aproximadamente 45 minutos e, posteriormente, foto-documentado. O DNA também foi quantificado em espectrofotômetro *Nanodrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific) com densidade ótica adotada de 260 nm. O DNA extraído das amostras foi armazenado a -20°C .

2.3.5 T-RFLP das comunidades de *Bacteria* e do filo *Verrucomicrobia*

2.3.5.1 PCR do gene 16S rRNA de *Bacteria* e do filo *Verrucomicrobia*

O gene 16S rRNA de *Bacteria* e do filo *Verrucomicrobia* foi amplificado por PCR em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems). As extremidades de ambos os *primers forward* foram marcadas com a fluorescência FAM (6-carboxifluoresceína).

Para o gene 16S rRNA de *Bacteria*, foram utilizados os *primers* universais fD1 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e rD1 (5' AAGGAGGTGATCCAGCC 3') (WEISBURG et al., 1991). O PCR de cada amostra foi preparado contendo 3,5 µL de 10X PCR Buffer; 2 mM de MgCl_2 ; 0,2 mM de cada dNTP; 7 pmol de cada *primer*, 1% de albumina sérica bovina (BSA), 1 U *Platinum Taq DNA Polymerase* (Life Technologies); 1 µL de DNA e H_2O ultrapura esterilizada para um volume final de 35 µL. O programa utilizado no termociclador foi composto de 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 59°C por 45 segundos, 72°C por 60 segundos; e 72°C por 10 minutos.

Para o gene 16S rRNA de *Verrucomicrobia*, foram utilizados os *primers* VMB537f (5'-GCCAGCAGCCGCGGTAATACA-3') (O'FARRELL; JANSSEN, 1999) e 1378r (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAAGG- 3') (HEUER et al., 1997). O PCR de cada amostra foi preparado contendo 2,5 µL de 10X PCR Buffer; 1,5 mM de MgCl_2 ; 0,2 mM de cada dNTP; 5 pmol de cada *primer*, 1% de BSA, 1 U *Platinum Taq DNA Polymerase* (Life

Technologies); 1 µL de DNA e H₂O ultrapura esterilizada para um volume final de 25 µL. O programa utilizado no termociclador foi composto de 95 °C por 5 minutos; 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 60 °C por 30 segundos, 72 °C por 1,5 minutos; e 72 °C por 10 minutos.

Os produtos de PCR foram conferidos em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, em TSB (BRODY; KERN, 2004). Foi utilizado o marcador de peso molecular *Low Mass DNA Ladder* (Life Technologies). O gel foi submetido a um campo elétrico de 100 V por aproximadamente 45 minutos e, posteriormente, foto-documentado.

2.3.5.2 Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados com o uso do *GFX PCR DNA and Gel Band Kit* (GE Healthcare). Para isso, foram adicionados 100 µL de *Capture Buffer Type 3* para cada 20 µL do produto de PCR. Cada mistura foi homogeneizada e carregada em uma coluna GFX (com filtro), presente dentro de um tubo de 2 mL (*Collection Tube*). A seguir, os tubos foram centrifugados a $16.000 \times g$ por 30 segundos na centrífuga *Eppendorf 5417C* (Eppendorf), utilizada em todas as outras etapas subsequentes. Em cada tubo, foi descartado o filtrado resultante e adicionados 500 µL do *Wash Buffer Type 1*. Os tubos foram centrifugados duas vezes a $16.000 \times g$ por 30 segundos. A coluna de cada amostra foi transferida para outro tubo de 1,5 mL, no qual foram adicionados 20 µL do *Elution Buffer Type 4*. Depois, os tubos foram incubados por 1 minuto na temperatura ambiente e centrifugados a $16.000 \times g$ por 1 minuto.

Os produtos purificados de PCR foram conferidos em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, em TSB (BRODY; KERN, 2004). Foi utilizado o marcador de peso molecular *Low mass DNA Ladder* (Life Technologies). O gel foi submetido a um campo elétrico de 100 V por aproximadamente 45 minutos e, posteriormente, foto-documentado. O DNA dos produtos também foi quantificado em espectrofotômetro *Nanodrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific) com densidade ótica adotada de 260 nm.

2.3.5.3 Reação de restrição dos produtos de PCR purificados

Os produtos de PCR purificados foram digeridos com as enzimas *HhaI* (GCG[^]C) e *MspI* (C[^]CGG), que apresentam os melhores resultados em estudos de comunidades naturais (TIEDJE et al., 1999). Para ambas as enzimas, foram utilizados 1,5 µL de *Buffer Tango* (Thermo Fisher Scientific), 0,06 µL da enzima (10 U/µL) (Thermo Fisher Scientific), 0,15 µL

de BSA; 5 μ L de DNA e H₂O ultrapura esterilizada para um volume final de 10 μ L. As amostras foram mantidas a 37 °C por 3 horas e 68 °C por 10 minutos no termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems).

2.3.5.4 Precipitação dos produtos de restrição

Os produtos de PCR digeridos por cada uma das enzimas, *HhaI* e *MspI*, foram precipitados em placas, com capacidade para 96 amostras. Para isso, 2 μ L de acetato de sódio/EDTA e 60 μ L de etanol absoluto foram adicionados a cada produto digerido. As placas foram vortexadas e centrifugadas a 4.000 rpm por 45 minutos em temperatura ambiente na centrífuga *Eppendorf 5804 R* (Eppendorf), utilizada em todas as outras etapas subsequentes. A seguir, foi descartado o sobrenadante de cada amostra e adicionados 150 μ L de etanol 70% em cada. As placas foram vortexadas e centrifugadas a 4.000 rpm por 15 min. O sobrenadante de cada amostra foi descartado. Por fim, as placas foram secas no termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) a 45 °C por 10 minutos

2.3.5.5 Análise dos fragmentos terminais de restrição

O produto precipitado de cada amostra foi ressuspenso em mistura contendo 9,75 μ L de formamida *HiDi* e 0,25 μ L de *GeneScan 500 ROX Size Standard* (Applied Biosystems). As amostras foram desnaturadas a 95 °C por 5 minutos e resfriadas a 0 °C por 4 minutos. Depois, foram carregadas no sequenciador *ABI Prism 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) para a análise dos fragmentos terminais de restrição (T-RFs).

2.3.5.6 Processamento dos dados de T-RFLP

A qualidade dos dados resultantes do sequenciador foi conferida no programa *PeakScanner 2* (Applied Biosystems). As amostras com qualidade insatisfatória foram refeitas. Os dados resultantes foram exportados para uma planilha eletrônica no programa *Excel* (Microsoft). Foram eliminados os T-RFs com menos de 50 unidades de fluorescência, para discriminar os picos autênticos do ruído da técnica de T-RFLP, e com tamanho menor que 50 ou maior que 800 pares de bases. Os dados das alturas dos picos, ou unidades de fluorescência, foram transformados em dados relativos, dividindo a altura de cada pico pela

soma das alturas de todos os picos encontrados em uma amostra. Assim, foi definida a porcentagem que cada T-RF representa do perfil total, ou seja, sua abundância relativa.

Os perfis de T-RFs das diferentes áreas foram analisados pelo teste estatístico ANOSIM, com medida de distância de *Bray-Curtis*, com nível de significância de 5%, no programa *PAST 3* (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001). As quantidades de T-RFs entre as diferentes áreas foram analisadas no programa estatístico *SAS 9.3* (SAS Institute), com os dados testados quanto a sua normalidade, pelo teste de *Shapiro-Wilk*, e sua homogeneidade de variâncias, seguido pelo teste de *Tukey*, com nível de significância de 5%. As estruturas das comunidades microbianas foram comparadas por histogramas e diagramas criados no programa *Excel* (Microsoft). Por fim, os dados foram transformados pelo coeficiente de *Hellinger* e correlacionados com os dados físico-químicos das áreas pela análise de redundância (RDA), com nível de significância de 5% pelo teste de permutação de Monte-Carlo no programa *Canoco for Windows 4.5* (Biometris).

2.3.6 qPCR das comunidades de *Bacteria* e do filo *Verrucomicrobia*

2.3.6.1 Construção da curva do gene 16S rRNA de *Bacteria* e do filo *Verrucomicrobia*

Foram desenvolvidas curvas padronizadas do gene 16S rRNA para quantificar as comunidades de *Bacteria* e do filo *Verrucomicrobia*. Para isso, primeiramente, o gene de cada grupo foi amplificado por PCR em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems).

Para o gene 16S rRNA de *Bacteria*, foi utilizado o DNA do isolado *Pseudomonas fluorescens* (DSMZ 8369), proveniente do depósito de culturas *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* (DSMZ). O DNA do isolado foi amplificado com os primers 968f (5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3') (HEUER et al., 1997) e 1387r (5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3') (MARCHESI et al. 1998). O PCR de cada amostra foi preparado contendo 3,5 µL de 10X PCR Buffer; 1,5 mM de MgCl₂; 0,1 mM de cada dNTP; 7 pmol de cada primer, 1,4 U *Platinum Taq DNA Polymerase* (Life Technologies); 1 µL de DNA e H₂O ultrapura esterilizada para um volume final de 35 µL. O programa utilizado no termociclador foi de 94 °C por 10 minutos; 40 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 56 °C por 30 segundos, 72 °C por 45 segundos; e 72 °C por 7 minutos.

Para o gene 16S rRNA de *Verrucomicrobia*, foi utilizado o DNA do isolado *Verrucomicrobium spinosum* (DSMZ 4136 T), proveniente do depósito de culturas DSMZ. O

DNA do isolado foi amplificado com os *primers* Ver53 (5'-TGGCGGCGTGGWTAAGA-3') (STEVENSON et al., 2004) e Eub518 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993). O PCR de cada amostra foi preparado contendo 2,5 µL de 10X PCR Buffer; 3 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada dNTP; 5 pmol de cada *primer*, 1 U *Platinum Taq DNA Polymerase* (Life Technologies); 1 µL de DNA e H₂O ultrapura esterilizada para um volume final de 25 µL. O programa utilizado no termociclador foi de 95 °C por 15 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 60 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto; e 72 °C por 10 minutos.

Os produtos de PCR foram conferidos em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, em TSB (BRODY; KERN, 2004). Foi utilizado o marcador de peso molecular *Low mass DNA Ladder* (Life Technologies). O gel foi submetido a um campo elétrico de 100 V por aproximadamente 45 minutos e, posteriormente, foto-documentado.

Os produtos de PCR foram purificados com o uso do *GFX PCR DNA and Gel Band Kit* (GE Healthcare). Para isso, foram adicionados 100 µL de *Capture Buffer Type 3* para cada 20 µL do produto de PCR. Cada mistura foi homogeneizada e carregada em uma coluna GFX (com filtro), presente dentro de um tubo de 2 mL (*Collection Tube*). A seguir, os tubos foram centrifugados a 16.000 × g por 30 segundos na centrífuga *Eppendorf 5417C* (Eppendorf), utilizada em todas as outras etapas subsequentes. Em cada tubo, foi descartado o filtrado resultante e adicionados 500 µL do *Wash Buffer Type 1*. Os tubos foram centrifugados duas vezes a 16.000 × g por 30 segundos. A coluna de cada amostra foi transferida para outro tubo de 1,5 mL, no qual foram adicionados 20 µL do *Elution Buffer Type 4*. Depois, os tubos foram incubados por 1 minuto na temperatura ambiente e centrifugados a 16.000 × g por 1 minuto.

O produto purificado foi quantificado em espectrofotômetro *Nanodrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific) com densidade ótica adotada de 260 nm. A partir de cada produto, foram desenvolvidas curvas com 10² a 10⁸ cópias do gene 16S rRNA de *Bacteria* e de *Verrucomicrobia*.

2.3.6.2 qPCR do gene 16S rRNA de *Bacteria* e do filo *Verrucomicrobia*

O gene 16S rRNA de *Bacteria* e do filo *Verrucomicrobia* foi quantificado em triplicata para cada amostra pela técnica de PCR quantitativo em tempo-real no equipamento *StepOne Plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). A técnica de qPCR foi realizada contendo 5 µL do *SYBR Green ROX qPCR Master Mix* (Thermo Scientific), 5 pmol de cada

primer (Life Technologies), 1 µl de DNA e H₂O ultrapura esterilizada para um volume final de 10 µL.

Para o gene 16S rRNA de *Bacteria*, foram utilizados os *primers* 968f (5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3') (HEUER et al. 1997) e 1387r (5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3') (MARCHESI et al. 1998). O programa utilizado no termociclador foi de 94 °C por 10 minutos; 40 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 56 °C por 30 segundos, 72 °C por 45 segundos. Ao final, foi incluída uma curva de *melting* com 95 °C por 15 segundos, 56 °C por 1 minuto e 95 °C por 15 segundos com leitura de dados a cada 0,7 °C.

Para o gene 16S rRNA de *Verrucomicrobia*, foram utilizados os *primers* Ver53 (5'-TGGCGGCGTGGWTAAGA-3') (STEVENSON et al., 2004) e Eub518 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993). O programa utilizado no termociclador foi de 95 °C por 15 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto. Ao final foi incluída uma curva de *melting* com 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e 95 °C por 15 segundos com leitura de dados a cada 0,7 °C.

2.3.6.3 Processamento dos dados de qPCR

Os dados obtidos pela técnica de qPCR foram analisados no programa *StepOne Software v2.3* (Applied Biosystems) quanto a sua especificidade e eficiência. As amostras que apresentaram resultados insatisfatórios de acordo com esses parâmetros foram refeitas. Os dados obtidos foram exportados para uma planilha eletrônica no programa *Excel* (Microsoft). Na planilha, os dados de abundância de cada amostra foram transformados em número de cópias do gene por grama de solo.

Os resultados da abundância dos grupos microbianos entre as diferentes áreas foram analisados no programa estatístico *SAS 9.3* (SAS Institute), com nível de significância de 5%. Os dados foram testados quanto a sua normalidade pelo teste de *Shapiro-Wilk* e sua homogeneidade de variâncias. Para os dados que seguiram os pressupostos dos testes paramétricos, foi realizado o teste de *Tukey*, para os demais, o teste de *Kruskal-Wallis*. Os dados também foram correlacionados com as propriedades físico-químicas das áreas de estudo pelo teste de *Spearman*, com nível de significância de 5%, também realizado no programa *SAS 9.3* (SAS Institute).

2.3.7 Biblioteca de clones do filo *Verrucomicrobia*

2.3.7.1 PCR do gene 16S rRNA do filo *Verrucomicrobia*

O gene 16S rRNA do filo *Verrucomicrobia* foi amplificado por PCR em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems). Foram utilizados os *primers* Ver53 (5'-TGGCGGCGTGGWTAAGA-3') (STEVENSON et al., 2004) e 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (LANE, 1991). O PCR de cada amostra foi preparado contendo 5,0 µL de 10X PCR Buffer; 2 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada dNTP; 10 pmol de cada *primer*, 2 U *Platinum Taq DNA Polymerase* (Life Technologies); 2 µL de DNA e H₂O ultrapura esterilizada para um volume final de 50 µL. O programa utilizado no termociclador foi de 95 °C por 3 minutos; 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 61 °C por 30 segundos, 72 °C por 45 segundos; e 72 °C por 10 minutos.

A qualidade e quantidade aproximada dos produtos de PCR foram conferidas em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, em TSB. Foi utilizado o marcador de peso molecular *Low mass DNA Ladder* (Life Technologies). O gel foi submetido a um campo elétrico de 100 V por aproximadamente 45 minutos e, posteriormente, foto-documentado.

2.3.7.2 Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR de ambos os genes foram purificados com o uso do *GFX PCR DNA and Gel Band Kit* (GE Healthcare). Para isso, foram adicionados 100 µL de *Capture Buffer Type 3* para cada 20 µL do produto de PCR. Cada mistura foi homogeneizada e carregada em uma coluna GFX (com filtro), presente dentro de um tubo de 2 mL (*Collection Tube*). A seguir, os tubos foram centrifugados a 16.000 × g por 30 segundos na centrífuga *Eppendorf 5417C* (Eppendorf), utilizada em todas as outras etapas subsequentes. Em cada tubo, foi descartado o filtrado resultante e adicionados 500 µL do *Wash Buffer Type 1*. Os tubos foram centrifugados duas vezes a 16.000 × g por 30 segundos. A coluna de cada amostra foi transferida para outro tubo de 1,5 mL, no qual foram adicionados 20 µL do *Elution Buffer Type 4*. Depois, os tubos foram incubados por 1 minuto na temperatura ambiente e centrifugados a 16.000 × g por 1 minuto.

Os produtos de PCR purificados de um mesmo tratamento foram misturados e homogeneizados para formar uma amostra composta associada a cada uso do solo. As

amostras compostas foram quantificadas em espectrofotômetro *Nanodrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific) com densidade ótica adotada de 260 nm.

2.3.7.3 Ligação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR purificados foram clonados com o uso do *pGEM-T Easy Vector System* (Promega). Para cada amostra composta, foi preparada a clonagem com 5,0 µL de *2X Rapid Ligation Buffer* (Promega); 50 ng de *pGEM-T Easy Vector* (Promega); 3U de *T4 DNA Ligase* (Promega); 75 ng do produto de PCR purificado e H₂O ultrapura esterilizada para um volume final de 10 µL. A quantidade necessária do produto de PCR a ser utilizado na clonagem foi realizada pela fórmula:

$$Q_p = [(Q_v \times T_i)/T_v] \times R$$

Onde:

Q_p = Quantidade do produto (ng);

Q_v = Quantidade do vetor (ng);

T_i = Tamanho do inserto (kb);

T_v = Tamanho do vetor (kb);

R = Razão entre o inserto e o vetor.

O tamanho do vetor do *pGEM-T Easy Vector System* (Promega) é de 3015 pares de bases. A razão utilizada foi de 3:1. O material resultante foi incubado a 4 °C *overnight*.

2.3.7.4 Transformação em *Escherichia coli*

O vetor contendo o inserto foi inserido em células competentes de *Escherichia coli JM109* (Promega) do *pGEM-T Easy Vector System* (Promega). Para isso, foram adicionados 10 µL do produto de cada ligação e 50 µL de células competentes em um tubo de 1,5 mL. Os tubos foram gentilmente misturados e colocados no gelo por 20 minutos. Em seguida, os tubos foram incubados a 42 °C em banho-maria por 50 segundos e imediatamente transferidos para o gelo por mais 2 minutos. Em cada tubo, foram adicionados 440 µL de meio LB (Luria-Bertani). Os tubos foram agitados a 200 rpm por 90 minutos a 37 °C. As células competentes transformadas foram cultivadas em placas de Petri com meio LB sólido, acrescidas de 100 mg/mL de ampicilina, X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo) e

IPTG (isopropil- β -D-thiogalactopiranosídeo). A cultura com as células foi incubada em estufa a 37 °C por 16 horas. No dia seguinte, as placas foram armazenadas a 4 °C por 2 horas para aumentar o contraste entre as colônias brancas e azuis.

2.3.7.5 Seleção dos clones e extração do DNA plasmidial

As colônias brancas que, pela metodologia utilizada, possuem o inserto de interesse, foram selecionadas. Após a escolha dos clones, foi preparado Tris-EDTA (TE), contendo 10 mM de Tris (pH 8,0); 1 mM de EDTA (pH 8) e H₂O ultrapura esterilizada para um volume final de 5 mL. Em uma placa para 96 amostras, foram transferidos 50 μ L de TE em cada poço. Cada colônia selecionada foi transferida para um poço com o auxílio de palito estéril. As placas com os clones foram mantidas a 95 °C por 10 minutos no termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) e depois armazenadas a -20 °C.

2.3.7.6 PCR do inserto

O inserto foi amplificado por PCR em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) para confirmar sua existência nos clones selecionados. O PCR foi feito com os *primers* M13f (5'-GCCAGGGTTTCCCAGTCACGA-3') e M13r (5'-GAGCGGATAACAATTTCACAGG-3') (HUEY; HALL, 1989). O PCR de cada amostra foi preparado contendo 2,5 μ L de 10X PCR Buffer; 1,5 mM de MgCl₂; 0,1 mM de cada dNTP; 5 pmol de cada *primer*, 2 U *Platinum Taq DNA Polymerase* (Life Technologies); 1 μ L de DNA e H₂O ultrapura esterilizada para um volume final de 25 μ L. O programa utilizado no termociclador foi de 95 °C por 5 minutos; 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 61 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto; e 72 °C por 10 minutos.

A qualidade e quantidade aproximada dos produtos de PCR foram conferidas em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, em TSB. Foi utilizado o marcador de peso molecular *Low mass DNA Ladder* (Life Technologies). O gel foi submetido a um campo elétrico de 100 V por aproximadamente 45 minutos e, posteriormente, foto-documentado.

2.3.7.7 Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR com o inserto de interesse foram purificados em placa de 96 amostras. Para cada clone, foram adicionados 80 μ L de isopropanol 75%. As placas foram

seladas, vortexadas e incubadas a -20 °C *overnight*. No dia seguinte, as placas foram centrifugadas por 90 minutos a 4000 rpm a 20 °C na centrífuga *Eppendorf 5804 R* (Eppendorf), utilizada em todas as outras etapas subsequentes. A seguir, foi descartado o sobrenadante de cada amostra e adicionado de 150 µL de etanol 70% em cada. As placas foram seladas, vortexadas e centrifugadas por 90 minutos a 4000 rpm a 20 °C. O sobrenadante foi novamente descartado. As placas foram secas no termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) a 40 °C por 10 minutos. Por fim, cada amostra foi ressuspensa em 25 µL de H₂O ultrapura esterilizada.

2.3.7.8 PCR de sequenciamento

O PCR de sequenciamento foi realizado em placa para 96 amostras com o *primer* Ver53 (5'-TGGCGGCGTGGWTAAGA-3') (STEVENSON et al., 2004). O PCR de cada clone foi preparado contendo 2,0 µL de 2,5X *Sequencing Buffer*; 5 pmol do *primer*; 2,0 µL de *BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix*; 2 µL de DNA e H₂O ultrapura esterilizada para um volume final de 10 µL. O programa utilizado no termociclador foi de 96 °C por 1 minuto; 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 60 °C por 15 segundos e 60 °C por 4 minutos.

2.3.7.9 Precipitação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram precipitados em placas para 96 amostras. Para isso, os produtos de cada clone foram adicionados de 2 µL de acetato de sódio/EDTA e 60 µL de etanol absoluto. As placas foram vortexadas e centrifugadas a 4.000 rpm por 45 min em temperatura ambiente na centrífuga *Eppendorf 5804 R* (Eppendorf), utilizada em todas as outras etapas subsequentes. A seguir, foi descartado o sobrenadante de cada amostra e adicionados 150 µL de etanol 70% em cada. As placas foram vortexadas e centrifugadas a 4.000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante de cada amostra foi descartado. Por fim, cada placa foi seca no termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) a 45 °C por 10 minutos. O produto precipitado de cada clone foi ressuspensa em 10 µL de Formamida HiDi e sequenciado no *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

2.3.7.10 Análise das sequências

A análise das sequências foi realizada pela ferramenta *Sanger Pipeline*, presente no *Ribosomal Database Project* (RDP) (COLE et al., 2014), no qual as sequências foram editadas e analisadas quanto a sua qualidade, com exigência de, pelo menos, 300 pares de bases com qualidade acima de 20. As sequências resultantes foram classificadas no RDP, pelo programa *Classifier*, e também comparadas com as sequências do banco de dados *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), pelo programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990).

As sequências de boa qualidade foram exportadas e alinhadas pela ferramenta *ClustalW* (LARKIN et al., 2007), presente no programa *Bioedit* (HALL, 1999). A partir do alinhamento, o programa *MOTHUR* (SCHLOSS et al., 2009) foi utilizado para calcular os estimadores de riqueza e os índices de diversidade de cada biblioteca. O programa também foi utilizado para determinar o número de UTOs presente em cada uma, considerando uma similaridade de 97%, e compará-las entre as mesmas. A partir dos resultados, foram desenvolvidos diagramas no programa *Excel* (Microsoft).

2.4 Resultados e discussão

2.4.1 Análise físico-química das amostras de solo

Os resultados da análise das amostras de solo demonstraram que as áreas de estudo apresentam similaridade em determinados atributos físico-químicos (Tabela 2.1). Dentre os parâmetros químicos, o pH em H₂O e em KCl foram considerados estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$) entre as áreas. Em todas, foi encontrado pH ácido, menor do que 7. Também foram considerados semelhantes ($p < 0,05$) entre as áreas amostradas os teores de fósforo (P), alumínio (Al), acidez potencial (H + Al), óxido nítrico (NO₃⁻) e a matéria orgânica (M.O.). Destaca-se que todos os parâmetros químicos foram considerados estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$) entre o canavial com manejo de colheita com queima e a área de vegetação nativa, o que indica grande similaridade entre ambas.

Outros parâmetros apresentaram resultados distintos entre as áreas. Os teores de potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e nitrogênio (N) foram estatisticamente maiores ($p < 0,05$) nos solos do canavial com manejo de colheita sem queima do que nos demais. O manejo da colheita com queima da palhada acarreta em perda de muitos nutrientes e da

matéria orgânica do solo (DE FIGUEIREDO; LA SCALA JÚNIOR, 2011). Adicionalmente, manejos que mantêm os restos do cultivo podem reter grande parte desses nutrientes. O trabalho de Mitchell e colaboradores (2000) identificou que nesses o potássio, cálcio, magnésio e nitrogênio podem ser readquiridos, sendo que o primeiro apresenta as maiores taxas de restabelecimento. Além disso, na área com manejo de colheita sem queima, os solos apresentaram maior ($p < 0,05$) capacidade de troca catiônica (CTC) e soma de bases (SB) do que os solos das demais áreas.

Tabela 2.1 - Atributos físico-químicos dos solos coletados nas três áreas de estudo

	Área de coleta		
	Canavial com manejo de colheita sem queima	Canavial com manejo de colheita com queima	Vegetação nativa
pH H ₂ O	6,2 ±0,3 a	6,0 ±0,1 a	5,9 ±0,1 a
pH KCl	5,2 ±0,4 a	5,1 ±0,3 a	4,8 ±0,2 a
P	22,4 ±14,8 a	36,8 ±9,0 a	19,8 ± 6,8 a
K	4,4 ±0,5 a	0,7 ±0,1 b	1,1 ±0,4 b
Ca	30,2 ±2,8 a	19,6 ±4,9 b	21,8 ±5,4 b
Mg	13,6 ±2,2 a	6,4 ±2,2 b	9,0 ±2,5 b
Al	< 1,0 ±0 a	< 1,0 ±0 a	< 1,0 ±0 a
H+Al	15,8 ±5,8 a	17,4 ±5,1 a	17,2 ±4,8 a
SB	48,4 ±4,5 a	26,6 ±6,9 b	31,7 ±8,3 b
CTC	63,7 ±5,0 a	44,1 ±3,4 b	49,0 ±10,0 b
V	76,2 ±8,3 a	60,0 ±12,4 ab	64,6 ±7,3 b
m	0,4 ±0,9 a	1,6 ±2,2 ab	2,6 ±1,5 b
N	1152,2 ±239,1 a	730,8 ±67,8 b	855,4 ±135,9 b
NH ₄ ⁺	13,2 ±2,8 a	8,4 ±0,9 b	9,6 ±2,1 b
NO ₃ ⁻	6,8 ±1,9 a	5,0 ±1,0 a	5,0 ±1,6 a
M.O.	17,2 ±6,0 a	12,6 ±0,9 a	13,2 ±4,4 a
Areia total	706,0 ±26,2 a	778,6 ±7,9 b	690,8 ±29,2 a
Areia grossa	152,6 ± 19,7 a	272,2 ±22,1 b	298,6 ±22,3 b
Areia fina	553,4 ±21,6 a	506,6 ±18,1 b	392,4 ±38,1 c
Silte	23,4 ±10,8 a	21,0 ±2,0 a	23,6 ±9,1 a
Argila	270,8 ±32,9 a	200,2 ±8,8 b	286,0 ±22,4 a

Em cada linha, os resultados apresentados correspondem às médias e aos desvios dos parâmetros analisados para cada área de estudo. As médias de uma mesma linha seguidas por letras iguais foram consideradas semelhantes entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). O parâmetro fósforo (P) foi expresso em mg.Kg⁻¹; potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), alumínio (Al), acidez potencial (H+Al), soma de bases trocáveis (SB), capacidade de troca catiônica (CTC) em mmolc.Kg⁻¹; saturação da CTC por bases (V), saturação em alumínio (m) em porcentagem; nitrogênio total (N), nitrogênio na forma de amônio (N-NH₄⁺), nitrogênio na forma de nitrato (N-NO₃⁻) em mg/kg; matéria orgânica (M.O.) em g/kg; areia total, areia grossa, areia fina, silte e argila em g/kg

A saturação por bases (V) é um parâmetro indicativo de fertilidade e usado como complemento na nomenclatura dos diferentes tipos de solo (RONQUIM, 2010). Os solos amostrados das três áreas de coleta apresentaram resultados maiores que 50% e, assim, podem ser considerados férteis (eutróficos).

Dentre os parâmetros físicos, apenas a quantidade de silte foi considerada estatisticamente semelhante ($p < 0,05$) entre os solos. Os solos do canavial sem queima e da área de mata nativa apresentaram textura médio-argilosa; enquanto os solos da área com queima, textura médio-arenosa. A análise de componentes principais dos resultados demonstra certo agrupamento das amostras de solo de acordo com as suas áreas de origem (Figura 2.3).

Figura 2.3 - Análise de componentes principais (PCA) dos atributos físico-químicos das amostras de solos coletadas nas três áreas de estudo. CC: canavial com manejo de colheita sem queima. CQ: canavial com manejo de colheita com queima. VN: área de vegetação nativa

2.4.2 Análise do teor de água das amostras de solo

As amostras de solo do canavial com manejo de colheita sem queima apresentaram média de 12,4% de umidade; com queima, 11,9% e da área de vegetação nativa, 19,4%. O teor de água encontrado na última foi considerado distinto ($p < 0,05$) do teor das demais.

2.4.3 Extração e quantificação de DNA das amostras de solo

O DNA total do solo foi extraído em duplicata para cada amostra coletada nas três áreas de estudo. Todas as amostras apresentaram resultados de 1,8 a 2,0 do parâmetro

260/280, medidos no *Nanodrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific). As amostras de solo apresentaram de 9,3 a 40,1 ng/ μ L de DNA.

2.4.4 T-RFLP das comunidades de *Bacteria* e do filo *Verrucomicrobia*

A técnica de T-RFLP produziu, para ambas as enzimas utilizadas, fragmentos (T-RFs) que foram utilizados para comparar a estrutura das comunidades microbianas de interesse entre as três diferentes áreas de estudo. Primeiramente, foi realizado o teste estatístico ANOSIM, considerado uma ferramenta importante para a análise de dados de T-RFLP e utilizado para demonstrar a significância estatística entre os diferentes tratamentos (REES et al., 2004). O resultado do teste ANOSIM, em R, pode ser encontrado entre 1 a -1. Um resultado igual a 1 indica que as amostras assemelham-se mais com as de dentro do tratamento a qual pertencem do que com amostras de outros tratamentos analisados. De acordo com Clarke e Gorley (2001) e Ramette (2007), tratamentos com R maiores que 0,75 podem ser considerados bem separados; maiores que 0,5, separados, mas com sobreposição; e menores que 0,25, pouco separados.

Os resultados do teste global para o perfil dos T-RFs da comunidade bacteriana mostraram-se distintos entre as duas enzimas, mas, de modo geral, indicaram que as comunidades foram consideradas similares ($p < 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 2.2). Como citado, o teste ANOSIM compara as distâncias das amostras entre os grupos com as distâncias dentro dos grupos (RAMETTE, 2007). As propriedades físico-químicas das áreas, apesar de semelhantes entre si, mostram-se bastante heterogêneas dentro do mesmo tratamento, característica comumente encontrada em estudos de campo, o que pode explicar os T-RFs estarem pouco separados. Além disso, outro fator que pode ser associado aos resultados do teste relaciona-se com a complexidade da comunidade bacteriana, que é formada por numerosos grupos com características e preferências distintas.

Tabela 2.2 - Resultado global do teste estatístico ANOSIM do T-RFLP do gene 16S rRNA de *Bacteria*

Enzima	ANOSIM	
	R	p
<i>HhaI</i>	0	0,48
<i>MspI</i>	0,13	0,02

Resultados de R do teste ANOSIM. Tratamentos com R maiores que 0,75 podem ser considerados bem separados; maiores que 0,5, sobrepostos, mas ainda separados; e menores que 0,25, pouco separados (CLARKE; GORLEY, 2001; RAMETTE, 2007)

Diferentemente das comunidades bacterianas, os T-RFs do filo demonstram que a estrutura de suas comunidades foi alterada de forma mais abrangente pelo diferentes solos, com os seus perfis de T-RFs considerados distintos ($p < 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 2.3). Apesar de separados, os resultados indicam que os T-RFs também foram considerados sobrepostos. Assim, maiores detalhes podem ser inferidos a partir dos resultados do teste com os tratamentos comparados dois a dois (Tabela 2.4).

Tabela 2.3 - Resultado global do teste estatístico ANOSIM do T-RFLP do gene 16S rRNA de *Verrucomicrobia*

Enzima	ANOSIM	
	R	p
<i>HhaI</i>	0,42	< 0,01
<i>MspI</i>	0,50	< 0,01

Resultados de R do teste ANOSIM. Tratamentos com R maiores que 0,75 podem ser considerados bem separados; maiores que 0,5, sobrepostos, mas ainda separados; e menores que 0,25, pouco separados (CLARKE; GORLEY, 2001; RAMETTE, 2007)

Apesar dos atributos similares entre o canavial com manejo de colheita com queima e a área de mata nativa, para ambas as enzimas, os T-RFs de ambas foram considerados os mais separados entre todos os tratamentos analisados. Esses resultados apresentam grande importância, pois estudos anteriores indicaram que os membros do filo podem ser afetados por características ambientais que mudam de acordo com o uso do solo (BUCKLEY; SCHMIDT, 2001a).

Tabela 2.4 - Resultado do teste estatístico ANOSIM entre cada área do T-RFLP do gene 16S rRNA de *Verrucomicrobia*

Áreas	Enzima	ANOSIM	
		R	p
CC × CQ	<i>HhaI</i>	0,35	< 0,01
	<i>MspI</i>	0,49	< 0,01
CC × VN	<i>HhaI</i>	0,37	< 0,01
	<i>MspI</i>	0,40	< 0,01
CQ × VN	<i>HhaI</i>	0,57	< 0,01
	<i>MspI</i>	0,58	< 0,01

Resultados de R do teste ANOSIM. Tratamentos com R maiores que 0,75 podem ser considerados bem separados; maiores que 0,5, sobrepostos, mas ainda separados; e menores que 0,25, pouco separados (CLARKE; GORLEY, 2001; RAMETTE, 2007). CC: canavial com manejo de colheita sem queima. CQ: canavial com manejo de colheita com queima. VN: área de vegetação nativa

Os resultados também foram comparados quanto ao número de T-RFs gerados, que podem ser considerados unidades taxonômicas operacionais. O T-RFLP da comunidade bacteriana gerou 203 e 227 UTOs para as enzimas *HhaI* e *MspI*, respectivamente. Enquanto o

T-RFLP do filo gerou 115 e 132 para as mesmas. A quantidade de UTOs produzida para ambos os grupos microbianos foi distinta entre cada tratamento e com o uso de cada enzima. Assim, as quantidades encontradas foram consideradas semelhantes ($p < 0,05$) entre as áreas. Apenas a comunidade do filo apresentou, para a enzima *HhaI*, quantidade significativamente maior de UTOs na mata nativa.

Para melhor compreender o perfil das UTOs produzidas para cada área, foram criados histogramas para os fragmentos com abundância maior que 1%, ou seja, as UTOs dominantes (Figuras 2.4 e 2.5). Os histogramas demonstram que os grupos microbianos dominantes diferem em quantidade entre os três diferentes solos. Ou seja, a abundância de alguns UTOs foi alterada entre os tratamentos, o que indica, assim como outros estudos, que os grupos microbianos do solo podem ser afetados pelo seu uso de diferentes maneiras (POTTHAST; HAMER; MAKESCHIN, 2012).

Os histogramas de ambos os grupos demonstram que a estrutura da comunidade da área nativa é a mais distinta dentre as áreas analisadas. Rachid e colaboradores (2013) compararam a comunidade microbiana do solo de canaviais com diferentes manejos no Cerrado. Os resultados indicaram que o manejo de colheita com queima alterou a estrutura da comunidade microbiana com maior impacto do que o manejo sem queima, quando comparados ao ambiente natural adjacente.

Também foram criados diagramas com essas UTOs para ilustrar o perfil das comunidades entre os diferentes usos (Figuras 2.6 e 2.7). Grande número de UTOs foi compartilhado entre os solos das três áreas de estudo. O compartilhamento foi de aproximadamente 22% e 23% das UTOs geradas para a comunidade bacteriana; e 33 e 54% para o filo com as enzimas *HhaI* e *MspI*, respectivamente.

O compartilhamento de UTOs entre os ambientes pode ser explicado pela ubiquidade de determinados grupos microbianos, que podem tolerar uma ampla gama de fatores ambientais distintos (BARBERÁN et al., 2014). Destaca-se que o filo estudado, além de ubíquo em solos (ZHANG; XU, 2008), é encontrado em ambientes muito distintos com membros que apresentam grande heterogeneidade em sua morfologia e metabolismo (SCHLESNER; JENKINS; STALEY, 2006), fatores que podem ser associadas a maior quantidade de UTOs compartilhadas entre os ambientes analisados.

Gene 16S rRNA de *Bacteria*

A. Enzima *HhaI*

B. Enzima *MspI*

Figura 2.4 - Histograma das UTOs com abundância relativa superior a 1% do T-RFLP do gene 16S rRNA de *Bacteria*. Os números na legenda indicam o tamanho dos fragmentos, em pares de base. (a) Histograma para a enzima *HhaI*. (b) Histograma para a enzima *MspI*

Gene 16S rRNA de *Verrucomicrobia*

A. Enzima *HhaI*

B. Enzima *MspI*

Figura 2.5 - Histograma das UTOs com abundância relativa superior a 1% do T-RFLP do gene 16S rRNA de *Verrucomicrobia*. Os números na legenda indicam o tamanho dos fragmentos, em pares de base. (a) Histograma para a enzima *HhaI*. (b) Histograma para a enzima *MspI*

Algumas UTOs foram encontradas em duas das três áreas de estudo. Enquanto o compartilhamento das UTOs bacterianas foi predominantemente maior entre os solos dos canaviais e entre os solos do canavial com queima e da área nativa, as UTOs do filo foram compartilhadas de maneira mais equitativa entre os ambientes. Apesar de apresentarem algumas similaridades taxonômicas, a existência de UTOs presentes em apenas um dos ambientes estudados demonstra que as comunidades também diferiram entre si.

Figura 2.6 - Diagrama das UTOs com abundância relativa maior que 1% do T-RFLP do gene 16S rRNA de *Bacteria*. Os números apresentados correspondem às quantidades de T-RFs. (a) Diagrama para a enzima *HhaI*. (b) Diagrama para a enzima *MspI*

Figura 2.7 - Diagrama das UTOs com abundância relativa maior que 1% do T-RFLP do gene 16S rRNA de *Verrucomicrobia*. Os números apresentados correspondem às quantidades de T-RFs. (a) Diagrama para a enzima *HhaI*. (b) Diagrama para a enzima *MspI*

Por fim, os T-RFs produzidos em cada ambiente foram correlacionados com os parâmetros do solo através da análise de redundância (RDA). As Figuras 2.8 e 2.9 apresentam a RDA apenas com os parâmetros que exibiram significância estatística ($p < 0,05$) na análise.

Os perfis de T-RFs de ambas as comunidades foram correlacionados com o pH. O pH encontrado entre os ambientes foi considerado estatisticamente semelhante mas, mesmo assim, mostrou grande influência para os dados de T-RFLP. O pH tem sido considerado um indicador de como as comunidades podem estar compostas e estruturadas em distintos ambientes (FIERER; JACKSON, 2006). A comunidade bacteriana também foi correlacionada com o fósforo, para a enzima *HhaI*, e com o teor de areia grossa, cálcio e matéria orgânica para a enzima *MspI*.

Figura 2.8 - Análises de redundância (RDA) do T-RFLP do gene 16S rRNA de *Bacteria* e parâmetros físico-químicos das áreas de estudo estatisticamente significantes ($p < 0,05$) para a análise. CC: canavial com manejo de colheita sem queima. CQ: canavial com manejo de colheita com queima. VN: área de vegetação nativa. (a) RDA para a enzima *HhaI*. (b) RDA para a enzima *MspI*

Figura 2.9 - Análises de redundância (RDA) do T-RFLP do gene 16S rRNA de *Verrucomicrobia* e parâmetros físico-químicos das áreas de estudo estatisticamente significantes ($p < 0,05$) para a análise. CC: canavial com manejo de colheita sem queima. CQ: canavial com manejo de colheita com queima. VN: área de vegetação nativa. (a) RDA para a enzima *HhaI*. (b) RDA para a enzima *MspI*

As comunidades do filo se mostraram correlacionadas com o magnésio e a umidade, parâmetros presentes nas análises dos T-RFs gerados por ambas as enzimas. O magnésio, importante micronutriente, foi encontrado em maior quantidade no canavial sem queima, como citado anteriormente, e representou um fator importante para os T-RFs do grupo. Já a umidade é conhecida como um atributo que pode ser utilizado para prever a abundância dos seus organismos no solo pela preferência do filo a ambientes com alto teor de umidade (BUCKLEY; SCHMIDT, 2001a).

2.4.5 qPCR das comunidades de *Bacteria* e do filo *Verrucomicrobia*

O PCR quantitativo em tempo real foi utilizado para comparar a abundância das comunidades de interesse entre as diferentes áreas de estudo. A metodologia foi realizada com o uso de uma curva padrão para cada grupo microbiano estudado, composta por quantidades conhecidas do gene 16S rRNA, que abrangeram todas as amostras de DNA analisadas.

Para a análise da comunidade bacteriana, foram utilizadas as quantidades de 10^4 a 10^8 cópias do gene para o desenvolvimento da curva. Todas as placas apresentaram eficiência de 103% e R^2 maior que 0,99. Apesar da técnica de T-RFLP indicar certa similaridade entre os perfis de T-RFs da comunidade, a abundância do gene diferiu entre os ambientes (Figura 2.10). A área de vegetação nativa apresentou maior número de cópias do gene por grama de solo ($1,50 \times 10^9$), seguida pelo canavial com manejo de colheita sem queima ($1,13 \times 10^9$) e com queima ($7,85 \times 10^8$). A abundância da comunidade bacteriana foi significativamente diferente ($p < 0,05$) entre os ambientes com maior e menor número de cópias.

Figura 2.10 - Número de cópias do gene 16S rRNA de *Bacteria* por grama de solo para cada ambiente estudado. Os resultados apresentados correspondem às médias para cada tratamento. A barra de erros representa o erro padrão

Os resultados da técnica de qPCR indicam um efeito do uso do solo e, principalmente, do manejo empregado na abundância das comunidades. Resultados semelhantes foram encontrados por Rachid et al. (2013), que encontraram maior abundância de bactérias em uma área nativa do que em canaviais adjacentes, com menor quantidade do gene 16S rRNA encontrada no manejo de colheita com queima.

Para a análise da comunidade do filo, foram utilizadas as quantidades de 10^3 a 10^7 cópias do gene para o desenvolvimento da curva. Todas as placas apresentaram eficiência entre 89 e 92% e R^2 maior que 0,99. Da mesma forma que o observado com a comunidade bacteriana, a área de vegetação nativa apresentou maior número de cópias do gene por grama de solo ($8,91 \times 10^7$), seguida pelo canavial com manejo de colheita sem queima ($3,50 \times 10^7$) e com queima ($2,38 \times 10^7$) (Figura 2.11). A abundância da comunidade presente na área de mata nativa foi considerada significativamente maior ($p < 0,05$) do que nas demais.

Figura 2.11 - Número de cópias do gene 16S rRNA de *Verrucomicrobia* por grama de solo para cada ambiente estudado. Os resultados apresentados correspondem às médias para cada tratamento. A barra de erros representa o erro padrão

Da mesma forma, a comunidade de organismos do filo demonstrou responder ao uso do solo. Pesquisas realizadas no Brasil por Pereira et al. (2006) e Val-Moraes et al. (2009) indicaram que este grupo é comumente um dos mais encontrados nos solos sob cobertura de floresta, mas consideravelmente menos presente em ambientes com agricultura intensiva. Outros estudos também tem apresentado dados semelhantes, como os trabalhos de Jangid et al. (2011), que demonstrou que a abundância do filo aumentou a medida em que áreas agrícolas foram transformadas em ambientes sucessionais ou pastagens, e de Lauber et al. (2013), que encontrou o dobro de abundância do filo em solos de pastagem do que em solos de áreas agrícolas.

Por fim, o trabalho de Bergmann et al. (2011) demonstrou que o filo tem sido subestimado nos estudos da área pelos *primers* comumente utilizados em estudos metagenômicos. A grande abundância encontrada nos ambientes analisados, através do uso de *primers* específicos, corrobora os dados desse estudo, o que demonstra a importância de pesquisas com foco particular em grupos de interesse.

Os dados da abundância de cada gene foram correlacionados com os parâmetros físico-químicos das áreas de estudo através do teste de *Spearman*. As Tabelas 2.5 e 2.6 apresentam apenas os parâmetros que foram correlacionados com a abundância de forma significativa ($p < 0,05$).

Tabela 2.5 - Teste de *Spearman* entre a abundância do gene 16S rRNA de *Bacteria* e os parâmetros físico-químicos das áreas de estudo considerados significativos ($p < 0,05$) pelo teste

Abundância	Parâmetros físico-químicos						
	P	N	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	Umidade	A. total	Argila
<i>Bacteria</i>	-0.54600	0.49382	0.48704	0.39014	0.38774	-0.57137	0.59733

Resultados do coeficiente de *Spearman*. P: fósforo. N: nitrogênio total. NH₄⁺: nitrogênio na forma de amônio. NO₃⁻: nitrogênio na forma de nitrato. A. total: areia total

A abundância de ambas as comunidades foi correlacionada com as características físicas do solo, com maior quantidade dos genes analisados associados a maiores teores de argila e menores teores de areia total. De modo geral, solos argilosos conseguem manter maiores teores de água do que os solos arenosos (MCTAGGART et al., 2002), característica benéfica para os microrganismos (IOVIENO; BÅÅTH, 2008). As comunidades se mostraram também bastante correlacionadas com a umidade do solo. Da mesma forma, a abundância das comunidades foi correlacionada de forma negativa com o fósforo, com menor quantidade dos genes associados aos maiores teores do elemento.

Porém, destaca-se que a área com manejo de colheita com queima, ambiente com menor abundância das comunidades amostradas, foi a que apresentou características físicas diferentes das demais áreas e com maiores teores de fósforo, o que pode ter influenciado os resultados encontrados. A abundância das comunidades bacterianas também foi correlacionada positivamente com o aumento do nitrogênio e suas formas, amônio e nitrato, importante nutriente para os microrganismos.

Tabela 2.6 - Teste de *Spearman* entre a abundância do gene 16S rRNA de *Verrucomicrobia* e os parâmetros físico-químicos das áreas de estudo considerados significativos ($p < 0,05$) pelo teste

Abundância	Parâmetros físico-químicos						
	pH KCl	P	Umidade	A. total	A. grossa	A. fina	Argila
<i>Verrucomicrobia</i>	-0.36361	-0.59953	0.60791	-0.55354	0.44925	-0.54600	0.54945

Resultados do coeficiente de correlação de *Spearman*. P: fósforo. A. total: areia total. A. grossa: areia grossa. A. fina: areia fina

Já as comunidades do filo foram correlacionadas negativamente com o pH. Estudos indicam que as bactérias apresentam melhor crescimento em ambientes com pH mais neutro (BÅÅTH; FROSTEGARD; FRITZE, 1992), mas diferentes estudos tem detectado organismos do filo em ambientes com pH baixo. Dos poucos isolados do grupo, membros da classe *Spartobacteria*, por exemplo, foram isolados e cultivados em meio com pH entre 4 a 7 (SANGWAN et al., 2004). Outros trabalhos mais recentes encontraram organismos metanotróficos pertencentes ao grupo em diferentes locais, mas com a capacidade de crescer em pH até abaixo de 1 (OP DEN CAMP et al., 2009).

2.4.6 Biblioteca de clones do filo *Verrucomicrobia*

Os dados obtidos pelas técnicas de T-RFLP e qPCR indicam que a estrutura e abundância do filo foram alteradas de acordo com o uso do solo. Assim, para o maior entendimento dos dados encontrados, foram desenvolvidas três bibliotecas de clones do gene 16S rRNA do filo. A Biblioteca CC foi feita a partir das amostras de DNA dos solos com manejo de colheita sem queima; Biblioteca CQ, com queima; Biblioteca VN; da área nativa. Para cada biblioteca, foram selecionadas 110 colônias, totalizando 330 clones sequenciados. Após o sequenciamento, cada biblioteca foi inserida no site RDP (COLE et al., 2014) para a análise da qualidade das sequências, no qual foram selecionadas 53 da Biblioteca CC; 65 da CQ; e 84 da VN (Tabela 2.7). A maior parte das sequências resultantes apresentou tamanho médio de 600 pares de bases.

A partir das sequências resultantes, foi realizada a análise classificatória no programa *Classifier* do RDP (COLE et al., 2014), capaz de classificar sequências de 400 pares de base até o nível de filo com acurácia acima de 99,8% e de classe, principal interesse nessa análise, acima de 99,2% (WANG et al., 2007). Das 202 sequências analisadas, 196 foram identificadas ao nível de classe. Devido ao pequeno número de sequências das subdivisões do filo nos bancos de dados, apenas algumas foram identificados até seu gênero. A análise de cada clone apresentou resultados satisfatórios, descritos, de forma completa, no Anexo A.

A análise classificatória demonstrou que, dos sete subgrupos do filo, apenas quatro foram encontrados nas bibliotecas (Figura 2.12). O subgrupo 2 representou 47% da Biblioteca CC; 64%, da CQ; e 53% da VN. Os resultados assemelham-se aos trabalhos de Sangwan et al. (2005), Bergmann et al. (2011) e Kielak et al. (2010), que encontraram o subgrupo 2 em maior quantidade, dominante, nas comunidades do solo.

Contudo, diferentemente de alguns dos trabalhos citados, o subgrupo 3 foi encontrado de maneira muito representativa, com, inclusive, maior quantidade do que o subgrupo 2 na Biblioteca CC. O trabalho de Bergmann et al. (2011) encontrou o subgrupo 3 em maior abundância em campos agrícolas, enquanto a quantidade do subgrupo 2 foi reduzida nesses locais. A abundância desse subgrupo diferiu entre as áreas, indicando que outros fatores podem contribuir para a abundância e dominância do mesmo em solos.

Figura 2.12 - Porcentagem de sequências associadas aos diferentes subgrupos do filo em cada uma das três bibliotecas do estudo. CC: canavial com manejo de colheita sem queima. CQ: canavial com manejo de colheita com queima. VN: área de vegetação nativa

As subdivisões 1 e 4 foram representadas em menor quantidade nas bibliotecas, assim como relatado no trabalho de Sangwan et al. (2005), com o último grupo apenas presente nas Bibliotecas CC e VN. Destaca-se também a presença de clones sem classificação, o que demonstra que a diversidade do grupo ainda é pouco conhecida.

É possível perceber que a comunidade do canavial com queima apresenta maior predominância do subgrupo 2 e menor incidência dos restantes. Assim, os resultados podem indicar que a abundância dos diferentes subgrupos do filo também pode estar associada ao uso do solo. Porém, maiores estudos fazem-se necessários para correlacionar tais grupos com o uso e características físico-químicas do solo.

Da mesma forma, as sequências foram comparadas com as disponíveis no *GenBank* do NCBI através do programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990), com os resultados presentes

no Anexo B. Grande parte das sequências resultantes do programa foram provenientes de estudos sobre a microbiota de diferentes solos.

As sequências de cada biblioteca do gene 16S rRNA com, pelo menos, 97% de similaridade foram agrupadas em UTOs pelo programa MOTHUR (SCHLOSS et al., 2009). A partir do agrupamento, foram identificados 35 UTOs para a Biblioteca CC; 41 para CQ; e 56 para VN. A partir dos dados obtidos no programa, todas as bibliotecas foram analisadas quanto aos índices de diversidade e riqueza (Tabela 2.7).

Tabela 2.7 - Número de sequências, UTOs, estimadores de riqueza e índices de diversidade de cada uma das três bibliotecas do estudo.

Biblioteca	Nº de sequências	Nº de UTOs	Riqueza			Diversidade	
			<i>Chao</i>	<i>ACE</i>	<i>Jackknife</i>	<i>Shannon</i>	<i>Simpson</i>
CC	53	35	75,62	237,95	71,10	3,32	0,033
CQ	65	41	99,00	105,53	98,28	3,52	0,022
VN	84	56	134,27	346,61	132,28	3,81	0,019

CC: canavial com manejo de colheita sem queima. CQ: canavial com manejo de colheita com queima. VN: área de vegetação nativa

Os estimadores de riqueza indicam que o número de sequências foi insuficiente para cobrir a quantidade de espécies das áreas de estudo. Resultados semelhantes foram encontrados com os gráficos das UTOs de cada biblioteca (Figura 2.13).

Figura 2.13 - Curva de rarefação de cada uma das três bibliotecas do estudo. CC: canavial com manejo de colheita sem queima. CQ: canavial com manejo de colheita com queima. VN: área de vegetação nativa

Os índices de *Shannon* e *Simpson* indicaram maior diversidade na área de mata nativa, seguida pelo canavial com manejo de colheita com queima e sem queima. Porém, o índice de riqueza ACE, que utiliza para as suas estimativas espécies com dez ou menos organismos por

amostra (LEE; CHAO, 1994), indicou maior número de espécies na área sem queima do que na com queima. É importante citar que o número de UTOs e os resultados dos índices refletem, dentre outros fatores, o número de sequências analisadas em cada biblioteca, que foram distintos entre si.

Por fim, as UTOs geradas nas três bibliotecas foram comparadas no programa MOTHUR (Figura 2.14), consideradas distintas entre si. A maior quantidade de UTOs compartilhada foi encontrada entre os solos dos canaviais e entre os solos do canavial sem queima e da mata nativa.

Figura 2.14 - Diagrama das UTOs das bibliotecas das três áreas de estudo. CC: canavial com manejo de colheita sem queima. CQ: canavial com manejo de colheita com queima. VN: área de vegetação nativa

O menor grau de compartilhamento foi encontrado entre a mata nativa e o canavial com queima. Novamente, a menor similaridade entre essas áreas, consideradas mais próximas em suas características físico-químicas, indica o quanto o uso do solo e, principalmente, o manejo pode afetar os organismos do filo.

2.5 Conclusão

Pela confiabilidade das técnicas empregadas, assim como a análise dos dados realizada, foi possível perceber que o uso do solo alterou as comunidades microbianas estudadas. Contudo, os dados demonstraram que, apesar da atividade antrópica em si ter influenciado a estrutura e, principalmente, a abundância dos grupos, o manejo realizado nas áreas foi um fator determinante para as comunidades, o que torna claro a importância de sistemas que assegurem a qualidade do solo.

O estudo do filo demonstrou que a estrutura de suas comunidades, ainda pouco conhecidas, e sua abundância, foram correlacionadas, pelas técnicas de T-RFLP e qPCR, com a umidade do solo. O grupo, de modo geral, mostrou maior sensibilidade ao uso antrópico do solo do que a comunidade bacteriana como um todo, com a mata nativa associada a maior diversidade e abundância do filo. Por fim, os resultados das bibliotecas de clones do filo

demonstram a necessidade de maiores estudos com seus subgrupos, para o maior entendimento dos efeitos do uso do solo em seus organismos.

REFERÊNCIAS

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

ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GOLÇALVES, J. L. M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, Stuttgart, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.

BÅÅTH, E.; FROSTEGARD, A.; FRITZE, H. Soil bacterial biomass, activity, phospholipid fatty acid pattern, and pH tolerance in an area polluted with alkaline dust deposition. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 58, n. 12, p. 4026-4031, 1992.

BARBERÁN, A.; RAMIREZ, K. S.; LEFF, J. W.; BRADFORD, M. A.; WALL, D. H.; FIERER, N. Why are some microbes more ubiquitous than others? Predicting the habitat breadth of soil bacteria. **Ecology Letters**, Oxford, v. 17, n. 7, p. 794-802, 2014.

BERGMANN, G. T.; BATES, S. T.; EILERS, K. G.; LAUBER, C. L.; CAPORASO, J. G.; WALTERS, W. A.; KNIGHT, R.; FIERER, N. The under-recognized dominance of *Verrucomicrobia* in soil bacterial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 43, n. 7, p. 1450-1455, 2011.

BRODY, J. R.; KERN, S. E. Sodium boric acid: Atriz-less, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, London, v. 36, n. 2, p. 214-216, 2004.

BUCKLEY, D. H.; SCHMIDT, T. M. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 6, p. 441-452, 2003.

BUCKLEY, D. H.; SCHMIDT, T. M. Environmental factors influencing the distribution of rRNA from *Verrucomicrobia* in soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 105-112, 2001a.

BUCKLEY, D. H.; SCHMIDT, T. M. The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. **Microbial Ecology**, New York, v. 42, n. 1, p. 11-21, 2001b.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; DE ABREU, H. M. C.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J. C.; BURNQUIST, W. L.; CRESTE, S.; DI CIERO, L.; FERRO, J. A.; FIGUEIRA, A. V. O.; FILGUEIRAS, T. S.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; GUZZO, E. C.; HOFFMANN, H. P.; LANDELL, M. G. A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F. C.; ROMANO, E.; SILVA, W. J.; SILVA FILHO, M. C.; CÉSAR, E. Sugarcane (*Saccharum × officinarum*): A reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 4, n. 1, p. 62-89, 2011.

CLARKE, K. R.; GORLEY, R. N. **PRIMER v5**: User manual/tutorial. Plymouth, 2001, 91 p.

COLE, J. R.; WANG, Q.; FISH, J. A.; CHAI, B.; MCGARRELL, D. M.; SUN, Y.; BROWN, C. T.; PORRAS-ALFARO, A.; KUSKE, C. R.; TIEDJE, J. M. 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 42, p. D633-D642, 2014.

DE FIGUEIREDO, E. B.; LA SCALA JÚNIOR, N. Greenhouse gas balance due to the conversion of sugarcane areas from burned to green harvest in Brazil. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 141, n. 1-2, p. 77-85, 2011.

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

DEMATTÊ, J. A. M.; TOLEDO, A. M. A.; SIMÕES, M. S. Metodologia para reconhecimento de três solos por sensores: Laboratorial e orbital. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 28, n. 5, p. 877-889, 2004.

FIERER, N.; JACKSON, R. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 103, n. 3, p. 626-631, 2006.

FURLAN, R. A.; FOLEGATTI, M. V. Distribuição vertical e horizontal de temperaturas do ar em ambientes protegidos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 6, n. 1, p. 93-100, 2002.

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

GARCÍA-ORENES, F.; MORUGÁN-CORONADO, A.; ZORNOZA, R.; SCOW, K. Changes in soil microbial community structure influenced by agricultural management practices in a mediterranean agro-ecosystem. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. 1-9, 2013.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, n. 41, p. 95-98, 1999.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, College Station, v. 4, n. 1, art. 4, 2001. Disponível em: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, n. 8, p. 3233-3241, 1997.

HUEY, B.; HALL, J. Hypervariable DNA fingerprint in *Escherichia coli*: Minisatellite probe from bacteriophage M13. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 171, n. 5, p. 2528-2532, 1989.

IOVIENO, P.; BÅÅTH, E. Effect of drying and rewetting on bacterial growth rates in soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 65, n. 3, p. 400-407, 2008.

ISLAM, K. R.; WEIL, R. R. Land use effects on soil quality in a tropical forest ecosystem of Bangladesh. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 9-16, 2000.

JANGID, K.; WILLIAMS, M. A.; FRANZLUEBBERS, A. J.; SCHMIDT, T. M.; COLEMAN, D. C.; WHITMAN, W. B. Land-use history has a stronger impact on soil microbial community composition than aboveground vegetation and soil properties. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 43, n. 10, p. 2184-2193, 2011.

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

KARLEN, D. L.; MAUSBACH, M. J.; DORAN, J. W.; CLINE, R. G.; HARRIS, R. F.; SCHUMAN, G. E. Soil quality: A concept, definition, and framework for evaluation (A guest editorial). **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 61, n. 1, p. 4-10, 1997.

KENNEDY, A. C.; PAPENDICK, R. I. Microbial characteristics of soil quality. **Journal of Soil and Water Conservation**, Ankeny, v. 50, n. 3, p. 243-248, 1995.

KIELAK, A.; PIJL, A. S.; VAN VEEN, J. A.; KOWALCHUK, G. A. Differences in vegetation composition and plant species identity lead to only minor changes in soil-borne microbial communities in a former arable field. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 63, n. 3, p. 372-382, 2008.

KIELAK, A.; RODRIGUES, J. L.; KURAMAE, E. E.; CHAIN, P. S.; VAN VEEN, J. A.; KOWALCHUK, G. A. Phylogenetic and metagenomic analysis of *Verrucomicrobia* in former agricultural grassland soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 71 n. 1, p. 23-33, 2010.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: Wiley, 1991. p. 115-175.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.

LAUBER, C. L.; RAMIREZ, K. S.; AANDERUD, Z.; LENNON, J.; FIERER, N. Temporal variability in soil microbial communities across land-use types. **The ISME Journal**, London, v. 7, n. 8, p. 1641-1650, 2013.

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

LEE, S. M.; CHAO, A. Estimating population size via sample coverage for closed capture-recapture models. **Biometrics**, Washington, DC, v. 50, p. 88-97, 1994.

MARCHESI, J. R.; SATO, T.; WEIGHTMAN, A. J.; MARTIN, T. A.; FRY, J. C.; HIOM, S. J.; DYMOCK, D.; WADE, W. G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 64, n. 2, p. 795-799, 1998.

MCTAGGART, I. P.; AKIYAMA, H.; TSURUTA, H.; BALL, B. C. Influence of soil physical properties, fertiliser type and moisture tension on N₂O and NO emissions from nearly saturated Japanese upland soils. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Amsterdam, v. 63, n.2-3, p. 207-217, 2002.

MITCHELL, R. D. J.; THORBURN, P. J.; LARSEN, P. Quantifying the loss of nutrients from the immediate area when sugarcane residues are burnt. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technology**, Brisbane, v. 22, p. 206-211, 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 coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 59, v. 3, p. 695-700, 1993.

O'FARRELL, K. A.; JANSSEN, P. H. Detection of *Verrucomicrobia* in a pasture soil by PCR-mediated amplification of 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 65, n. 9, p. 4280-4284, 1999.

OP DEN CAMP, H. J. M.; ISLAM, T.; STOTT, M. B.; HARHANGI, H. R.; HYNES, A.; SCHOUTEN, S.; JETTEN, M. S. M.; BIRKELAND, N.; POL, A.; DUNFIELD, P. F. Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic *Verrucomicrobia*. **Environmental Microbiology Reports**, Hoboken, v. 1, n. 5, p. 293-306, 2009.

PEREIRA, R. M.; SILVEIRA, E. L.; SCAQUITTO, D. C.; PEDRINHO, E. A. N.; VAL-MORAES, S. P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES, L. M.; LEMOS, E. G. M. Molecular characterization of bacterial populations of different soils. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 4, p. 439-447, 2006.

POTTHAST, K.; HAMER, U.; MAKESCHIN, F. Land-use change in a tropical mountain rainforest region of southern Ecuador affects soil microorganisms and nutrient cycling. **Biogeochemistry**, Den Haag, v. 111, n. 1-3, p. 151-167, 2012.

RACHID, C. T. C. C.; SANTOS, A. L.; PICCOLO, M. C.; BALIEIRO, F. C.; COUTINHO, H. L. C.; PEIXOTO, R. S.; TIEDJE, J. M.; ROSADO, A. S. Effect of sugarcane burning or green harvest methods on the Brazilian Cerrado soil bacterial community structure. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 3, e. 59342, 2013.

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

RONQUIM, C. C. **Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais**. Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2010. 26 p.

SANGWAN, P.; CHEN, X.; HUGENHOLTZ, P.; JANSSEN, P. H. *Chthoniobacter flavus* gen. nov., sp. nov., the first pure-culture representative of subdivision two, *Spartobacteria* classis nov., of the phylum *Verrucomicrobia*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, n. 10, p. 5875-5881, 2004.

SANGWAN, P.; KOVAC, S.; DAVIS, K. E. R.; SAIT, M.; JANSSEN, P. H. Detection and cultivation of soil *Verrucomicrobia*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 71, n. 12, p. 8402-8410, 2005.

SCHLESNER, H.; JENKINS, C.; STALEY, J. T. The phylum *Verrucomicrobia*: a phylogenetically heterogeneous bacterial group. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The Prokaryotes**. Vol. 7: Proteobacteria: Delta and Epsilon Subclasses. Deeply Rooting Bacteria. 3. ed. Amsterdam: Springer, 2006. p. 881-896.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D. H.; ROBINSON, C. J.; SAHL, J. W.; STRES, B.; THALLINGER, G. G.; VAN HORN, D. J.; WEBER, C. F. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009.

STEVENSON, B. S.; EICHORST, S. A.; WERTZ, J. T.; SCHMIDT, T. M.; BREZNAK, J. A. New strategies for the cultivation and detection of previously uncultured microbes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, n. 8, p. 4748-4755, 2004.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

TIEDJE, J. M.; ASUMING-BREMPPONG, S.; NÜSSLEIN, K.; MARSH, T. L.; FLYNN, S. J. Opening the black box of soil microbial diversity. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 109-122, 1999.

TORSVIK, V.; GOKSØYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 56, n. 3, p. 782-787, 1990.

VAN BRUGGEN, A. H. C.; SEMENOV, A. M. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p. 13-24, 2000.

VAL-MORAES, S. P.; VALARINI, M. J.; GHINI, R.; LEMOS, E. G. M.; CARARETO-ALVES, L. M. Diversidade de bactérias de solo sob vegetação natural e cultivo de hortaliças. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 40, n. 1, p. 7-16, 2009.

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, DC, v. 73, n. 16, p. 5261-5267, 2007.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE.; D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WERTZ, J. T.; KIM, E.; BREZNAK, J. A.; SCHMIDT, T. M.; RODRIGUES, J. L. M. Genomic and physiological characterization of the *Verrucomicrobia* isolate *Diplosphaera colitermitum* gen. nov., sp. nov., reveals microaerophily and nitrogen fixation genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 78, n. 5, p. 1544-1555, 2012.

ZHANG, L.; XU, Z. Assessing bacterial diversity in soil. **Journal of Soils and Sediments**, Landsberg, v. 8 n. 6, p. 379-388, 2008.

3 INFLUÊNCIA DO USO DO SOLO E DA RIZOSFERA DE CANA-DE-AÇÚCAR SOBRE COMUNIDADES DE *BACTERIA* E DO FILO *VERRUCOMICROBIA* EM MESOCOSMOS

Resumo

No solo, as comunidades microbianas podem ser influenciadas, dentre outros fatores, pelo seu uso, assim como as práticas adotadas no sistema, e cobertura, pois as plantas liberam numerosos compostos sobre o solo circundante, de forma que a rizosfera apresenta ambientes singulares para os microrganismos. A complexidade dos diferentes fatores que operam na comunidade microbiana tem sido comumente analisada por estudos em mesocosmos, em experimentos conduzidos de forma controlada. Esses demonstram grande potencial para a pesquisa de grupos microbianos ainda pouco explorados, como o filo bacteriano *Verrucomicrobia*, que apresenta muitos aspectos de sua ecologia desconhecidos. O filo é encontrado na rizosfera de plantas, mas pouco se sabe sobre o grau de influência dos seus exsudatos em tais organismos. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo analisar o efeito do uso do solo e da rizosfera de cana-de-açúcar em comunidades de *Bacteria* e do filo *Verrucomicrobia* em um experimento de mesocosmos. A coleta de solo foi realizada em um canavial com manejo de colheita sem queima e outro com queima, em Piracicaba (SP). Em cada um, o solo foi amostrado em cinco pontos cardeais, separados por 20 metros cada. Foram preenchidos seis recipientes com o solo de cada ponto coletado. Dentre os seis, foram cultivadas mudas de cana-de-açúcar em três recipientes. O experimento foi mantido em estufa, com umidade controlada diariamente, por seis meses. Foram coletadas amostras de solo dos recipientes sem plantas, considerados controles do experimento, e de solo rizosférico dos recipientes com plantas. Foi extraído o DNA total do solo de cada ponto, a partir do qual foram realizadas as técnicas de T-RFLP e qPCR do gene 16S rRNA de ambos os grupos. Mesmo em ambiente controlado, as comunidades estudadas dos solos sob diferentes usos ainda diferiram em muitos parâmetros analisados. As mesmas também demonstraram ser influenciadas em sua estrutura e abundância pela rizosfera, com maior quantidade de organismos encontrada nesses solos do que nos controles. Os resultados apresentam grande importância para o estudo do filo, pois poucos trabalhos analisaram o efeito rizosférico em seus organismos. Porém, maiores estudos fazem-se necessários para o entendimento mais profundo desse efeito na diversidade do grupo.

Palavras-chave: Comunidade bacteriana. Filo *Verrucomicrobia*. Gene 16S rRNA. T-RFLP. PCR em tempo real. Rizosfera.

3 INFLUENCE OF LAND USE AND SUGARCANE RHIZOSPHERE ON *BACTERIA* AND *VERRUCOMICROBIA* COMMUNITIES IN MESOCOSMS

Abstract

In soil, the microbial communities can be influenced, among other factors, by its use, as well as the practices adopted in the system, and coverage, since plants release numerous compounds on the surrounding soil, so that the rhizosphere presents unique environments for microorganisms. The complexity of the different factors that operate on the microbial community has been commonly analyzed by studies in mesocosms, experiments conducted in a controlled manner. These demonstrated great potential for the research of microbial groups that are still little explored, as the bacterial phylum *Verrucomicrobia*, which presents many aspects of its ecology unknown. The phylum is found in the rhizosphere of plants, but little is known about the extent of influence of their exudates in such organisms. In this sense, the present study aimed to analyze the effect of land use changes and sugarcane rhizosphere on *Bacteria* and *Verrucomicrobia* communities in a mesocosm experiment. The soil sampling was carried out on a sugarcane field with harvest management without and other with burning. In each one, the soil was sampled in five cardinal points, each separated by 20 meters. Six pots were filled with the soil collected from each point. Among the six, sugarcane seedlings were cultivated in three pots. The experiment was conducted in a greenhouse, with daily moisture control, for six months. Soil samples were collected from the pots without plants, considered the control of the experiment, and rhizosphere soil from the pots with plants. The total soil DNA was extracted from each point, from which T-RFLP and qPCR techniques of the 16S rRNA gene were performed for both groups. Even in a controlled environment, both soils communities studied under different land uses still differ in many parameters. They also demonstrated to be influenced on their structure and abundance by the rhizosphere, with a larger amount of organisms found in these soils than in the controls. The results have great significance for the study of the phylum, because few studies have analyzed the rhizosphere effect on its organisms. However, further studies are needed for deeper understanding of this effect on the diversity of the group.

Palavras-chave: Bacterial community. Phylum *Verrucomicrobia*. Gene 16S rRNA. T-RFLP. PCR real time. Rhizosphere.

3.1 Introdução

O solo é um ecossistema com atributos heterogêneos, o que garante grande quantidade de nichos para sustentar a diversidade microbiana (KURAMAE et al., 2012). A microbiota do solo realiza muitos processos fundamentais para esse e outros ecossistemas, mas seus componentes podem ser influenciados por muitos fatores, associados, principalmente, ao tipo de solo, seu uso e sua cobertura (GRAYSTON et al., 1998). A cobertura do solo influencia a microbiota presente, pois as plantas, principais fornecedoras de fontes de carbono e energia do ecossistema, liberam grande número de compostos sobre o solo circundante, para se defender de organismos prejudiciais e atrair organismos benéficos (HAICHAR et al., 2008).

Nesse sentido, a rizosfera apresenta ambientes únicos para os microrganismos (GARBEVA; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004), o que altera a abundância e a estrutura das comunidades (DA ROCHA; VAN OVERBEEK; VAN ELSAS, 2009). Os exsudatos das plantas diferem de acordo com a sua espécie, idade e fase de crescimento (DUINEVELD et al., 2001; XU et al., 2009). A comunidade bacteriana responde de forma distinta aos compostos das plantas e, assim, diferentes exsudatos podem selecionar diferentes grupos bacterianos (GARBEVA; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004). Além disso, os exsudatos contribuem para uma alta densidade populacional bacteriana comparada com o solo sem raízes introduzidas (SANGUIN et al., 2006).

Assim, a microbiota do solo é afetada por muitos fatores inter-relacionados que operam em diferentes escalas espaciais e temporais (WALLENIOUS et al., 2011). O entendimento dos fatores que influenciam a abundância e a estrutura das comunidades microbianas e o seu grau de influência sobre as mesmas apresenta grande complexidade, estudo ainda mais dificultado quando associado a pesquisas conduzidas em campo, prejudicadas pela inconstância dos atributos ambientais no mesmo (ELLER; KRÜGER; FRENZEL, 2005). Assim, muitos estudos têm sido conduzidos de forma controlada, em mesocosmos e microcosmos, para melhor elucidar e isolar a influência desses fatores.

Dentro desse contexto, os experimentos de mesocosmos podem apresentar grande importância para o estudo de organismos de interesse, como o filo bacteriano *Verrucomicrobia*, grupo recentemente descrito (HEDLUND; GOSINK; STALEY, 1997), que pela dificuldade de isolamento de seus membros, ainda possui muitos aspectos de sua ecologia desconhecidos (SANGWAN et al., 2005). O filo é dominante em solos (BERGMANN et al., 2011) e pesquisas indicam que seus organismos podem ser afetados por características ambientais que mudam de acordo com o seu uso (BUCKLEY; SCHMIDT,

2001). O grupo é também encontrado na rizosfera de plantas (ROSENBERG et al., 2009). Contudo, poucos estudos abordaram os ambientes preferenciais do grupo e o grau de influência dos exsudatos das plantas em seus organismos (DA ROCHA; VAN ELSAS; VAN OVERBEEK, 2011), o que evidencia a necessidade de maiores estudos.

3.2 Objetivos

Entender a influência do uso do solo e da rizosfera de cana-de-açúcar sobre os organismos de *Bacteria* e do filo *Verrucomicrobia* em um experimento controlado de mesocosmos através de métodos moleculares independentes de cultivo.

3.2.1 Objetivos específicos

1. Analisar a estrutura, pela técnica de T-RFLP, e quantificar, pela técnica de qPCR, as comunidades microbianas em solos sob diferentes usos em experimento controlado;
2. Entender o efeito da rizosfera na estrutura, pela técnica de T-RFLP, e na abundância, pela técnica de qPCR, das comunidades microbianas em mesocosmos.

3.3 Material e métodos

3.3.1 Coleta de solo para o experimento de mesocosmos

Os solos utilizados no experimento de mesocosmos foram coletados nas fazendas Padre Guilherme e São Benedito, localizadas no distrito de Artemis, na cidade de Piracicaba, no Noroeste do estado de São Paulo, assim como descrito no tópico 2.3.1., presente no Estudo 2. A coleta de solo foi realizada no mês de fevereiro de 2013 em duas áreas adjacentes das fazendas: (1) canavial com manejo de colheita sem queima desde o ano de 2002 (S 22°41.423' W 47°47.105') e (2) canavial com manejo de colheita com queima desde a década de 60 (S 22°41.389' W 47°47.839').

Em cada área, a coleta de solo foi realizada em cinco pontos, com um ponto central e outros quatro pontos cardeais, direcionados para o Norte, Sul, Leste e Oeste com pelo menos 20 m de distância do ponto central. Em cada ponto, o solo foi coletado em três sacos de capacidade de 30 L. Nas áreas agrícolas, a palhada que recobria o solo também foi coletada em cada ponto cardinal para ser utilizada no experimento de mesocosmos. Os solos e a palhada

foram transportados imediatamente para a estufa do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP).

3.3.2 Experimento de mesocosmos

O experimento de mesocosmos foi estabelecido no mês de fevereiro de 2013. O experimento foi composto de 60 recipientes plásticos com capacidade de 14 L (Figura 3.1). Os recipientes foram forrados com uma camada de pedras britadas em seu fundo e preenchidos com os diferentes solos amostrados.

Foram preenchidos seis recipientes de 14 L com o solo de cada ponto coletado. Dentre os seis, três recipientes foram cultivados com mudas de cana-de-açúcar da variedade CTC 9, cedidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC). A CTC 9 é caracterizada pela sua precocidade, alto teor de sacarose e adaptabilidade (CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA, 2013). O experimento foi mantido, com umidade controlada diariamente em todos os tratamentos, por seis meses. Durante esse período, todas as mudas perfilharam, com fase fenológica indicativa de maior crescimento do sistema radicular (EMBRAPA, 2008).

Experimento - Primeiro dia Experimento - Terceiro mês Experimento - Sexto mês
Figura 3.1 - Foto do experimento de mesocosmos no seu primeiro dia, terceiro dia e sexto mês

3.3.3 Coleta das amostras de solo

A coleta de solo foi realizada em todos os recipientes do experimento. Foram coletadas amostras de solo dos recipientes sem plantas, considerados controle do experimento, e de solo rizosférico dos recipientes com plantas. A coleta de solo rizosférico foi realizada pela retirada das plantas e transporte para o Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), onde o solo agregado à raiz de cada planta foi coletado com o uso de pincéis. As amostras de solo foram armazenadas em *ultrafreezer* a -80 °C para as análises moleculares posteriores.

3.3.4 Extração e quantificação de DNA das amostras de solo

O DNA total do solo coletado de cada recipiente foi extraído através do uso do *PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit* (MoBIO Laboratories), como descrito no tópico 2.3.4, presente no Estudo 2.

3.3.5 T-RFLP das comunidades de *Bacteria* e do filo *Verrucomicrobia*

O T-RFLP do gene 16S rRNA de ambas as comunidades microbianas de interesse e a análise dos dados provenientes do sequenciador nos programas *PeakScanner 2* (Applied Biosystems) e *Excel* (Microsoft) foram realizadas como descrito no tópico 2.3.5, presente no Estudo 2.

Os perfis de T-RFs dos diferentes tratamentos foram analisados pelo teste ANOSIM de um e dois fatores, com medida de distância de *Bray-Curtis*, com nível de significância de 5%, no programa *PAST 3* (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001). As quantidades de T-RFs entre os tratamentos foram analisadas no programa *SAS 9.3* (SAS Institute), com os dados testados quanto a sua normalidade, pelo teste de *Shapiro-Wilk*, e sua homogeneidade de variâncias, seguido pelo teste de *Tukey*, com nível de significância de 5%. As estruturas das comunidades microbianas foram comparadas por histogramas e diagramas criados no programa *Excel* (Microsoft).

3.3.6 qPCR das comunidades de *Bacteria* e do filo *Verrucomicrobia*

O PCR quantitativo em tempo real do gene 16S rRNA das comunidades microbianas de interesse e a análise dos dados provenientes do equipamento *StepOne Plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) nos programas *StepOne Software v2.3* (Applied Biosystems) e *Excel* (Microsoft) foram realizadas como descrito no tópico 2.3.6, presente no Estudo 2.

Os resultados da abundância dos grupos entre os diferentes tratamentos foram analisados no programa *SAS 9.3* (SAS Institute), com nível de significância de 5%. Os dados foram testados quanto a sua normalidade pelo teste de *Shapiro-Wilk* e sua homogeneidade de variâncias, seguindo do teste de *Tukey*.

3.4 Resultados e discussão

3.4.1 Extração e quantificação de DNA das amostras de solo

Todas as amostras de DNA extraído apresentaram importâncias de 1,8 a 2,0 do parâmetro 260/280, medidas no *Nanodrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific). As amostras de DNA extraído dos recipientes apresentaram de 4,1 a 33,5 ng/μL de DNA.

3.4.2 T-RFLP das comunidades de *Bacteria* e do filo *Verrucomicrobia*

A técnica de T-RFLP permitiu comparar as estruturas das comunidades microbianas de interesse entre os diferentes tratamentos. Os perfis de T-RFs resultantes de cada tratamento foram examinados pelo teste ANOSIM de um e dois fatores, de forma a ser analisada a influência de ambos os fatores estudados, o efeito do manejo adotado e da rizosfera.

O teste ANOSIM realizado com os T-RFs das comunidades bacterianas indicou que essas foram consideradas separadas ($p < 0,05$) entre os tratamentos para ambas as enzimas, com R global significativo (Tabela 3.1). De acordo com Clarke e Gorley (2001) e Ramette (2007), os resultados expressos de R para ambas as enzimas, indicam que os T-RFs das comunidades foram considerados sobrepostos, mas ainda separados.

Tabela 3.1 - Resultado global do teste estatístico ANOSIM do T-RFLP do gene 16S rRNA de *Bacteria*

Enzima	ANOSIM	
	R	p
<i>HhaI</i>	0,36	< 0,01
<i>MspI</i>	0,40	< 0,01

Resultados de R do teste ANOSIM. Tratamentos com R maiores que 0,75 podem ser considerados bem separados; maiores que 0,5, sobrepostos, mas ainda separados; e menores que 0,25, pouco separados (CLARKE; GORLEY, 2001; RAMETTE, 2007)

O teste de dois fatores foi realizado de acordo com o uso do solo proveniente de cada área de origem, do canavial com manejo de colheita sem queima ou com queima, e de acordo com o tipo de solo amostrado, do controle ou da rizosfera. Os resultados demonstraram que ambos os fatores influenciaram as comunidades bacterianas, com resultados de R maiores que 0,25, considerados significativos ($p < 0,05$) para ambas as enzimas.

Assim, os resultados demonstraram que a comunidade bacteriana sofreu efeito do uso do solo. O mesmo teste, quando realizado em amostras de solo retiradas diretamente do

campo, presente no tópico 2.4.4 do Estudo 2, indicou que os perfis dos T-RFs de solos sob diferentes usos foram considerados semelhantes. De acordo com Ramette (2007), o teste ANOSIM compara as distâncias das amostras presentes entre os grupos com as distâncias dentro dos grupos. No estudo anterior, apesar de diferentes entre as áreas, os atributos físico-químicos das mesmas também se mostraram bastante heterogêneos dentro do mesmo ambiente. Nesse sentido, o estudo realizado em mesocosmos, com temperatura e umidade controladas, pode ter permitido que a dissimilaridade dentro das comunidades fosse menor e, assim, melhor separada das presentes em outros tratamentos.

Da mesma forma, o teste demonstrou a influência da rizosfera de cana-de-açúcar nas comunidades amostradas. Na literatura, considera-se bem estabelecido que os exsudatos liberados pela parte radicular das plantas acarretam no aumento da biomassa microbiana (BERG; SMALLA, 2009). Similarmente, diferentes trabalhos demonstraram que a estrutura dessas comunidades também pode ser alterada no processo (HAICHAR et al., 2008). Assim, como esperado, os resultados corroboram esses estudos, indicando esse efeito nas comunidades bacterianas.

O teste ANOSIM das comunidades do filo apresentou resultados semelhantes. Da mesma forma como encontrado para a comunidade bacteriana, o teste indicou que essas foram consideradas separadas ($p < 0,05$) entre os tratamentos para ambas as enzimas, com R global significativo (Tabela 3.2). Contudo, para ambas, os resultados demonstraram, assim como encontrado no Estudo 2, que os perfis de T-RFs das comunidades do filo foram melhor separados entre os diferentes tratamentos.

Tabela 3.2 - Resultado global do teste estatístico ANOSIM do T-RFLP do gene 16S rRNA de *Verrucomicrobia*

Enzima	ANOSIM	
	R	p
<i>HhaI</i>	0,66	< 0,01
<i>MspI</i>	0,69	< 0,01

Resultados de R do teste ANOSIM. Tratamentos com R maiores que 0,75 podem ser considerados bem separados; maiores que 0,5, sobrepostos, mas ainda separados; e menores que 0,25, pouco separados (CLARKE; GORLEY, 2001; RAMETTE, 2007)

O resultado do teste de dois fatores demonstrou que ambos influenciaram as comunidades de organismos do filo, com resultados de R maiores que 0,25, considerados significativos ($p < 0,05$) para ambas as enzimas.

A diversidade da rizosfera de cana-de-açúcar foi anteriormente explorada pelo trabalho de Piza et al. (2011), que encontrou diferentes abundâncias do filo de acordo com o

regime de nitrogênio nas áreas. Ademais, diferentes trabalhos encontraram seus organismos em solos rizosféricos de outras plantas, como os estudos de Chow et al. (2002), Mendes (2014), Rosenberg et al. (2009), Sanguin et al. (2006), Weinert et al. (2011) e Zul et al. (2007).

Destaca-se o estudo de Kielak et al. (2008), que enfocou seu trabalho no estudo dos diferentes ambientes habitados pelos organismos do filo e demonstrou, por meio de bibliotecas de clones do gene 16S rRNA, que o mesmo foi mais encontrado nos solos rizosféricos do que no controle do experimento. Outros grupos de pesquisa também tem estudado o filo com interesse específico em suas subdivisões, como as pesquisas conduzidas por Da Rocha e colaboradores (2010a, 2010b, 2013). Em diferentes trabalhos, representantes da subdivisão 1 foram encontrados e isolados com grande proximidade das raízes de diferentes plantas, o que indica que determinados organismos do filo podem ter preferência por solos rizosféricos (DA ROCHA et al., 2010a, 2010b, 2013).

Os resultados foram comparados quanto aos T-RFs gerados nos diferentes tratamentos, considerados, no trabalho, unidades taxonômicas operacionais. A quantidade de UTOs produzida para ambos os grupos microbianos foi distinta entre cada tratamento e com o uso de cada enzima. Contudo, enquanto as quantidades pouco indicaram quais solos sob diferentes usos apresentaram maior e menor riqueza, de modo geral, o T-RFLP produziu quantidade maior de UTOs nos solos dos controles do que nos solos rizosféricos, o que pode ser explicado pelo fato das comunidades dos solos da rizosfera serem consideradas um subconjunto das presentes nos solos amostrados inicialmente (MENDES et al., 2014).

Foram criados histogramas para os fragmentos com abundância maior que 1%, ou seja, as UTOs dominantes, para melhor compreender a estrutura das comunidades associadas a cada tratamento. Os histogramas dos solos dos controles e dos solos da rizosfera apresentaram propriedades distintas.

O efeito do manejo adotado nos diferentes solos pode ser percebido entre as comunidades dos diferentes tratamentos, mesmo com temperatura e umidade controladas em estufa. Da mesma forma, as comunidades dos solos da rizosfera demonstram maior similaridade entre si, mas ainda conservam atributos associados ao seu solo de origem. Assim, os resultados demonstram, como esperado, que diferentes fatores ambientais modelam, de forma conjunta, as comunidades microbianas do solo.

Gene 16S rRNA de *Bacteria*

A. Enzima *HhaI*

B. Enzima *MspI*

Figura 3.2 - Histograma das UTOs com abundância relativa superior a 1% do T-RFLP do gene 16S rRNA de *Bacteria*. Os números na legenda indicam o tamanho dos fragmentos, em pares de base. (a) Histograma para a enzima *HhaI*. (b) Histograma para a enzima *MspI*. CCC: controle dos solos do canavial com manejo de colheita sem queima. CCQ: controle dos solos do canavial com manejo de colheita com queima. RCC: rizosfera dos solos do canavial com manejo de colheita sem queima. RCQ: rizosfera dos solos do canavial com manejo de colheita com queima

Gene 16S rRNA de *Verrucomicrobia*

A. Enzima *HhaI*

B. Enzima *MspI*

Figura 3.3 - Histograma das UTOs com abundância relativa superior a 1% do T-RFLP do gene 16S rRNA de *Verrucomicrobia*. Os números na legenda indicam o tamanho dos fragmentos, em pares de base. (a) Histograma para a enzima *HhaI*. (b) Histograma para a enzima *MspI*. CCC: controle dos solos do canavial com manejo de colheita sem queima. CCQ: controle dos solos do canavial com manejo de colheita com queima. RCC: rizosfera dos solos do canavial com manejo de colheita sem queima. RCQ: rizosfera dos solos do canavial com manejo de colheita com queima

Os histogramas do T-RFLP das comunidades bacterianas demonstraram que as mesmas tornaram-se mais heterogêneas nos solos rizosféricos do que nos seus respectivos controles, o que demonstra como os grupos dominantes foram afetados pelos exsudatos das plantas. Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Smalla et al (2011), realizado pela metodologia de DGGE (do inglês *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), que demonstrou que a comunidade bacteriana do solo era principalmente formada por poucas bandas fortes e grande quantidade de outras menos intensas, o que indica que poucos grupos microbianos eram dominantes na comunidade. Em contraste, a rizosfera demonstrou maior quantidade de bandas intensas e menos bandas fracas.

Os histogramas do T-RFLP do filo, para ambas as enzimas, demonstraram ser semelhantes aos da comunidade bacteriana, com determinadas UTOs que apresentam grande dominância no grupo, compartilhadas em todos os tratamentos estudados (Figura 3.3). Da mesma forma, as mesmas tornaram-se mais heterogêneas nos solos rizosféricos do que nos seus respectivos controles. As figuras demonstraram que algumas UTOs foram encontradas em maior quantidade nos solos da rizosfera do que nos solos dos controles, enquanto outras apresentaram quantidade menor, o que indica que os organismos do filo podem ser diferencialmente afetados pelos exsudatos das plantas. Apesar de diferentes, as comunidades dominantes do filo apresentaram maiores similaridades. Como a estrutura do filo foi considerada distinta pelo teste de ANOSIM, os resultados podem indicar que grupos menos abundantes podem ter sido os mais alterados pelos tratamentos. Resultados semelhantes foram encontrados por Kielak et al. (2008), no qual o DGGE demonstrou que pequenas dissimilaridades foram encontradas entre as comunidades do grupo de solos de rizosfera de diferentes plantas, mas com poucas bandas dominantes nos diferentes tratamentos.

Por fim, foram criados diagramas com os dados dessas UTOs entre os diferentes tratamentos. As figuras de ambas as comunidades demonstraram que grande abundância de T-RFs foi compartilhada entre os tratamentos, como ilustrado nas Figuras 3.4 e 3.5. De modo geral, a menor quantidade de UTOs compartilhada foi encontrada entre os controles de solos sob diferentes manejos, enquanto a maior quantidade foi compartilhada entre os solos rizosféricos.

Figura 3.4 - Diagrama das UTOs com abundância relativa maior que 1% do T-RFLP do gene 16S rRNA de *Bacteria*. (a) Diagrama para a enzima *HhaI*. (b) Diagrama para a enzima *MspI*. CCC: controle dos solos do canavial com manejo de colheita sem queima. CCQ: controle dos solos do canavial com manejo de colheita com queima. RCC: rizosfera dos solos do canavial com manejo de colheita sem queima. RCQ: rizosfera dos solos do canavial com manejo de colheita com queima

Figura 3.5 - Diagrama das UTOs com abundância relativa maior que 1% do T-RFLP do gene 16S rRNA de *Verrucomicrobia*. (a) Diagrama para a enzima *HhaI*. (b) Diagrama para a enzima *MspI*. CCC: controle dos solos do canavial com manejo de colheita sem queima. CCQ: controle dos solos do canavial com manejo de colheita com queima. RCC: rizosfera dos solos do canavial com manejo de colheita sem queima. RCQ: rizosfera dos solos do canavial com manejo de colheita com queima

Assim, os resultados de T-RFLP demonstram que ambas as comunidades foram alteradas de acordo com o manejo adotado em cada ambiente e com a rizosfera. Contudo, devido aos limites de sensibilidade da metodologia de T-RFLP, maiores estudos podem melhor indicar como e o quanto a diversidade de ambas as comunidades foram afetadas pelos diferentes tratamentos.

3.4.3 qPCR das comunidades de *Bacteria* e do filo *Verrucomicrobia*

O PCR quantitativo em tempo real foi utilizado para comparar a abundância das comunidades de interesse entre os tratamentos de acordo com os fatores estudados, efeito do manejo adotado e da rizosfera. A metodologia foi realizada com o uso de curva padronizada, com quantidade conhecidas do gene 16S rRNA de cada grupo estudado, que abrangeram todas as amostras de DNA analisadas.

A análise da comunidade bacteriana foi realizada com o uso de 10^4 a 10^8 cópias do gene para o desenvolvimento da curva. Todas as placas apresentaram eficiência de 81% a 90% e R^2 entre 0,98 a 0,99. A abundância do grupo diferiu entre os tratamentos, como ilustrado na Figura 3.6. As amostras do canavial sem queima apresentaram, para os solos dos controles, $1,31 \times 10^9$ cópias do gene por grama de solo; enquanto, para os solos rizosféricos, $2,39 \times 10^9$. As amostras do canavial com queima apresentaram, para os solos dos controles, $8,97 \times 10^8$ cópias do gene; enquanto, para os solos rizosféricos, $1,61 \times 10^9$.

Figura 3.6 - Número de cópias do gene 16S rRNA de *Bacteria* por grama de solo para cada tratamento. Os resultados apresentados correspondem às médias para cada tratamento. CCC: controle dos solos do canavial com manejo de colheita sem queima. CCQ: controle dos solos do canavial com manejo de colheita com queima. RCC: rizosfera dos solos do canavial com manejo de colheita sem queima. RCQ: rizosfera dos solos do canavial com manejo de colheita com queima

A abundância do grupo foi considerada estatisticamente diferente ($p < 0,05$) entre os solos dos canaviais sob diferentes manejos, com maiores resultados encontrados associados aos solos do manejo sem queima. Assim, os dados corroboram os resultados encontrados anteriormente, no Estudo 2, e indicam que as comunidades, independentemente do recipiente amostrado, foram afetadas pelo uso do solo.

A abundância dos solos rizosféricos foi considerada estatisticamente maior ($p < 0,05$) que a dos solos dos controles. Outros autores também encontraram resultados semelhantes e demonstraram que a rizosfera pode ser considerada um grande centro de atividade microbiana, com abundância maior do que nos solos adjacentes (SANGUIN et al., 2006), devido ao aumento do fornecimento de nutrientes liberados pelas plantas.

A análise da comunidade do filo foi realizada com o uso de 10^3 a 10^7 cópias do gene para o desenvolvimento da curva. Todas as placas apresentaram eficiência entre 84% a 97% e R^2 entre 0,98 a 0,99. A abundância do gene também diferiu entre os tratamentos (Figura 3.7). As amostras do canavial sem queima apresentaram, para os solos dos controles, $1,44 \times 10^8$ cópias do gene por grama de solo; enquanto, para os solos rizosféricos, $2,06 \times 10^8$. As amostras do canavial com queima apresentaram, para os solos dos controles, $1,02 \times 10^8$ cópias do gene; enquanto, para os solos rizosféricos, $1,48 \times 10^8$.

Figura 3.7 - Número de cópias do gene 16S rRNA de *Verrucomicrobia* por grama de solo para cada tratamento. Os resultados apresentados correspondem às médias para cada tratamento. CCC: controle dos solos do canavial com manejo de colheita sem queima. CCQ: controle dos solos do canavial com manejo de colheita com queima. RCC: rizosfera dos solos do canavial com manejo de colheita sem queima. RCQ: rizosfera dos solos do canavial com manejo de colheita com queima

Da mesma forma que a comunidade bacteriana, a abundância do filo foi considerada estatisticamente maior ($p < 0,05$) nos solos dos canaviais com manejo de colheita sem queima do que nos solos com queima.

A abundância dos solos rizosféricos também foi considerada estatisticamente maior ($p < 0,05$) que a dos solos dos controles. Esse resultado apresenta grande importância para o estudo do filo, pois poucos trabalhos indicaram o efeito da rizosfera sobre o grupo, especialmente em solos tropicais. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Kielak et al. (2008), que apresentou dados da técnica de qPCR para 12 solos rizosféricos de

diferentes espécies de plantas. No trabalho, foi encontrada significância estatística entre os solos rizosféricos e o controle utilizado, o que demonstra a influência das plantas sobre o filo. Os autores demonstraram que, apesar do grupo ter sido representado em maior quantidade na rizosfera, a técnica de qPCR indicou certa similaridade entre a maioria dos solos rizosféricos analisados.

Contudo, ainda pouco se sabe sobre a influência dos exsudatos das plantas sobre a abundância dos organismos do filo, com a maioria dos dados disponíveis obtidos a partir de estudos metagenômicos da comunidade bacteriana. Contudo, como relatado por Bergmann et al. (2011), o filo tem sido subestimado em muitos desses estudos pelo uso de *primers* comumente utilizados para o gene 16S rRNA, o que pode dificultar o entendimento do efeito da rizosfera em seus organismos. Assim, torna-se clara a necessidade de maiores estudos sobre o tema com os membros do filo.

3.5 Conclusão

A partir das duas metodologias empregadas, T-RFLP e qPCR, considerando a sensibilidade e confiabilidade de ambas, o trabalho demonstrou que, mesmo em ambiente controlado, as comunidades estudadas dos solos sob diferentes usos ainda foram distintas em muitos dos parâmetros analisados, o que corrobora os dados encontrados no Estudo 2.

Ambas também foram influenciadas pela rizosfera em sua estrutura e abundância, com quantidades estatisticamente maiores nos solos rizosféricos do que nos seus respectivos controles, como encontrado pela técnica de qPCR. Nesse sentido, os resultados demonstram a necessidade de maior aprofundamento do tema, que pode ser melhor abordado pela análise de tais efeitos nos subgrupos do filo. Assim, o estudo da diversidade do grupo, pelo sequenciamento de seus membros, pode trazer mais dados sobre quais e como os organismos do filo podem ser afetados pela rizosfera.

REFERÊNCIAS

- BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 68, n. 1, p. 1-13, 2009.
- BERGMANN, G. T.; BATES, S. T.; EILERS, K. G.; LAUBER, C. L.; CAPORASO, J. G.; WALTERS, W. A.; KNIGHT, R.; FIERER, N. The under-recognized dominance of *Verrucomicrobia* in soil bacterial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 43, n. 7, p. 1450-1455, 2011.

BUCKLEY, D. H.; SCHMIDT, T. M. Environmental factors influencing the distribution of rRNA from *Verrucomicrobia* in soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 105-112, 2001.

CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA. **Variedades CTC**. Disponível em: <<http://www.ctcanavieira.com.br/downloads/variedades2013WEB3.pdf>>. Acesso em: 31 ago. 2014.

CHOW, M. L.; RADOMSKI, C. C.; MCDERMOTT, J. M.; DAVIES, J.; AXELROOD, P. E. Molecular characterization of bacterial diversity in Lodgepole pine (*Pinus contorta*) rhizosphere soils from British Columbia forest soils differing in disturbance and geographic source. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 42, n. 3, p. 347-57, 2002.

CLARKE, K. R.; GORLEY, R. N. **PRIMER v5**: User manual/tutorial. Plymouth, 2001, 91 p.

DA ROCHA, U. N.; ANDREOTE, F. D.; DE AZEVEDO, J. L.; VAN ELSAS, J. D.; VAN OVERBEEK, L. S. Cultivation of hitherto-uncultured bacteria belonging to the *Verrucomicrobia* subdivision 1 from the potato (*Solanum tuberosum* L.) rhizosphere. **Journal of Soils and Sediments**, Landsberg, v. 10, n. 2, p. 326-339, 2010a.

DA ROCHA, U. N.; PLUGGE, C. M.; GEORGE, I.; VAN ELSAS, J. D.; VAN OVERBEEK, L. S. The rhizosphere selects for particular groups of *Acidobacteria* and *Verrucomicrobia*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 12, 2013.

DA ROCHA, U. N.; VAN ELSAS, J. D.; VAN OVERBEEK, L. S. Real-time PCR detection of *Holophagae* (*Acidobacteria*) and *Verrucomicrobia* subdivision 1 groups in bulk and leek (*Allium porrum*) rhizosphere soils. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 83, n. 2, p. 141-148, 2010b.

DA ROCHA, U. N.; VAN ELSAS, J. D.; VAN OVERBEEK, L. S. *Verrucomicrobia* subdivision 1 strains display a difference in the colonization of the leek (*Allium porrum*) rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 78, n. 2, p. 297-305, 2011.

DA ROCHA, U. N.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Exploration of hitherto-uncultured bacteria from the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 69, n. 3, p. 313-328, 2009.

DUINEVELD, B. M.; KOWALCHUK, G. A.; KEIJZER, A.; VAN ELSAS, J. D.; VAN VEEN, J. A. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 67, n. 1, p. 172-178, 2001.

ELLER, G.; KRÜGER, M.; FRENZEL, P. Comparing field and microcosm experiments: a case study on methano- and methylo-trophic bacteria in paddy soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 51, n. 2, p. 279-291, 2005.

EMBRAPA. **Fenologia da cana-de-açúcar**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_68_22122006154840.html>. Acesso em: 29 set. 2014.

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

GASCHO, G. J.; SHIH, S. F. Sugarcane. In: TEARE, I. D.; PEET, M. M. (Ed.). **Crop-water relations**. New York: Wiley-Interscience, 1983. p. 445-479.

GRAYSTON, S. J.; WANG, S.; CAMPBELL, C. D.; EDWARDS, A. C. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 369-378, 1998.

HAICHAR, F. Z.; MAROL, C.; BERGE, O.; RANGEL-CASTRO, J. I.; PROSSER, J. I.; BALESDENT, J.; HEULIN, T.; ACHOUAK, W. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. **The ISME Journal**, London, v. 2, p. 1221-1230, 2008.

HEDLUND, B. P.; GOSINK, J. J.; STALEY, J. T. *Verrucomicrobia* div. nov., a new division of the *Bacteria* containing three new species of *Prostheco bacter*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 72, n. 1, p. 29-38, 1997.

KIELAK, A.; PIJL, A. S.; VAN VEEN, J. A.; KOWALCHUK, G. A. Differences in vegetation composition and plant species identity lead to only minor changes in soil-borne microbial communities in a former arable field. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 63, n. 3, p. 372-382, 2008.

KURAMAE, E. E.; YERGEAU, E.; WONG, L. C.; PIJL, A. S.; VAN VEEN, J. A.; KOWALCHUK, G. A. Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 12-24, 2012.

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

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

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

ROSENBERG, K.; BERTAUX, J.; KROME, K.; HARTMANN, A.; SCHEU, S.; BONKOWSKI, M. Soil amoebae rapidly change bacterial community composition in the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana*. **The ISME Journal**, London, v. 3, p. 675-684, 2009.

SANGUIN, H.; REMENANT, B.; DECHESNE, A.; THIOULOUSE, J.; VOGEL, T. M.; NESME, X.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; GRUNDMANN, G. L. Potential of a 16S rRNA-based taxonomic microarray for analyzing the rhizosphere effects of maize on *Agrobacterium* spp. and bacterial communities. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 72, n. 6, p. 4302-4312, 2006.

SANGWAN, P.; KOVAC, S.; DAVIS, K. E. R.; SAIT, M.; JANSSEN, P. H. Detection and cultivation of soil *Verrucomicrobia*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 71, n. 12, p. 8402-8410, 2005.

SMALLA, K.; WIELAND, G.; BUCHNER, A.; ZOCK, A.; PARZY, J.; KAISER, S.; ROSKOT, N.; HEUER, H.; BERG, G. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 10, p. 4742-4751, 2001.

WALLENIOUS, K.; RITA, H.; MIKKONEN, A.; LAPPI, K.; LINDSTRÖM, K.; HARTIKAINEN, H.; RAATELAND, A.; NIEMI, R. M. Effects of land use on the level, variation and spatial structure of soil enzyme activities and bacterial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 43, n. 7, p. 1464-1473, 2011.

WEINERT, N.; PICENO, Y.; DING, G.; MEINCKE, R.; HEUER, H.; BERG, G.; SCHLOTTER, M.; ANDERSEN, G.; SMALLA, K. PhyloChip hybridization uncovered an enormous bacterial diversity in the rhizosphere of different potato cultivars: many common and few cultivar-dependent taxa. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 75, n. 3, p. 497-506, 2011.

XU, Y.; WANG, G.; JIN, J.; LIU, J.; ZHANG, Q.; LIU, X. Bacterial communities in soybean rhizosphere in response to soil type, soybean genotype, and their growth stage. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 41, n. 5, p. 919-925, 2009.

ZUL, D.; DENZEL, S.; KOTZ, A.; OVERMANN, J. Effects of plant biomass, plant diversity, and water content on bacterial communities in soil lysimeters: implications for the determinants of bacterial diversity. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 73, n. 21, p. 6916-6929, 2007.C

ANEXOS

ANEXO A - Resultado das sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas no estudo comparadas com as depositadas nos bancos de dados do *Ribosomal Database Project* (RDP) pelo programa *Classifier*

(continua)

Biblioteca	Clone	Filo	%	Filo	%	Classe	%	Ordem	%	Família	%	Gênero	%
CC	Clone CC 1	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 2	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 3	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 4	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 5	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 6	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 7	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 8	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 9	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 10	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 11	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 12	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 13	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 14	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 15	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 16	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 17	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Opitutae</i>	100%	<i>Puniceococcales</i>	100%	<i>Puniceicoccaceae</i>	100%	Sem classificação	100%
CC	Clone CC 18	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 19	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	Sem classificação	100%
CC	Clone CC 20	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 21	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 22	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 23	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 24	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 25	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 26	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%

ANEXO A - Resultado das sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas no estudo comparadas com as depositadas nos bancos de dados do *Ribosomal Database Project* (RDP) pelo programa *Classifier*

(continuação)

Biblioteca	Clone	Filo	%	Filo	%	Classe	%	Ordem	%	Família	%	Gênero	%
CC	Clone CC 27	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 28	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 29	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 30	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 31	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 32	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 33	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 34	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 35	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Verrucomicrobiae</i>	100%	<i>Verrucomicrobiales</i>	100%	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	100%	<i>Roseimicrobium</i>	100%
CC	Clone CC 36	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 37	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 38	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 39	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 40	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 41	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 42	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 43	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 44	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 45	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 46	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 47	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 48	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 49	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 50	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 51	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CC	Clone CC 52	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%

ANEXO A - Resultado das sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas no estudo comparadas com as depositadas nos bancos de dados do *Ribosomal Database Project* (RDP) pelo programa *Classifier*

(continuação)

Biblioteca	Clone	Filo	%	Filo	%	Classe	%	Ordem	%	Família	%	Gênero	%
CC	Clone CC 53	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 1	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Verrucomicrobiae</i>	100%	-	-	-	-	Sem classificação	100%
CQ	Clone CQ 2	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 3	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 4	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 5	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 6	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 7	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 8	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 9	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 10	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 11	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 12	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 13	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 14	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 15	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 16	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 17	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 18	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 19	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 20	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 21	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 22	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 23	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Verrucomicrobiae</i>	100%	<i>Verrucomicrobiales</i>	100%	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	100%	Sem classificação	100%
CQ	Clone CQ 24	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 25	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%

ANEXO A - Resultado das sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas no estudo comparadas com as depositadas nos bancos de dados do *Ribosomal Database Project* (RDP) pelo programa *Classifier*

(continuação)

Biblioteca	Clone	Filo	%	Filo	%	Classe	%	Ordem	%	Família	%	Gênero	%
CQ	Clone CQ 26	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	Sem classificação	100%	-	-	-	-	Sem classificação	100%
CQ	Clone CQ 27	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 28	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 29	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 30	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 31	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 32	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 33	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 34	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	Sem classificação	100%
CQ	Clone CQ 35	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 36	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 37	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 38	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 39	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 40	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 41	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 42	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 43	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Verrucomicrobiae</i>	100%	<i>Verrucomicrobiales</i>	100%	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	100%	<i>Roseimicrobium</i>	100%
CQ	Clone CQ 44	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	Sem classificação	100%	-	-	-	-	Sem classificação	100%
CQ	Clone CQ 45	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 46	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 47	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 48	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 49	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 50	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	Sem classificação	100%
CQ	Clone CQ 51	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%

ANEXO A - Resultado das sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas no estudo comparadas com as depositadas nos bancos de dados do *Ribosomal Database Project* (RDP) pelo programa *Classifier*

(continuação)

Biblioteca	Clone	Filo	%	Filo	%	Classe	%	Ordem	%	Família	%	Gênero	%
CQ	Clone CQ 52	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 53	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 54	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 55	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 56	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 57	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 58	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 59	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 60	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 61	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 62	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 63	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 64	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
CQ	Clone CQ 65	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 1	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 2	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 3	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 4	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 5	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 6	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 7	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 8	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 9	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 10	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 11	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 12	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%

ANEXO A - Resultado das sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas no estudo comparadas com as depositadas nos bancos de dados do *Ribosomal Database Project* (RDP) pelo programa *Classifier*

(continuação)

Biblioteca	Clone	Filo	%	Filo	%	Classe	%	Ordem	%	Família	%	Gênero	%
VN	Clone VN 13	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 14	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 15	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 16	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 17	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Verrucomicrobiae</i>	100%	<i>Verrucomicrobiales</i>	100%	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	100%	<i>Luteolibacter</i>	100%
VN	Clone VN 18	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 19	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 20	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 21	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 22	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 23	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 24	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 25	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 26	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 27	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 28	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 29	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 30	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 31	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 32	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 33	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	Sem classificação	100%	-	-	-	-	Sem classificação	100%
VN	Clone VN 34	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 35	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 36	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 37	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 38	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%

ANEXO A - Resultado das sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas no estudo comparadas com as depositadas nos bancos de dados do *Ribosomal Database Project* (RDP) pelo programa *Classifier*

(continuação)

Biblioteca	Clone	Filo	%	Filo	%	Classe	%	Ordem	%	Família	%	Gênero	%
VN	Clone VN 39	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Verrucomicrobiae</i>	100%	<i>Verrucomicrobiales</i>	100%	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	100%	<i>Luteolibacter</i>	100%
VN	Clone VN 40	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Verrucomicrobiae</i>	100%	<i>Verrucomicrobiales</i>	100%	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	100%	<i>Luteolibacter</i>	100%
VN	Clone VN 41	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Verrucomicrobiae</i>	100%	<i>Verrucomicrobiales</i>	100%	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	100%	Sem classificação	100%
VN	Clone VN 42	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 43	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Opitutae</i>	100%	<i>Opitutales</i>	100%	<i>Opitutaceae</i>	100%	<i>Opitutus</i>	100%
VN	Clone VN 44	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	Sem classificação	100%	-	-	-	-	Sem classificação	100%
VN	Clone VN 45	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 46	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 47	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 48	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 49	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 50	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 51	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 52	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 53	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 54	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 55	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 56	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 57	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 58	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 59	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 60	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 61	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 62	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 63	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	Sem classificação	100%	-	-	-	-	Sem classificação	100%
VN	Clone VN 64	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%

ANEXO A - Resultado das sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas no estudo comparadas com as depositadas no banco de dados do *Ribosomal Database Project* (RDP) pelo programa *Classifier*

(conclusão)													
Biblioteca	Clone	Filo	%	Filo	%	Classe	%	Ordem	%	Família	%	Gênero	%
VN	Clone VN 65	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 66	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 67	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 68	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 69	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	Sem classificação	100%	-	-	-	-	Sem classificação	100%
VN	Clone VN 70	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 71	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 72	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 73	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 74	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 75	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 76	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 77	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 78	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 79	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 80	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 81	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 82	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 83	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Spartobacteria</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%
VN	Clone VN 84	<i>Bacteria</i>	100%	<i>Verrucomicrobia</i>	100%	<i>Subdivision 3</i>	100%	-	-	-	-	<i>Genera incertae sedis</i>	100%

CC: canavial com manejo de colheita sem queima. CQ: canavial com manejo de colheita com queima. VN: área de vegetação nativa

ANEXO B - Resultado das sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas no estudo comparadas com as depositadas no banco *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) pelo programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)

(continua)

Biblioteca	Clone	Número de acesso	Identidade	Organismo	Ambiente encontrado
CC	Clone CC 1	DQ829845.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone AG2_A08</i>	Solo de cultivo de arroz
CC	Clone CC 2	JF410593.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Pas_10_35</i>	Solo da floresta Amazônica
CC	Clone CC 3	JQ366516.2	99%	<i>Uncultured bacterium clone NC41a12_15765</i>	Solo de estudo FACE (<i>Free Air CO₂ Enrichment</i>)
CC	Clone CC 4	HQ684274.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone OII148</i>	Solo de floresta
CC	Clone CC 5	JQ769934.1	98%	<i>Uncultured bacterium clone YL-87</i>	Solo de rejeitos de mina de cobre
CC	Clone CC 6	HQ684363.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone OII329</i>	Solo de floresta
CC	Clone CC 7	JQ367623.2	99%	<i>Uncultured bacterium clone NCD1s1Power5_2757</i>	Solo de estudo FACE (<i>Free Air CO₂ Enrichment</i>)
CC	Clone CC 8	DQ017913.1	95%	<i>Uncultured bacterium clone S-Btb7_11</i>	Córrego
CC	Clone CC 9	JQ366887.2	99%	<i>Uncultured bacterium clone TE1c1530KTS118121ufunk00e8_3015</i>	Solo de estudo FACE (<i>Free Air CO₂ Enrichment</i>)
CC	Clone CC 10	JF410787.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Fall_14_29</i>	Solo da floresta Amazônica
CC	Clone CC 11	JQ372962.2	96%	<i>Uncultured bacterium clone NCD3s1Fastb10_2806</i>	Solo de estudo FACE (<i>Free Air CO₂ Enrichment</i>)
CC	Clone CC 12	HQ322744.1	96%	<i>Uncultured bacterium clone W2-55</i>	Drenagem ácida de mina
CC	Clone CC 13	JF428991.1	100%	<i>Uncultured bacterium clone G35</i>	Solo rizosférico rico em potássio
CC	Clone CC 14	JF181575.1	95%	<i>Uncultured bacterium clone ncd2096b08c1</i>	Pele de <i>Homo Sapiens</i>
CC	Clone CC 15	JF410832.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Fall_15_24</i>	Solo da floresta Amazônica
CC	Clone CC 16	JF410589.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Pas_10_31</i>	Solo da floresta Amazônica
CC	Clone CC 17	AB718384.1	98%	<i>Uncultured bacterium clone ANTSB1_D07</i>	Folha de arroz
CC	Clone CC 18	JQ367953.2	99%	<i>Uncultured bacterium clone NCD3s1FastKTS108942ufunk00h9_2882</i>	Solo de estudo FACE (<i>Free Air CO₂ Enrichment</i>)
CC	Clone CC 19	JF410738.1	97%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Fall_13_30</i>	Solo da floresta Amazônica
CC	Clone CC 20	EU335150.1	92%	<i>Uncultured bacterium clone BacC-s_050</i>	Agregado de solo
CC	Clone CC 21	DQ828726.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone DOK_CONFYM_clone483</i>	Solo agrícola
CC	Clone CC 22	JF410293.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone For_4_35</i>	Solo da floresta Amazônica
CC	Clone CC 23	HQ119427.1	94%	<i>Uncultured bacterium isolate 1112869341444</i>	Solo de floresta de <i>Eucalyptus</i>
CC	Clone CC 24	HQ404602.1	98%	<i>Uncultured soil bacterium clone BAVGRD83</i>	Solo rizosférico de <i>Thysanolaena agrostis</i>
CC	Clone CC 25	AJ617869.1	98%	<i>Uncultured bacterium clone D142114</i>	Solo inundado de cultivo de arroz
CC	Clone CC 26	HQ684274.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone OII148</i>	Solo de floresta

ANEXO B - Resultado das sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas no estudo comparadas com as depositadas no banco *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) pelo programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)

(continuação)

Biblioteca	Clone	Número de acesso	Identidade	Organismo	Ambiente encontrado
CC	Clone CC 27	JF410427.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Pas_7_19</i>	Solo da floresta Amazônica
CC	Clone CC 28	JQ366764.2	100%	<i>Uncultured bacterium clone NC4F3c4_2969</i>	Solo de estudo FACE (<i>Free Air CO₂ Enrichment</i>)
CC	Clone CC 29	JQ366887.2	99%	<i>Uncultured bacterium clone TE1c1530KTS118121ufunk00e8_3015</i>	Solo de estudo FACE (<i>Free Air CO₂ Enrichment</i>)
CC	Clone CC 30	EF492924.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone JH-WH68</i>	Solo ao redor de nódulo de ferro-manganês
CC	Clone CC 31	JF410427.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Pas_7_19</i>	Solo da floresta Amazônica
CC	Clone CC 32	JQ769864.1	97%	<i>Uncultured bacterium clone YL-17</i>	Solo de rejeitos de mina de cobre
CC	Clone CC 33	EU300470.1	97%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone GASP-KC3W2_B06</i>	Solo de pasto restaurado
CC	Clone CC 34	JF410822.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Fall_15_14</i>	Solo da floresta Amazônica
CC	Clone CC 35	KF182749.1	98%	<i>Uncultured Verrucomicrobiae bacterium clone S1-004</i>	Solo de cultivo de <i>Arachis hypogaea</i> L.
CC	Clone CC 36	JF410381.1	98%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Pas_6_23</i>	Solo da floresta Amazônica
CC	Clone CC 37	JF410643.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Fall_11_35</i>	Solo da floresta Amazônica
CC	Clone CC 38	HQ684274.1	98%	<i>Uncultured bacterium clone OII148</i>	Solo de floresta
CC	Clone CC 39	JQ366892.2	99%	<i>Uncultured bacterium clone NCD3s1Powerc9_3012</i>	Solo de estudo FACE (<i>Free Air CO₂ Enrichment</i>)
CC	Clone CC 40	JF410758.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Fall_13_50</i>	Solo da floresta Amazônica
CC	Clone CC 41	EU135514.1	97%	<i>Uncultured bacterium clone FFCH15477</i>	Solo de pradaria
CC	Clone CC 42	JF410673.1	97%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Fall_12_15</i>	Solo da floresta Amazônica
CC	Clone CC 43	AB661128.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone B0610D003_A09</i>	Solo de cultivo de arroz
CC	Clone CC 44	EF074565.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobiae bacterium clone GASP-WC1S3_B12</i>	Solo de pastagem
CC	Clone CC 45	AB273830.1	98%	<i>Uncultured bacterium clone EXP.1-16S-13C-light-Clone_42</i>	Solo de cultivo de arroz
CC	Clone CC 46	JQ366514.2	98%	<i>Uncultured bacterium clone NC3F4c5_15767</i>	Solo de estudo FACE (<i>Free Air CO₂ Enrichment</i>)
CC	Clone CC 47	JF410589.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Pas_10_31</i>	Solo da floresta Amazônica
CC	Clone CC 48	JF410781.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone</i>	Solo da floresta Amazônica
CC	Clone CC 49	JF410823.1	98%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Fall_15_15</i>	Solo da floresta Amazônica
CC	Clone CC 50	JF410710.1	98%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Fall_13_2_16S</i>	Solo da floresta Amazônica
CC	Clone CC 51	JX505101.1	95%	<i>Uncultured Verrucomicrobium sp. clone D.an-34</i>	Solo
CC	Clone CC 52	EU299656.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone GASP-KC2S1_F03</i>	Solo de pasto restaurado

ANEXO B - Resultado das sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas no estudo comparadas com as depositadas no banco *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) pelo programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)

(continuação)

Biblioteca	Clone	Número de acesso	Identidade	Organismo	Ambiente encontrado
CC	Clone CC 53	JQ366777.2	98%	<i>Uncultured bacterium clone W033g2_2921</i>	Solo de estudo FACE (<i>Free Air CO₂ Enrichment</i>)
CQ	Clone CQ 1	AJ863205.1	99%	<i>Uncultured bacterium partial</i>	Solo de cultivo de <i>Populus</i> sp.
CQ	Clone CQ 2	HQ684267.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone OII141</i>	Solo de floresta
CQ	Clone CQ 3	AB661128.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone B0610D003_A09</i>	Solo de cultivo de arroz
CQ	Clone CQ 4	JX099952.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone HLLCs169</i>	Solo de floresta
CQ	Clone CQ 5	JQ367783.2	99%	<i>Uncultured bacterium clone NC3F1d12_3128</i>	Solo de estudo FACE (<i>Free Air CO₂ Enrichment</i>)
CQ	Clone CQ 6	JQ769934.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone YL-87</i>	Solo de rejeitos de mina de cobre
CQ	Clone CQ 7	EU299282.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobiae bacterium clone GASP-KCIS3_E03</i>	Solo de pasto restaurado
CQ	Clone CQ 8	FJ822635.1	97%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone 23Lo</i>	Solo rizosférico de <i>Lotus corniculatus</i>
CQ	Clone CQ 9	JQ377395.2	99%	<i>Uncultured bacterium clone F11Bf12_3239</i>	Solo de estudo FACE (<i>Free Air CO₂ Enrichment</i>)
CQ	Clone CQ 10	JF410323.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone For_5_15</i>	Solo da floresta Amazônica
CQ	Clone CQ 11	HM332231.1	98%	<i>Uncultured bacterium clone ncd980b03c1</i>	Pele de <i>Homo Sapiens</i>
CQ	Clone CQ 12	HM332231.1	97%	<i>Uncultured bacterium clone ncd980b03c1</i>	Pele de <i>Homo Sapiens</i>
CQ	Clone CQ 13	FJ822624.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone 10Fe</i>	Solo rizosférico de <i>Festuca ovina</i>
CQ	Clone CQ 14	HM580165.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone cd1H12</i>	Solo de Cerrado
CQ	Clone CQ 15	EU298336.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone GASP-KB2W2_H10</i>	Solo de pradaria nativa queimada
CQ	Clone CQ 16	JF410593.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Pas_10_35</i>	Solo da floresta Amazônica
CQ	Clone CQ 17	JF440496.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone CG330</i>	Solo de floresta
CQ	Clone CQ 18	HM332231.1	98%	<i>Uncultured bacterium clone ncd980b03c1</i>	Pele de <i>Homo Sapiens</i>
CQ	Clone CQ 19	JQ366721.2	96%	<i>Uncultured bacterium clone WAm3d1_2701</i>	Solo de estudo FACE (<i>Free Air CO₂ Enrichment</i>)
CQ	Clone CQ 20	JF410448.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Pas_7_40</i>	Solo da floresta Amazônica
CQ	Clone CQ 21	JQ368178.2	99%	<i>Uncultured bacterium clone W033d9_2754</i>	Solo de estudo FACE (<i>Free Air CO₂ Enrichment</i>)
CQ	Clone CQ 22	EU297605.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone GASP-KB1S2_B09</i>	Solo de pradaria nativa queimada
CQ	Clone CQ 23	AJ863205.1	99%	<i>Uncultured bacterium partial clone 20BSU56</i>	Solo de cultivo de <i>Populus</i> sp.
CQ	Clone CQ 24	JF410754.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Fall_13_46</i>	Solo da floresta Amazônica
CQ	Clone CQ 25	JX110458.1	95%	<i>Uncultured bacterium clone KAS-R11</i>	Água subterrânea contaminada com arsênico

ANEXO B - Resultado das sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas no estudo comparadas com as depositadas no banco *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) pelo programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)

(continuação)

Biblioteca	Clone	Número de acesso	Identidade	Organismo	Ambiente encontrado
CQ	Clone CQ 26	GQ093817.1	96%	<i>Uncultured bacterium clone nbw425d12c1</i>	Pele de <i>Homo Sapiens</i>
CQ	Clone CQ 27	JQ372963.2	97%	<i>Uncultured bacterium clone TA4a05a3_2804</i>	Solo de estudo FACE (<i>Free Air CO₂ Enrichment</i>)
CQ	Clone CQ 28	EU297605.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone GASP-KB1S2_B09</i>	Solo de pradaria nativa queimada
CQ	Clone CQ 29	JF410323.1	96%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone For_5_15</i>	Solo da floresta Amazônica
CQ	Clone CQ 30	EF072677.1	98%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone GASP-WA2S2_E11</i>	Solo
CQ	Clone CQ 31	DQ123746.1	98%	<i>Uncultured soil bacterium clone PAH-Bio-85</i>	Solo contaminado
CQ	Clone CQ 32	JF410427.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Pas_7_19</i>	Solo da floresta Amazônica
CQ	Clone CQ 33	FJ822624.1	100%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone 10Fe</i>	Solo rizosférico de <i>Festuca ovina</i>
CQ	Clone CQ 34	JF410626.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Fall_11_18</i>	Solo da floresta Amazônica
CQ	Clone CQ 35	JF410323.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone For_5_15</i>	Solo da floresta Amazônica
CQ	Clone CQ 36	EF516305.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone FCPN716</i>	Solo de pasto
CQ	Clone CQ 37	FJ822624.1	97%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone 10Fe</i>	Solo rizosférico de <i>Festuca ovina</i>
CQ	Clone CQ 38	FJ845162.1	96%	<i>Uncultured bacterium clone R-Des131</i>	Solo rizosférico de batata
CQ	Clone CQ 39	JQ367783.2	99%	<i>Uncultured bacterium clone NC3F1d12_3128</i>	Solo de estudo FACE (<i>Free Air CO₂ Enrichment</i>)
CQ	Clone CQ 40	JX099952.1	98%	<i>Uncultured bacterium clone HLLCs169</i>	Solo de floresta
CQ	Clone CQ 41	JF410427.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Pas_7_19</i>	Solo da floresta Amazônica
CQ	Clone CQ 42	JF410845.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Fall_15_37</i>	Solo da floresta Amazônica
CQ	Clone CQ 43	HQ119238.1	99%	<i>Uncultured bacterium isolate 1112865250934</i>	Solo de floresta de <i>Eucalyptus</i>
CQ	Clone CQ 44	FR687531.1	94%	<i>Uncultured bacterium partial</i>	Solo
CQ	Clone CQ 45	JF410822.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Fall_15_14</i>	Solo da floresta Amazônica
CQ	Clone CQ 46	KC306887.1	97%	<i>Uncultured bacterium clone AU1124</i>	Solo
CQ	Clone CQ 47	JQ366807.2	96%	<i>Uncultured bacterium clone TA4a05h7_2608</i>	Solo de estudo FACE (<i>Free Air CO₂ Enrichment</i>)
CQ	Clone CQ 48	HG327575.1	99%	<i>Uncultured bacterium 13C30d-2-53</i>	Solo cultivável
CQ	Clone CQ 49	EF188458.1	98%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone 1067</i>	Caverna
CQ	Clone CQ 50	AB245342.1	98%	<i>Spartobacteria bacterium Gsoil 144</i>	Solo de cultivo de ginseng
CQ	Clone CQ 51	FJ822624.1	97%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone 10Fe</i>	Solo rizosférico de <i>Festuca ovina</i>

ANEXO B - Resultado das sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas no estudo comparadas com as depositadas no banco *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) pelo programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)

(continuação)

Biblioteca	Clone	Número de acesso	Identidade	Organismo	Ambiente encontrado
CQ	Clone CQ 52	HM332231.1	97%	<i>Uncultured bacterium clone ncd980b03c1</i>	Pele de <i>Homo Sapiens</i>
CQ	Clone CQ 53	EF665522.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone GASP-MB2W3_H10</i>	Solo de floresta
CQ	Clone CQ 54	KC604663.1	97%	<i>Uncultured bacterium clone CarbonSeq02a_030410_E07</i>	Água subterrânea
CQ	Clone CQ 55	JQ366757.2	99%	<i>Uncultured bacterium clone TE1b515a7_2962</i>	Solo de estudo FACE (<i>Free Air CO₂ Enrichment</i>)
CQ	Clone CQ 56	JQ366567.2	97%	<i>Uncultured bacterium clone NC34d12_15576</i>	Solo de estudo FACE (<i>Free Air CO₂ Enrichment</i>)
CQ	Clone CQ 57	KC922943.1	95%	<i>Uncultured bacterium clone 450cmOC0090</i>	Água subterrânea com descarga de sedimentos
CQ	Clone CQ 58	JF410781.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Fall_14_23</i>	Solo da floresta Amazônica
CQ	Clone CQ 59	EU298336.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone GASP-KB2W2_H10</i>	Solo de pradaria preservada
CQ	Clone CQ 60	EF516305.1	98%	<i>Uncultured bacterium clone FCPN716</i>	Solo de pasto
CQ	Clone CQ 61	JQ357279.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone MRD18_D08</i>	Solo com resíduos em decomposição
CQ	Clone CQ 62	JF096995.1	97%	<i>Uncultured bacterium clone ncd1314c04c1</i>	Pele de <i>Homo Sapiens</i>
CQ	Clone CQ 63	JQ366825.2	98%	<i>Uncultured bacterium clone NC34g1_16050</i>	Solo de estudo FACE (<i>Free Air CO₂ Enrichment</i>)
CQ	Clone CQ 64	JQ368262.2	98%	<i>Uncultured bacterium clone W032c8_2785</i>	Solo de estudo FACE (<i>Free Air CO₂ Enrichment</i>)
CQ	Clone CQ 65	EF516305.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone FCPN716</i>	Solo de pasto
VN	Clone VN 1	HM270141.1	98%	<i>Uncultured bacterium clone ncd261b06c1</i>	Pele de <i>Homo Sapiens</i>
VN	Clone VN 2	EF074434.1	96%	<i>Uncultured Verrucomicrobiae bacterium clone GASP-WC1S1_G03</i>	Solo de pastagem
VN	Clone VN 3	EU298003.1	98%	<i>Uncultured Verrucomicrobiae bacterium clone GASP-KB2S1_B11</i>	Solo de pradaria nativa queimada
VN	Clone VN 4	HM069101.1	97%	<i>Uncultured bacterium clone T189</i>	Sedimento de planalto de rio
VN	Clone VN 5	EU135434.1	98%	<i>Uncultured bacterium clone FFCH7408</i>	Solo de pradaria preservada
VN	Clone VN 6	HQ684444.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone OI2203</i>	Solo de floresta
VN	Clone VN 7	JX080274.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone 223</i>	Solo de campo de gás
VN	Clone VN 8	EU135497.1	94%	<i>Uncultured bacterium clone FFCH12984</i>	Solo de pradaria preservada
VN	Clone VN 9	HQ684267.1	97%	<i>Uncultured bacterium clone OII141</i>	Solo de floresta
VN	Clone VN 10	EU297516.1	98%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone GASP-KB1S1_G08</i>	Solo de pradaria nativa queimada
VN	Clone VN 11	AJ252700.1	98%	<i>Rhizosphere soil bacterium clone RSC-II-86</i>	Solo rizosférico
VN	Clone VN 12	JX133524.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone LG67</i>	Solo

ANEXO B - Resultado das sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas no estudo comparadas com as depositadas no banco *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) pelo programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)

(continuação)

Biblioteca	Clone	Número de acesso	Identidade	Organismo	Ambiente encontrado
VN	Clone VN 13	EF516305.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone FCPN716</i>	Solo de pasto
VN	Clone VN 14	EU297516.1	98%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone GASP-KB1S1_G08</i>	Solo de pradaria nativa queimada
VN	Clone VN 15	JF833738.1	97%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone C294</i>	Solo de mina de potássio
VN	Clone VN 16	JF429075.1	98%	<i>Uncultured bacterium clone B36</i>	Solo rizosférico de amora rico em potássio
VN	Clone VN 17	AB630655.1	98%	<i>Uncultured bacterium clone MPB1-273</i>	Pilares de musgos aquáticos
VN	Clone VN 18	EU299257.1	97%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone GASP-KC1S3_B12</i>	Solo de pasto restaurado
VN	Clone VN 19	EU297544.1	98%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone GASP-KB1S2_E07</i>	Solo de pradaria queimada
VN	Clone VN 20	FJ479432.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone p11k07ok</i>	Solo de pradaria preservada
VN	Clone VN 21	EF072830.1	98%	<i>Uncultured Verrucomicrobiae bacterium clone GASP-WA2W1_D01</i>	Solo
VN	Clone VN 22	EU297076.1	97%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone GASP-KA1S2_G07</i>	Solo agrícola
VN	Clone VN 23	GQ402763.1	97%	<i>Uncultured bacterium clone PW358</i>	Solo de floresta pantanosa
VN	Clone VN 24	HQ684327.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone OII246</i>	Solo de floresta
VN	Clone VN 25	AB273830.1	96%	<i>Uncultured bacterium clone EXP.1-16S-13C-light-Clone_42</i>	Solo de cultivo de arroz
VN	Clone VN 26	HQ118621.1	99%	<i>Uncultured bacterium isolate 1112851586983</i>	Solo de floresta de <i>Eucalyptus</i>
VN	Clone VN 27	JF429075.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone B36</i>	Solo rizosférico de amora rico em potássio
VN	Clone VN 28	FJ542833.1	98%	<i>Uncultured Verrucomicrobiales bacterium clone A03-04A</i>	Intestino de <i>Eisenia fetida</i>
VN	Clone VN 29	EF074932.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone GASP-WC2S1_D09</i>	Solo de pastagem
VN	Clone VN 30	HM318155.1	98%	<i>Uncultured bacterium clone ncd333b05c1</i>	Pele de <i>Homo Sapiens</i>
VN	Clone VN 31	AB661128.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone B0610D003_A09</i>	Solo de cultivo de arroz
VN	Clone VN 32	JQ368214.2	99%	<i>Uncultured bacterium clone TE1c1530a11_3206</i>	Solo de estudo FACE (<i>Free Air CO₂ Enrichment</i>)
VN	Clone VN 33	DQ450781.1	92%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone G07_WMSP2</i>	Solo de campina úmida com tundra alpina
VN	Clone VN 34	EF074434.1	98%	<i>Uncultured Verrucomicrobiae bacterium clone GASP-WC1S1_G03</i>	Solo de pastagem
VN	Clone VN 35	HM558818.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone BIGO833</i>	Colônia de fungos de <i>Atta colombica</i>
VN	Clone VN 36	KF912984.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone Y1-31</i>	Solo contaminado com cromo
VN	Clone VN 37	JX100253.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone HLUCs142</i>	Solo de floresta
VN	Clone VN 38	AB661128.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone B0610D003_A09</i>	Solo de cultivo de arroz

ANEXO B - Resultado das sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas no estudo comparadas com as depositadas no banco *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) pelo programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)

(continuação)

Biblioteca	Clone	Número de acesso	Identidade	Organismo	Ambiente encontrado
VN	Clone VN 39	AB630655.1	98%	<i>Uncultured bacterium clone MPB1-273</i>	Pilares de musgos aquáticos
VN	Clone VN 40	FJ438004.1	98%	<i>Uncultured bacterium clone FGL7S_B5</i>	Sedimentos superficiais aquáticos
VN	Clone VN 41	AB179534.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone MIZ43</i>	Rocha sedimentar
VN	Clone VN 42	HM069059.1	93%	<i>Uncultured bacterium clone R254</i>	Sedimento de lago
VN	Clone VN 43	GU359064.1	98%	<i>Uncultured bacterium clone IS18</i>	Solo rizosférico de amendoim
VN	Clone VN 44	JF440374.1	92%	<i>Uncultured bacterium clone CG110</i>	Solo de floresta
VN	Clone VN 45	JF833738.1	95%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone C294</i>	Solo de mina de potássio
VN	Clone VN 46	EF662974.1	98%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone GASP-MA2S2_F06</i>	Solo agrícola
VN	Clone VN 47	JX112965.1	97%	<i>Uncultured bacterium clone MNII3C29-B56</i>	Solo de cultivo de arroz
VN	Clone VN 48	JQ369739.2	99%	<i>Uncultured bacterium clone TA4a05f6_2829</i>	Solo de estudo FACE (<i>Free Air CO₂ Enrichment</i>)
VN	Clone VN 49	HQ684267.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone OII141</i>	Solo de floresta
VN	Clone VN 50	EF032769.1	97%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone HAVOmat09</i>	Manto de cianobactérias
VN	Clone VN 51	JF429075.1	98%	<i>Uncultured bacterium clone B36</i>	Solo rizosférico de amora rico em potássio
VN	Clone VN 52	EU135481.1	97%	<i>Uncultured bacterium clone FFCH10764</i>	Solo de pradaria preservada
VN	Clone VN 53	EF018484.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Amb_16S_1112</i>	Solo rizosférico de <i>Populus tremuloides</i>
VN	Clone VN 54	AB658134.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone B0610R003_N24</i>	Solo de cultivo de arroz
VN	Clone VN 55	JF429075.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone B36</i>	Solo rizosférico de amora rico em potássio
VN	Clone VN 56	AB273830.1	98%	<i>Uncultured bacterium clone EXP.1-16S-13C-light-Clone_42</i>	Solo de cultivo de arroz
VN	Clone VN 57	AB273830.1	98%	<i>Uncultured bacterium clone EXP.1-16S-13C-light-Clone_42</i>	Solo de cultivo de arroz
VN	Clone VN 58	EF492980.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone JH-WHS202</i>	Solo ao redor de nódulo de ferro-mangânês
VN	Clone VN 59	KF836156.1	96%	<i>Uncultured bacterium clone INDI_S_SPR_04C 16S</i>	Nascente
VN	Clone VN 60	JQ738901.1	97%	<i>Uncultured bacterium clone P8_75</i>	Superfície de rocha
VN	Clone VN 61	EF516925.1	98%	<i>Uncultured bacterium clone FCPU411</i>	Solo de pasto
VN	Clone VN 62	KJ590668.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone NC2</i>	Filtro
VN	Clone VN 63	EF516305.1	94%	<i>Uncultured bacterium clone FCPN716</i>	Solo de pasto
VN	Clone VN 64	KC541140.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone RS-C06</i>	Sedimento de rio

ANEXO B - Resultado das sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas no estudo comparadas com as depositadas no banco *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) pelo programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)

(conclusão)

Biblioteca	Clone	Número de acesso	Identidade	Organismo	Ambiente encontrado
VN	Clone VN 65	JQ358099.1	98%	<i>Uncultured bacterium clone SRD120_E02</i>	Solo com resíduos em decomposição
VN	Clone VN 66	JN626482.1	96%	<i>Uncultured bacterium clone AK1_18f_18r</i>	Rachadura com metano sob cobertura de gelo
VN	Clone VN 67	HQ684267.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone OI1141</i>	Solo de floresta
VN	Clone VN 68	JF145565.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone ncd1640c05c1</i>	Pele de <i>Homo Sapiens</i>
VN	Clone VN 69	FJ625355.1	97%	<i>Uncultured bacterium clone HF_NC_16</i>	Solo de floresta boreal de pinheiros
VN	Clone VN 70	JF410318.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone For_5_10</i>	Solo da floresta Amazônica
VN	Clone VN 71	HQ684267.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone OI1141</i>	Solo de floresta
VN	Clone VN 72	JN626482.1	95%	<i>Uncultured bacterium clone AK1_18f_18r</i>	Rachadura com metano sob cobertura de gelo
VN	Clone VN 73	KF836156.1	97%	<i>Uncultured bacterium clone INDI_S_SPR_04C</i>	Nascente
VN	Clone VN 74	JX080274.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone 223</i>	Solo de campo de gás
VN	Clone VN 75	AB656436.1	96%	<i>Uncultured bacterium clone B0423R003_M22</i>	Solo de cultivo de arroz
VN	Clone VN 76	EF516104.1	97%	<i>Uncultured bacterium clone FCPN467</i>	Solo de pasto
VN	Clone VN 77	AB672110.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone D0h16S024</i>	Solo de cultivo de arroz
VN	Clone VN 78	AB426200.1	97%	<i>Uncultured bacterium clone mbI-b18</i>	Cultura a partir de solo de campo de lótus
VN	Clone VN 79	AB273830.1	98%	<i>Uncultured bacterium clone EXP.1-16S-13C-light-Clone_42</i>	Solo de cultivo de arroz
VN	Clone VN 80	JN626482.1	97%	<i>Uncultured bacterium clone AK1_18f_18r</i>	Rachadura com metano sob cobertura de gelo
VN	Clone VN 81	EF018510.1	99%	<i>Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone Amb_16S_1148</i>	Solo rizosférico de <i>Populus tremuloides</i>
VN	Clone VN 82	AJ617869.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone D142114</i>	Solo inundado de cultivo de arroz
VN	Clone VN 83	HQ118621.1	99%	<i>Uncultured bacterium isolate 1112851586983</i>	Solo de floresta de <i>Eucalyptus</i>
VN	Clone VN 84	AJ617869.1	99%	<i>Uncultured bacterium clone D142114</i>	Solo inundado de cultivo de arroz

CC: canavial com manejo de colheita sem queima. CQ: canavial com manejo de colheita com queima. VN: área de vegetação nativa