UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

ALINE GIOVANA DA FRANÇA

Filo Actinobacteria e abundância do gene *alkB* em solos rizosféricos cultivados sob sistemas de colheita de cana-de-açúcar

Piracicaba
2016

ALINE GIOVANA DA FRANÇA

Filo Actinobacteria e abundância do gene *alkB* em solos rizosféricos cultivados sob sistemas de colheita de cana-de-açúcar

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

2016

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

França, Aline Giovana da
Filo Actinobacteria e abundância do gene *alkB* em solos rizosféricos cultivados sob sistemas de colheita de cana-de-açúcar / Aline Giovana da França; orientador Siu Mui Tsai. --Piracicaba, 2016.
70p. 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 degradadoras de alcano 2. Cana-de-açúcar 3. Gene alkB 4. Sistemas agrícolas I. Título

CDU 633.61 : 631.461

Dedico este trabalho aos meus pais, Angela e Juberto,
por todo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e a Santa Teresinha, por tudo.

Aos meus pais, Angela e Juberto, por todo o amor e carinho, e por toda dedicação e esforço para me educar e me ensianar o caminho certo. A minha irmã Fernanda, por estar sempre ao meu lado. Aos meus sobrinhos, Ayrton, Alice, Nicolas, Isadora e Laura, que dão alegria aos meus dias ... Amo todos vocês.

Ao meu noivo, grande amigo e companheiro, Paulo, por todo amor e paciência nas horas boas e difíceis, e por me apoiar em todas as minhas maluquises... Amo te.

À Professora Tsai, por me acolher tão bem em seu laboratorio, ensinando-me os caminhos da ciência... Muito obrigada pelos conselhos, pelo apoio durante todos esses anos.

Aos meus grandes amigos e compadres, Andressa e Caio, que a cada dia eu admiro mais... Não sei o que seria de mim sem vocês.

As minhas queridas amigas Fernanda, Julia, Marcela, Marilia e Naissa, por todas as risadas, que deixam os meu dias mais felizes e por toda a ajuda e conselhos no projeto.

Aos amigos de Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Acácio, Bia, Carol, Clóvis, Danielle, Enéas, Felippe, Gabi, Gustavo, Jessica, Juliane, Lucas Mendes, Lucas Oliveira, Patricia, Tayna, Vinicius. Em especial a Fabi, Leandro e Lucas Palma ... Por toda a ajuda e conselhos no decorrer do trabalho.

Aos Técnicos, Elias, Fábio, Wagner e Renata, por estarem sempre dispostos a ajudar... seja resolvendo os infinitos problemas ou me fazendo rir.

Aos funcionários do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, em especial os funcionários da secretaria de Pós Graduação, sempre a disposição para ajudar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado

E a todos que de alguma forma ajudram no desenvolvimento do projeto

Muito Obrigada.

"Nothing happens unless first a dream"
Carl Sandburg (1878 – 1967)

"Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso porque já chorei demais
Cada um de nós compõe a sua história,
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
de ser feliz."
Renato Teixeira e Almir Satér (1991)

RESUMO

FRANÇA, A.G. Filo Actinobacteria e abundância do gene *alkB* em solos rizosféricos cultivados sob sistemas de colheita de cana-de-açúcar. 2016. 70 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

O filo Actinobacteria é, atualmente, considerado um dos maiores filos pertencentes ao domínio *Bacteria*. Este filo pode representar até 30% da comunidade microbiana do solo. Os organismos do filo Actinobacteria tem sido caracterizados como produtores de antibiótico e degradadores de substâncias complexas como os alcanos, presente em diversas substâncias encontradas em plantas. Em relação à degradação dos alcanos já tem sido comprovado que o gene *alkB* (alcano hidroxilase), presente no filo Actinobacteria, está relacionado a sua degradação. Porém, as comunidades de tais organismos podem ser alteradas por mudanças no uso do solo, que no Brasil ocorrem extensivamente devido a implantação de monoculturas. A cultura de cana-de-açúcar, que vem se expandido anualmente, se mostra como uma das culturas que podem alterar a microbiota do solo. Os diferentes sistemas de colheita de cana-de-açúcar, com e sem a queima da palhada, podem alterar a microbiota do solo. Assim, considerando o papel do filo Actinobacteria na ciclagem de matéria orgânica, além da sua importância biotecnológica, este trabalho avaliou como os diferentes sistemas de colheita da cana-de-açúcar influenciam as comunidades rizosféricas de Actinobacteria e de bactérias oxidadoras de alcano, sob condições controladas em casa de vegetação, utilizando técnicas moleculares para quantificar (qPCR), análisar a estrutura (T-RFLP) e a diversidade da comunidade (sequenciamento de metagenoma). Para isso o solos coletado de áreas de plantação de cana-de-açúcar com os manejos de colheita com e sem queima da palhada, foram utilizados em experimento de mesocosmos composto por vasos com planta, de onde foi coletado solo rizosférico, e vaso sem planta, de onde foi coletado solo controle. A quantificação dos gene 16S rRNA de Actinobacteria e do gene *alkB* não mostraram diferenças estatística nas comparações dos solos controles de cana-de-açúcar com e sem queima, e na comparação entre os solos rizosférico e controle de cada tipo de manejo de colheita. A análise dos Fragmentos Terminais de Restrição (TRFs) dos solos controle dos diferentes sistemas de colheita, mostraram uma separação da comunidade bacteriana presente no solo, o mesmo ocorreu nas comparações entre os solos rizosférico e controle de diferentes manejos de colheita. Porém, quando se observa a estrutura taxonômica da comunidade bacteriana nota-se que os filos Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes e Acidobacteria são predominantes nos diferentes solos amostrados, as diferenças estatísticas entre os solos controle e rizosférico de cada tratamento se apresentam a partir da análises das famílias bacterianas presentes nos solos. Para o gene alkB, as sequências encontratas nos diferentes solos pertencem aos dois filos mais abundantes nos solos, os filo Proteobacteria e Actinobacteria, porém algumas sequências pertencem a bacterias não identificadas. Assim, conclui-se que as mudanças na estrutura da comunidade bacteriana presente em solo com monocultura da cana-de-açúcar são perceptíveis a partr da análises de grupos filogenéticos mais baixo e que a comunidade de bactéria degradadoras de alcanos são pertencentes, principalmente, os filos Actinobacteria e Proteobacteria, porém ainda é necessário mais estudos para a classificação das bactérias não identificadas.

Palavras-chaves: Actinobacteria, gene *alkB*, sistemas agrícolas, cana-de-açúcar.

ABSTRACT

FRANÇA, A.G. Phylum Actinobacteria and abundance of *alkB* gene in rhizosphere soils cultivated under sugarcane harvesting systems. 2016. 70 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

The phylum *Actinobacteria* is currently considered one of the major phyla belonging to the domain *Bacteria*. This phylum can represent up to 30% of the soil microbial community. The organisms of the phylum *Actinobacteria* has been characterized as antibiotic producers and degraders of complex substances such as alkanes, present in several substances found in plants. Regarding the degradation of alkanes it has already been proven that a*lkB* gene (alkane hydroxylase), present in the phylum *Actinobacteria*, is related to its degradation. But the communities of such organisms can be altered by changes in land use, which in Brazil occur extensively due to implementation of monocultures. The cultivation of sugarcane, which has been expanded annually, appears as one of the crops that can alter the soil microbiota. The different sugarcane harvest systems, with and without straw burning, can alter the soil microbiota.Thus, considering the role of the phylum *Actinobacteria* in the cycling of organic matter, in addition to their biotechnological importance, this study evaluated how different harvest systems of sugarcane influence rhizospheric communities of *Actinobacteria* and alkane-oxidizing bacteria under controlled conditions in a greenhouse, using molecular techniques to quantify (qPCR), analyse the structure (T-RFLP) and diversity of the community (metagenomic sequencing). For this, the soil collected from sugarcane fields with harvest managements with and without burning the straw, was used in a mesocosms experiment composed of pots with a sugarcane plant, from where rhizosphere soil was collected, and without plant, from where control soil was collected. The quantification of Actinobacteria 16S rRNA gene and *alkB* gene showed no statistical differences in the comparison of sugarcane controls soil with and without burning, and in the comparison between rhizosphere and control soil of each type of crop management. Terminal Restriction Fragments (TRF) analysis of control soils of different harvesting systems showed a separation of the bacterial community present in the soil, the same occurred in the comparison between rhizosphere and control soils of different harvesting systems. However, when observing the taxonomic structure of the bacterial community it is noted that that the phyla Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes and Acidobacteria are predominant in different sampled soils, the statistical differences between the control and rhizosphere soil of each treatment are presented from the analysis of bacterial families present in the soil. For *alkB* gene, the sequences found in different soils belong to the two most abundant phyla in the soil, the phylum Proteobacteria and Actinobacteria, but some sequences belong to unidentified bacteria.Thus, it is concluded that the changes in the structure of the bacterial community present in soil with monoculture of sugarcane are apparent from the analysis of lower phylogenetic groups and the alkane-degrading bacterial communities belong mainly to the phyla Actinobacteria and Proteobacteria, however it is still needed further studies for the classification of unidentified bacteria.

Keywords: Actinobacteria, AlkB gene, agricultural systems, sugarcane.

Sumário

1. Introdução 15
2. Revisão de literatura 17
2.1 Cana-de-açúcar no Brasil 17
2.2 Ecologia Microbiana do solo 18
2.3 Filo Actinobacteria..... 19
2.4 Alcano e o Gene *alkB* *20*
2.5 Técnicas moleculares independentes de cultivos em Ecologia Microbiana 24
3. Objetivo 26
3.1 Objetivo geral 26
3.2 Objetivos específicos 26
4. Matériais e Métodos 27
4.1 Área de estudo 27
4.2 Amostragem e processamento das amostras 28
4.3 Experimento de mesocosmos..... 29
4.4 Coletas das amostras de solo..... 29
4.5 Análises físico-químicas das amostras de solo..... 30
4.6 Análise de umidade do solo..... 30
4.7 Extração e quantificação do DNA do solo..... 31
4.8 qPCR do filo *Actinobacteria* e do gene *alkB* 32
4.8.1 Construção da curva padrão do gene 16S rRNA de *Actinobacteria* e do gene *alkB* Purificação do produto de PCR 32
4.8.2 Purificação do produto de PCR 33
4.8.3 qPCR do gene 16S rRNA de *Actinobacteria* e do gene *alkB* 33
4.8.4 Processamento de dados de qPCR 34
4.9 Polimorfismo dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP) do gene 16S rRNA de Bacteria das amostras de solo 35
4.9.1 Amplificação por PCR do gene 16S rRNA de Bacteria 35
4.9.2 Purificação dos produtos de PCR 35
4.9.3 Reação de restrição dos produtos de PCR..... 35
4.9.4 Precipitação do produto de restrição..... 36
4.9.5 Análise do T-RFLP do gene 16S rRNA de Bacteria 36

4.9.6 Processamento de dados do T-RFLP 36
4.10 Sequenciamento das amostras de solo 37
4.10.1 Construção das bibliotecas de sequenciamento 37
4.10.2 Processamento de dados do sequenciamento 39

5 Resultados e discussões.....40
5.1 Análises físico – químicas das amostras de solo.....40
5.2 Análise do teor de água das amostras de solo.....41
5.3 Extração e quantificação de DNA das amostras de solo.....41
5.4 qPCR do Filo *Actinobacteria* e do gene *alkB*.....42
5.5 T-RFLP do gene 16S rRNA de Bacteria.....44
5.6 Análise taxonômica e funcional das amostras de solo rizosférico e controle 47
5.6.1 Abundância taxonômica do metagenoma 48
5.6.2 Identificação do gene *alkB* 54

6 Conclusão.....56

7 Referências.....57

Apêndice 65

1. INTRODUÇÃO

O Filo Actinobacteria, pode ser encontrado em diferentes solos tropicais e em elevada abundância, podendo representar 30% da comunidade de bactérias do solo (KENNEDY, 1999). As bactérias pertencentes a este filo desempenham uma series de funções ecológicas importantes (VENTURA et al, 2007; BULL, 2008) , dentre elas esta a degradação de substâncias complexas como os hidrocarbonetos (HEISS-BLANQUET et al., 2005). Este filo também é tido como um possível bioindicador para alterações da comunidade bacteriana causada pelos manejos do solo, em especial no cultivo de cana-de-açúcar (NAVARRETE et al, 2015).

No Brasil o cultivo de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma das atividades econômicas mais antigas, tendo com finalidade a produção de açúcar e álcool. Atualmente, o álcool produzido a partir da cana-de-açúcar é uma das melhores opções dentre as fontes de energia renováveis, apresentando grande importância no cenário de biocombustíveis e no setor agrícola brasileiro, e com um futuro promissor no cenário mundial (MAULE et al., 2001). A área nacional plantada para a safra 2015/2016 é de 9.070,4 mil hectares, sendo que 52% desta área esta localizada no Estado de São Paulo, que atualmente é o maior produtor de cana-de-açúcardo país (CONAB, 2015).

Com a expansão agrícola, mais os manejos do solo e a aplicação de agrotóxicos, as propriedades biológicas do solo se alteram, devido à modificação da sua microbiota, que apresenta alta sensibilidade a perturbações externas (MENDES et al., 2003).

Dentre as inúmeras funções da microbiota do solo temos a degradação de alcanos por bactérias. Os alcanos são constituintes importantes das plantas, estando presente desde as folhas até nas ceras e outras substâncias produzidas. A via de degradação de alcanos mais descrita é a que utiliza um conjunto enzimático composto pelas enzimas AlkB (alcano hidroxilase), AlkG (rubredoxina) e AlkT (rubedoxina redutase). Estas enzimas são codificadas pelos genes *alkB, alkG e alkT*, presentes principalmente nos filos Actinobacteria e Proteobacteria (VAN BEILEN et al 2001; COLEMAN et al, 2006). Sendo que o gene *alkB* é tido como uma marcador da presença de bactérias degradadoras de alcanos em ambientes naturais, degradados e contaminados por alcanos.

Considerando o papel do filo Actinobacteria na ciclagem de matéria orgânica, além da sua importância biotecnológica e na biorremediação, justifica-se a busca e caracterização deste filo, bem como o gene funcional *alkB* em solo sob o cultivo de cana-de-açúcar com diferentes sistemas de colheita, para a avaliação das possíveis mudanças na estrutura das comunidades do filo e do gene em decorrência dos tipos de manejo utilizados no cultivo da cana-de-açúcar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cana-de-açúcar

O cultivo da cana-de-açúcar (gênero *Saccharum*) foi introduzido no Brasil colonial e até hoje apresenta grande importância social e econômica (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). A plantação de cana-de-açúcar tem como finalidade a produção de álcool e açúcar, sendo que o álcool produzido a partir da cana-de-açúcaré uma das melhores opções dentre as fontes de energia renováveis, apresentando grande importância no cenário de biocombustíveis e no setor agrícola brasileiro, e com um futuro promissor no cenário mundial (MAULE et al., 2001). A área nacional plantada para a safra 2015/2016 é de 9.070,4 mil hectares, sendo que 52% desta área esta localizada no estado de São Paulo, que atualmente é o maior produtor de cana-de-açúcardo país (CONAB, 2015).

Em 2002, o governo do Estado de São Paulo sancionou a lei n. 11.241, na qual determina a erradicação da colheita da cana-de-açúcar com queima em áreas mecanizáveis até o ano de 2021 e em áreas não mecanizáveis até 2031. Segundo o Instituto de Economia Agrícola (2015) 84% da colheita da safra 2013/14 no estado de São Paulo foi mecanizada e sem a queima da palhada.

Anteriormente o manejo mais utilizado na colheita da cana-de-açúcarera a queima da palhada, facilitando o corte manual e o transporte. Porém, estudos mostram que a queima da palhada altera as propriedades químicas e físicas do solo e diminui a matéria orgânica, afetando assim os microrganismos e as atividades enzimáticas do solo, além de causar danos a saúde pública e ao meio ambiente (DE SOUZA et al., 2005; RACHID et AL.,2013). Analisando o manejo de colheita sem a queima da palhada, Souza e colaboradores (2005) observaram um aumento nas taxas de matéria orgânica, estabilidade dos agregados do solo e teor de água, e também uma baixa na resistência e na densidade do solo, quando comparado com o manejos de colheita com queima da palhada. Assim, o manejo de colheita escolhido pode causar grande influencia na cultura (SOUZA et al.,2012).

2.2 Ecologia Microbiana de solo

A qualidade do solo é fundamental para a sustentabilidade dos sistemas de produção, sendo que a estrutura da comunidade microbiana em solos manejados apresenta modificações quando comparados a sistemas naturais (TORSVIK et al., 2002). Assim, o Estudo da Ecologia Microbiana do solo apresenta-se como uma importante ferramenta para o entendimento das interações entre os microrganismos e o ambiente (RANJARD et al., 2000).

A microbiota do solo é composta principalmente por organismos do Domínio *Archaea* e *Bacteria* e por fungos do Domínio *Eukarya* (WHITMAN; COLEMAN; WIEBE, 1998). O Domínio *Bacteria* é o mais estudado em análises da microbiota do solo, pois estima-se que em um grama de solo contenha de 10^{10} a 10^{11} células bacterianas (HORNER-DEVINE et al., 2003).

A comunidade microbiana do solo atua na ciclagem de nutrientes, decomposição da matéria orgânica e manutenção da estrutura do solo, esses processos são essenciais para o funcionamento do ecossistema do solo, bem como para a sua qualidade (JOHNSON; LEE; SCOW, 2003; KENNEDY; PAPENDICK, 1995; VAN DER HEIJDEN; BARDGETT; VAN STRAALEN, 2008). Sendo que a degradação de substancias complexas podem ser dependentes dos microhabitatis presentes no solo, pois estes apresentam diferenças nas suas propriedades físico-químicas que geram variações na comunidade microbiana presente.

Com a expansão agrícola, mais os manejos do solo e a aplicação de agrotóxicos, as propriedades biológicas do solo se alteram, devido à modificação da sua microbiota, que apresenta alta sensibilidade a perturbações externas. Assim, a microbiota do solo pode ser utilizada como bioindicador de qualidade de áreas cultivadas. A comunidade microbiana de solo de cana-de-açúcar vem sendo cada dia mais caracterizada, tanto na sua composição quanto na funcionalidade e nas alterações devido aos manejos do solo, seja em estudos pontuais ou mais abrangentes, visando uma maior compreensão da comunidade para melhorar a qualidade do solo (DINI-ANDREOTE ET AL., 2010, NAVARRETE, 2015, BIGATON, 2015).

2.3 Filo Actinobacteria

O Filo Actinobacteria é composto por 39 famílias, 139 gêneros e centenas de espécies, sendo considerado um dos maiores filos pertencentes ao domínio *Bacteria.* Estas podem ser aeróbias estritas, anaeróbias facultativas, microaerófilas ou anaeróbias estritas e apresentar metabolismo autotrófico, heterotrófico ou fototrófico. Entretanto, duas características são comuns a todos os organismos pertencentes a este grupo: todos os indivíduos são gram-positivos e contém alta razão guanina/citosina, que em alguns casos podendo chegar a 70% do total de bases nucleotídicas (MOREIRA, SIQUEIRA et al, 2006; VENTURA et al, 2007; GAO, PARAMANATHAN,GUPTA, 2006; MIAO, DAVIES, 2012; KENNEDY,1999).

Devido ao fato de alguns membros deste filo apresentarem ramificações filamentosas semelhantes a hifas, estes foram inicialmente classificados como fungos. Posteriormente, a observação de determinadas características, como a ausência de núcleo e esteróides na parede celular, a presença de flagelos bacterianos e a sensibilidade a fagos e a antibióticos, conduziu a reclassificação do grupo, que atualmente está inserido no domínio *Bacteria* (LECHEVALIER; LECHEVALIER, 1970). O filo apresenta diversidade morfológica, contendo indivíduos em forma de cocos *(Micrococus* spp.*)*, coco-bacilo (*Arthrobacter* spp.*)*, formadores de hifas rudimentares *(Nocardia* spp.*)* e micélios ramificados (*Streptomyces* spp.) (VENTURA et al., 2007).

Os membros do Filo Actinobacteria podem ser encontrados tanto em ambientes aquáticos quanto nos solos, onde desempenham uma série de funções ecológicas importantes. Algumas espécies, por exemplo, podem atuar como patógenos (*Mycobacterium* spp.*, Nocardia* spp.*, Tropheryma* spp.*, Corynebacterium* spp.*, e Propionibacterium* spp.), comensais de plantas (*Leifsonia* spp.*)*, fixadoras de nitrogênio (*Frankia* spp.) (VENTURA et al, 2007; BULL, 2008) e degradadoras de matéria orgânica, agindo sobre substâncias como celulose, lignina e quitina (GAVA, 2002). Dessa maneira, desempenham um papel essencial no que diz respeito à ciclagem de elementos e disponibilização de nutrientes.

A capacidade de decompor substâncias complexas também confere a esse grupo microbiano um grande potencial para a utilização em processos de biorremediação. De fato, é possível encontrar na literatura alguns estudos que demonstram isso, como o estudo de Escudero e colaboradores (2012), em que

estes isolaram 20 cepas de *Actinobacteria* de solo proveniente da Colômbia, dos quais, dois grupos considerados raros (*Tsukamurella* sp. e *Cellulosimicrobium* sp.) demonstraram, através de bioensaios, a capacidade de biodegradação de lignocelulose. A decomposição da lignocelulose, bem como de outros hidrocarbonetos (alcanos) está relacionada com a presença do gene funcional *alkB*, que é um gene especifico para a degradação de tais elementos e que esta presente no Filo Actinobacteria (VOMBERG & KLINNER, 2000; HEISS-BLANQUET et al., 2005; QUATRINI et al., 2008).

Estudos têm demonstrado que as bactérias do Filo Actinobacteria podem ser encontradas com elevada abundância em solos tropicais. O grupo em questão pode representar aproximadamente 30% da comunidade microbiana, o que ressalta a importância dos sistemas terrestres como reservatório da biodiversidade desses organismos (KUSTER, 1968; GRAY & WILLIAMS, 1971 apud KENNEDY, 1999).

Tal diversidade, no entanto, pode ser ameaçada pelas atividades humanas, que provocam alterações significativas na paisagem. A mudança do uso do solo, especialmente nos trópicos, em que ocorre a conversão de florestas intactas em campos de cultivo, representa uma das maiores ameaças à biodiversidade nos dias de hoje (NAVARRETE, 2012).

2.4 Alcano e o Gene *alkB*

Os hidrocarbonetos estão presentes na matéria orgânica vegetal e animal, são os principais constituintes do petróleo e de produtos derivados de óleo. Eles são formados basicamente por carbono (C) e hidrogênio (H), mas podem conter oxigênio (O), nitrogênio (N) ou enxofre (S) (UNEP, 1991).

Dentre os hidrocarbonetos temos os alcanos que são hidrocarbonetos saturados que contém, exclusivamente, carbono (C) e hidrogênio (H), em sua estrutura, unidos por ligações covalentes simples, podendo ser lineares, ramificados ou cíclicos, sendo que estas estruturas podem se unir formando alcanos complexos. Os alcanos também podem conter grupos funcionais ligados por força de Van Der Waals. Por serem apolares os alcanos não são muito reativos, não reagindo com ácidos e bases, porém sofrem reação redox com oxigênio e halogênios quando o carbono está na sua forma reduzida e também reagem com complexos metálicos (LABINGER; BERCAW, 2002; ACD/STRUCTURE ELUCIDATRO,2014).

Os alcanos são muito presentes no meio ambiente e podem ser encontrados, por exemplo, no gás natural, no petróleo bruto e seus derivados, na lignina, cutículas e resinas vegetais, nas ceras e óleos de folhas, nas cutículas de insetos e em feromônios de animais (LABINGER; BERCAW, 2002).

Apesar de quimicamente inertes, muitos microrganismos degradam alcanos e o utilizam como fonte de carbono. Os microrganismos degradadores de alcanos são comumente encontrados em solos e em sedimentos oceânicos (VAN BEILEN *et al.,* 2003 ; WENTZEl et al*.,* 2007). A degradação de alcanos por bactérias se deve a genes contidos nos plasmídeos ou no DNA nuclear, ou em ambos (PARK; CROWLEY, 2006).

Dentre as vias degradadoras de alcanos, presente em bactérias, a via de degradação contida no plasmídio OCT de *Pseudomonas putida* GPO1 é a mais bem descrita, uma vez que esta via de degradação foi demonstrada, primeiramente em *P. putida* GPO1(KOK et al, 1989; VAN BEILEN et al, 1994). Embora a degradação de alcanos por bactérias começou a ser estudada em 1913, com a publicação de Söhngen (1913) que dissertava sobre microrganismos capazes de degradar manchas de óleo no mar.

A via de degradação dos alcanos é composta por um sistema formado por três componentes enzimáticos: AlkB – alcano hidroxilase; AlkG- rubredoxina e AlkT – rubedoxina redutase, sendo que a enzima AlkB esta localizada na membrana citoplasmática e tem a função de transferir um átomo de oxigênio da molécula de oxigênio para o alcano, já a enzima AlkT transfere elétrons do NADH para a AlkG, que por sua vez, transfere elétrons para o componente catalítico AlkB (figura 2.1) (SMITS et al.,2002;VAN HAMME et al., 2003).

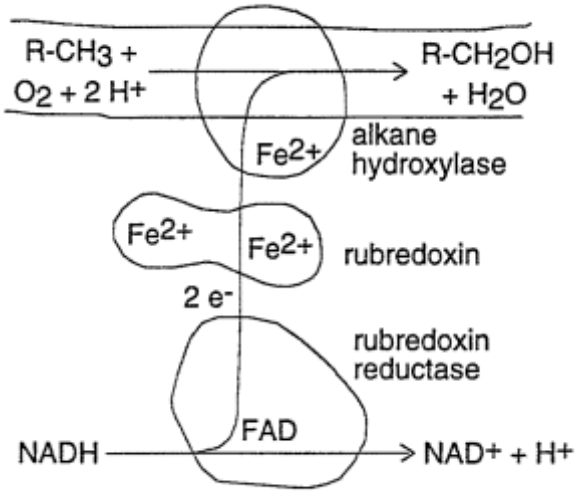

Figura 2.1: Estrutura da via de degradação de alcanos, composta pelas enzimas AlkB (alkane hydroxylase), AlkG (rubredoxin) e AlkT (rubredoxin reductase). Fonte: VAN BEILEN et al.,1994

Tendo como modelo a via de degradação descrita em *P. putida* GPO1, o gene *alkB* esta inserido no plasmídeo OCT que contém dois sistemas operons que codificam os componentes da via de degradação de alcanos. O *operon alkBFGHJKL* contém os gene que codificam para a alcano hidroxilase (gene *alkB*), as rubredoxinas (genes *alkG* e *alkF*), aldeído desidrogenase (gene *alkH*), álcool desidrogenase (gene *alkJ*), acetil-CoA sintase (gene *alkK*). Já o *operon alkST* contém os gene para a rubrodoxina redutase (gene *alkT*) e para o regulador positivo da expressão do *operon alkBFGHJKL* (gene *alkS*) (figura 2.2)(CANOSA et al, 1999; VAN BEILEN et al. 1994; VAN BEILEN et al,2001).

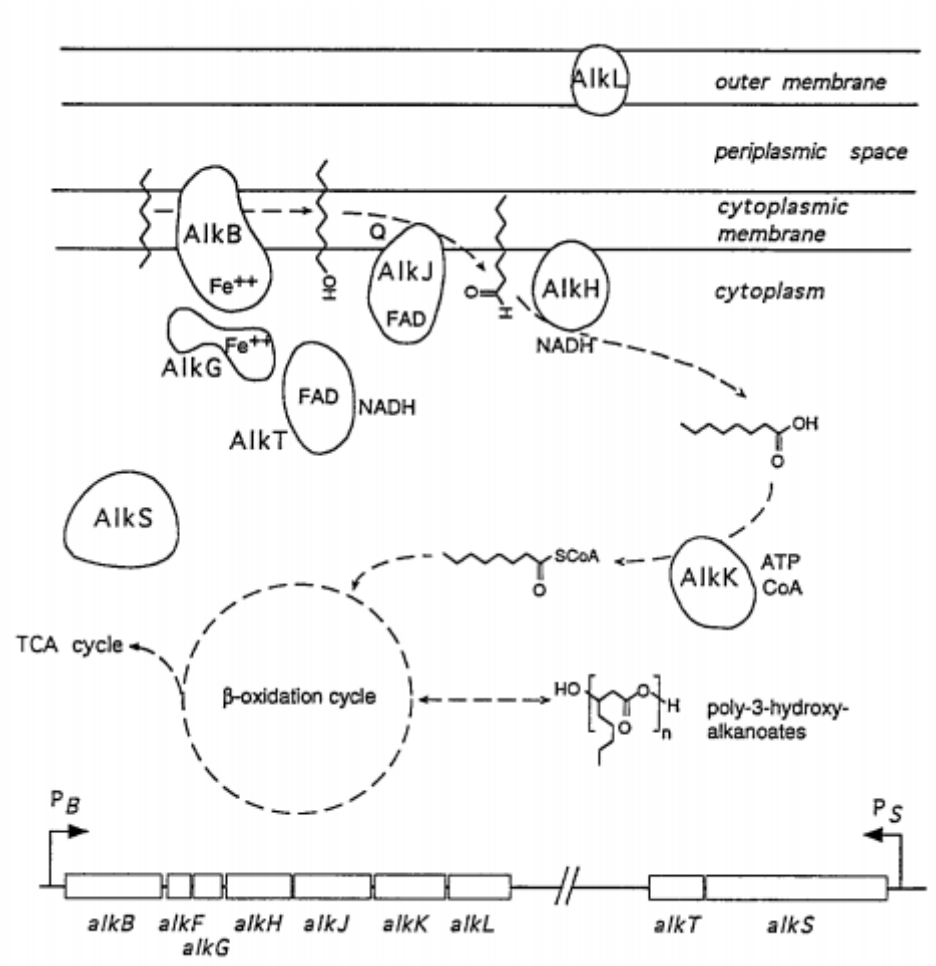

Figura 2.2: Via de degradação de alcanos em *Pseudomonas putida* GPO1 e organização dos operons contidos no plasmideo OCT de *P. putida* GPO1. As proteínas são identificados pelo seu nome de gene - Fonte: VAN BEILEN et al.,1994

O gene *alkB*, contém aproximadamente 1,2Kb, o qual tem sido detectado em uma larga fração das bactérias presentes no solo, dentre elas Actinobacterias e Proteobacterias (SMITS et al.,2002; Van Beilen et al., 2005) e por codificar a primeira enzima atuante da via de degradação ele é utilizado como marcador para a presença de bactérias degradadoras de alcanos. Apesar de muito estudado ainda há dúvidas sobre a forma estrutural desta alcano hidroxilase. Van Beilen (2005) propôs uma estrutura composta de seis hélices com um sitio ativo central composto por dois átomos de ferro ligados por histidinas (figura 2.3).

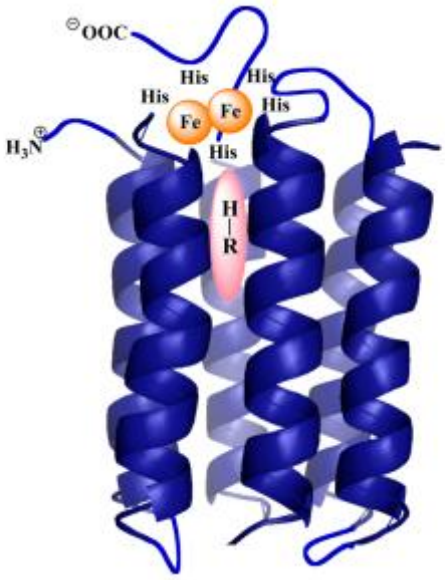

Figura 2.3: Estrutura da proteína AlkB, proposta por Van Beilen (2005). Fonte: Cooper et al., 2012.

Devido a sua extensa distribuição em diferentes ambientes, seja ele contaminado ou não, e por ser o gene codificador de enzima inicial de degradação, o gene *alkB* tem sido utilizado como marcador para a presença da via de degradação de alcanos em bactérias presente em solos.

2.5 Técnicas moleculares independentes de cultivos em Ecologia Microbiana

A Ecologia Microbiana estuda as interações entre os microrganismos e o meio em que eles vivem. Porém, sabe-se que 99% das bactérias presentes no solo não podem ser cultivadas utilizando métodos convencionais de laboratório (TORSVIK et al.,1998). Assim, utilizar técnicas moleculares para a caracterização dos microrganismos não cultiváveis em solo é uma das possibilidades para identificar e conhecer as funções e a distribuição deles nos diversos solos (CANNAVAN,2007).

Os estudos em Ecologia Microbiana que utilizam técnicas independentes de cultivo comumente consistem em extrair os ácidos nucléicos do ambiente e analisar o material genético das comunidades microbianas presentes (RANJARD; POLY; NAZARET, 2000). Esta abordagem tem permitido análises abrangentes dos microrganismos, gerando uma melhor caracterização das comunidades presentes no solo (HUGHES et al., 2001).

Parte das metodologias moleculares atuais foram criadas à partir da ferramenta PCR (em inglês *Polymerase Chain Reaction*), que possibilita a amplificação de sequências de nucleotídeos de maneira rápida e segura

(MULLIS,1990). A técnica de PCR quantitativo em tempo real vem sendo muito utilizada para determinar a quantidade de diferentes genes em amostras ambientais (SMITH; OSBORN, 2008). Esta técnica permite quantificar sequências especificas utilizando corantes intercalantes, iniciadores ou sondas fluorescentes que hibridizam com a sequência de interesse (GAŠPARIČ et al., 2010). A quantificação do gene amplificado acontece na fase exponencial da reação, assim a quantidade inicial do gene de interesse pode ser extrapolada e calculada de maneira precisa e com grande reprodutibilidade (GACHON; MINGAM; CHARRIER, 2004; GINZINGER, 2002; NOVAIS; PIRES-ALVES; 2004), possibilitando assim a determinação da abundância da comunidade (FIERER et al., 2005).

Já a técnica de T-RFLP (do inglês *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) permite analisar a estrutura da comunidade microbiana presente na amostra (SCHÜTTE et al., 2008), a partir da análise do polimorfismo do comprimento dos fragmentos de uma reação de restrição, proveniente de um produto de PCR, que continha em um dos seus *primers* marcados com fluorescência (LIU et al., 1997; LUTON et al. 2002; THIES, 2007) Esta técnica é considerada rápida e altamente reproduzível (THIES, 2007).

Outra possibilidade muito explorada é o sequenciamento do DNA ambiental, que vem sendo amplamente utilizado nas análises das comunidades microbianas do solo, uma vez que ele possibilita a busca de informações sobre as relações filogenéticas, detecção de genes e via metabólicas de microrganismos não cultiváveis (PESSAO FILHO,2010). Os sequenciadores de nova geração (do inglês *Next-Generation Sequencing)* permitem a análise de milhões de sequências em diversas amostras.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar como os diferentes sistemas de colheita da cana-de-açúcar influenciam as comunidades rizosféricas de Actinobacteria e de bactérias oxidadoras de alcano, sob condições controladas de casa de vegetação.

3.2 Objetivos Específicos

a) Quantificar os genes *alkB* (degradador de alcano) e 16S rRNA de Actinobacteria presentes na rizosfera de cana-de-açúcar cultivadas, em experimento de mesocosmos em casa de vegetação, sob solos de diferentes sistemas de colheitas.

b) Identificar os filos existentes em solo de cana-de-açúcar cultivadas, em experimento de mesocosmos em casa de vegetação, sob solos de diferentes sistemas de colheitas.

c) Analisar a comunidade bacteriana portadora do gene *alkB* presente em solo de cana-de-açúcar cultivadas, em experimento de mesocosmos em casa de vegetação, sob solos de diferentes sistemas de colheitas.

4. MATÉRIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, CENA/USP, Piracicaba (SP), e seguiu as seguintes etapas de trabalho (figura 4.1)

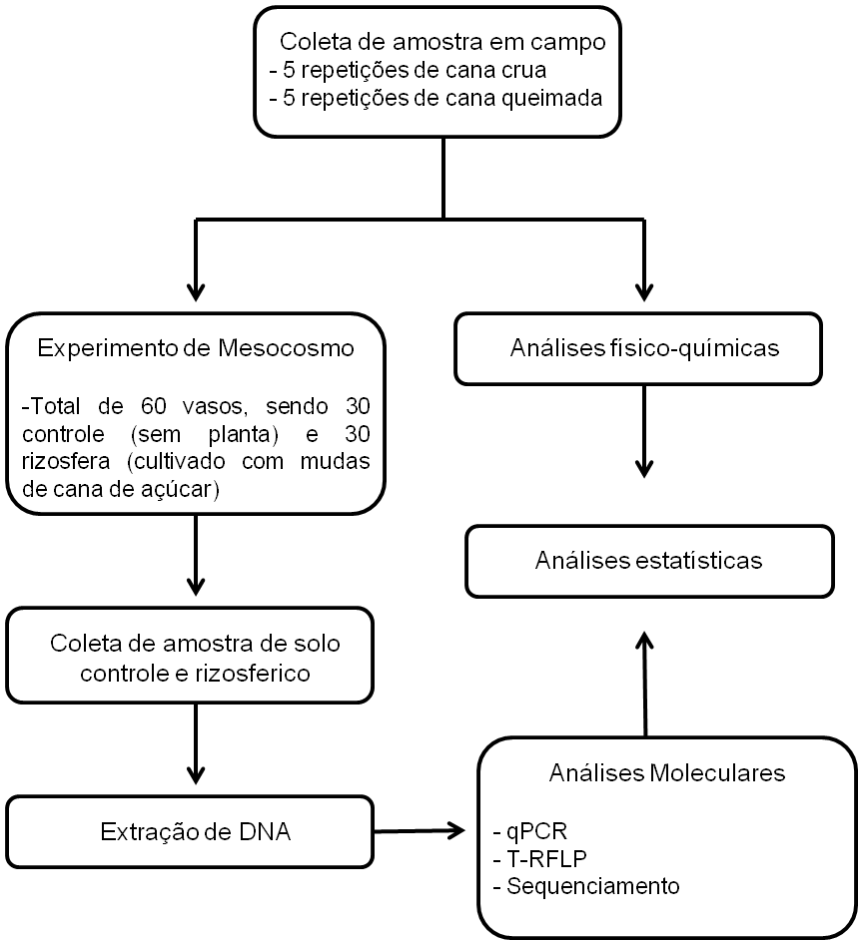

Figura 4.1: Fluxograma de atividades realizadas no presente trabalho.

4.1 Áreas de estudo

A área de estudo situa-se nas fazendas 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 de classificação 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 (DEMATTÊ;

TOLEDO; SIMÕES, 2004). O clima Cwa é típico do Sudeste do Brasil e abrange 17,4% do Estado (ALVARES et al., 2013).

A coleta foi realizada em fevereiro de 2013 em duas áreas adjacentes (figura 4.2), sendo a primeira área (A) sob o cultivo de cana-de-açúcar com manejo de colheita livre de queima (cana-de-açúcarcrua) desde o ano de 2002 (S 22°41.423’ W 47°47.105’); a segunda (B) sob o cultivo de cana-de-açúcar com manejo de colheita através da queima da palhada (cana-de-açúcarqueimada) desde a década de 60 (S 22°41.389’ W 47°47.839’).

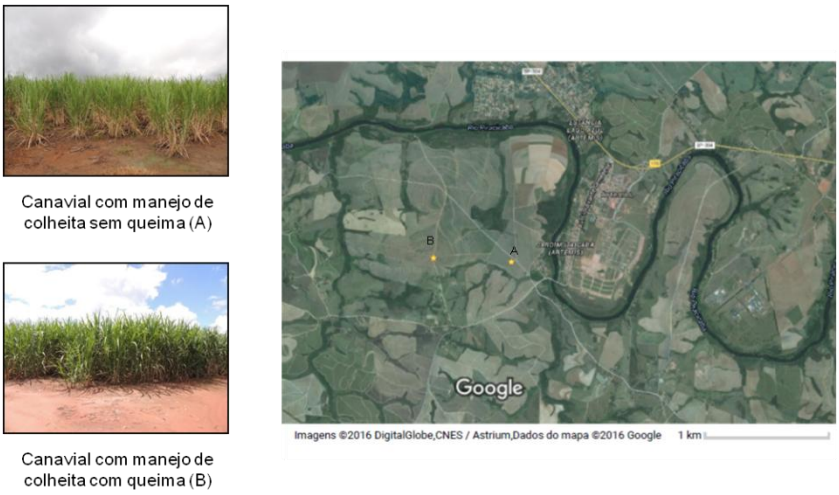

Figura 4.2 : Imagem registradas no dia da coleta de solo no mês de fevereiro de 2013 e imagem de satéle das áreas de estudo.

4.2 Amostragem e processamento das amostras

Em cada área foram coletadas amostras de solo na camada superficial de 0 á 10 cm, para uso no experimento de mesocosmos, a partir de cinco pontos amostrais. Sendo um ponto central e outros quatro pontos posicionados ao norte, sul, leste e oeste com distância de 20 m do ponto central (figura 4.3). Assim, foi realizada amostragem em 10 pontos distintos (5 em cada área). Em cada ponto foram coletados três sacos de capacidade de 20L de solo e três sacos de capacidade de 20L com palhada de cana, para serem utilizados no experimento de mesocosmos. Posteriormente, o material foi transportado para o laboratório. De cada ponto, foram retirados 600g de solo e armazenado em câmera fria a 6°C. O restante dos solos e a palhada foram transportados para a casa de vegetação.

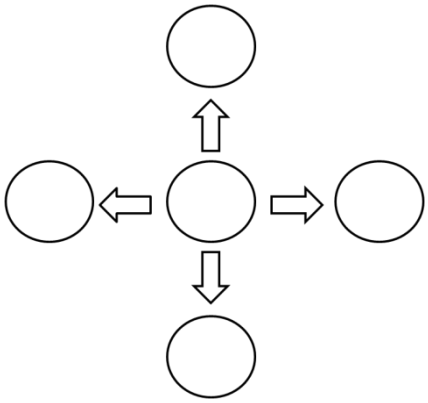

Figura 4.3: Esquema da amostragem realizada cada área. Foram coletados cinco pontos, separados por 20 m cada.

3.3 Experimento de Mesocosmos

O experimento de mesocomos foi estabelecido no mês de fevereiro de 2013. O experimento foi composto de 60 recipientes plásticos com capacidade de 14 L. 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 14L com o solo de cada ponto coletado. Sendo que: os três primeiros recipientes foram mantidos com o solo sem planta (controle), e nos outros três recipientes foram plantados mudas de cana-de-açúcar CTC 9 (rizosférico), cedidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC). A muda 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, as plantas atingiram a fase fenólogica que indica crescimento intenso do sistema radicular (GASCHO; SHIH, 1983).

4.4 Coleta das amostras de solo

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

4.5 Análise físico-química das amostras de solo

De cada ponto, amostrado em campo, aproximadamente 400g 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 do pH em água; pH em cloreto de potássio a 1 mol/L; fósforo, potássio pelo método Mehlich 1; cálcio e magnésio pelo acetato de amônio extraído 1 mol/L; alumínio pelo cloreto de potássio extraído 1 mol/L; acidez potencial pelo acetato de cálcio extraído 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. Foi realizada a análise física das amostras, na qual foi verificada a quantidade de areia, por pesagem, silte e argila, através do uso de densímetro.

A análise dos dados foi realizada no software estatístico *SAS 9.3* (SAS Institute), no qual foi analisada a normalidade dos dados pelo teste de *Shapiro-Wilk* e a homogeneidade das variâncias. A análise das variâncias foi feita e, quando significativa, seguida do teste de *Tukey*, para dados que seguiram os pressupostos dos testes paramétricos. (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

4.6 Análise da umidade do solo

A umidade graviométrica (U%) mostra qual a porcentagem de água que compõe uma amostra de solo (EMBRAPA,1979). De cada amostra cinco alíquotas, de 10 gramas (g), foram coletadas e postas em placas de Petri, que foram secas em estufa de secagem a 110 °C. As aliquotas foram pesadas diariamente até a estabilização do peso. Os pesos antes da secagem e após foram registrados e utilizados para calcular a U% na seguinte equação:

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

sendo que:

U = Umidade gravimétrica;

M_u = Massa de solo úmido (g);

M_s = Massa de solo seco (g).

4.7 Extração e quantificação de DNA das amostras de solo

O DNA total do solo coletado de cada vaso foi extraído em duplicata através do uso do *PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit* (MoBIO Laboratories). Para isso, foram adicionados 250 mg de 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 de *Solution 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 x 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 de *Solution C2*. Os tubos foram vortexados por 5 segundos, incubados a 4 °C por 5 minutos e centrifugados a 10.000 x g por 1 minuto. Foram transferidos 600 µL do sobrenadante de cada amostra para outro tubo e adicionados 200 µL de *Solution C3*. Os tubos foram vortexados, incubados a 4 °C por 5 minutos e centrifugados a 10.000 x g por 1 minuto. Depois, foram transferidos 750 µL do sobrenadante de cada amostra para outro tubo e adicionados 1200 µL de *Solution 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 x 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 x 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 de *Solution C5* em cada tubo. Os tubos foram centrifugados a 10.000 x g por 30 segundos e o sobrenadante foi descartado. Os tubos foram novamente centrifugados a 10.000 x g por 1 minuto. Cada coluna foi transferida para um novo tubo, no qual foram adicionados 100 µL de *Solution C6*. Por fim, os tubos foram centrifugados a 10.000 x 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 *Triptic 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 40 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.

4.8 qPCR do Filo Actinobacteria e do gene *alkB*

4.8.1 Construção da curva padrão do gene 16s rRNA de Actinobacteria e do gene *alkB*

Foram contruidas curvas padrão dos genes 16s rRNA de *Actinobacteria* e *alkB* para a quantificação absolutas destes nas amostras de DNA. Para isso ambos os genes foram amplificados por PCR em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems).

Para o gene 16s rRNA de Actinobacteria, foi utilizado o DNA do isolado *Gordonia ssp.* (DSMZ 11192) do depósito de culturas *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*. O DNA do isolado foi amplificado com os *primers* Act920F3 (5'-TACGCCCGCAAGGCTA-3') e Act1200R (5'-TCRTCCCCACCTTCCTCCG-3') (De Gregaris et al, 2011). A PCR de cada amostra foi preparada contendo 2,5 µL de 10X PCR Buffer; 0,75 mM de $MgCl_2$; 0,25 mM de cada dNTP; 5 pmol de cada *primer*, 0,25 µL BSA (Bovine serum albumin – Termo Scientific) a 20mg/ml, 0,20 U *Platinum Taq DNA Polymerase* (Life Technologies); 1 µL de DNA e H_20 ultrapura esterilizada para um volume final de 25 µL. O programa utilizado no termociclador foi de 95 °C por 4 minutos; 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 61,5 °C por 30 segundos, 72 °C por 2 minuto; e 72 °C por 5 minutos.

Para o gene *alkB*, foi utilizado o DNA do isolado *Rhodococus ruber* (DSMZ 7511) do depósito de culturas *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*. O DNA do isolado foi amplificado com os *primers* AlkB-1F (5'-AAYACNGCNCAYGARCTNGGNCAYAA -3') e Alkb–1R (5'-GCRTGRTGRTCNG ARTGNCGYTG -3') (Kloos,2006). A PCR de cada amostra foi preparada contendo 3,5 µL de 10X PCR Buffer; 1,05 mM de $MgCl_2$; 0,88 mM de cada dNTP; 3,5 µL de cada *primer* a 5 pmol, 1 U *Platinum Taq DNA Polymerase* (Life Technologies); 1 µL de DNA e H_20 ultrapura esterilizada para um volume final de 35 µL. O programa utilizado no termociclador foi de 95 °C por 10 minutos; 5 ciclos em tauch dowm de 95 °C por 45 segundos, 62 °C a 57 °C por 1 minuto, 72 °C por 45 segundos, 40 ciclos

de 95 °C por 45 segundos, 57 °C por 1 minuto, 72 °C por 45 segundos; 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 40 minutos e, posteriormente, foto-documentado.

4.8.2 Purificação do produto 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 homogeinizada 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 x 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 x g por 30 segundos. A coluna de cada amostra foi transferida para um 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, centrifugados a 16.000 x g por 1 minuto e armazenados a -20 °C.

O produto purificado de cada gene 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 10^2 a 10^8 cópias do gene 16S rRNA de *Actinobacteria* e do gene *alkB.*

4.8.3 qPCR do gene 16s rRNA de Actinobacteria e do gene a*lkB*

Os genes 16S rRNA de Actinobacteria e do *alkB* de cada amostra foram quantificados em triplicata pela técnica de PCR quantitivo em tempo-real no equipamento *StepOne Plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Para ambos os genes, a técnica de qPCR foi realizada contendo 5 µl do *Power SYBR® Green PCR Master Mix (*Life Technologies™*)*, 5 pmol de cada *primer*, 1 µl de BSA a

0,1% (*Termo Scientific*), 1 µl de H_20 ultrapura esterilizada e 1 µl de DNA, gerando o volume final de 10 µL.

Para o gene 16S rRNA de Actinobacteria, foram utilizados os *primers* Act920F3 (5'-TACGCCCGCAAGGCTA-3') e Act1200R (5'-TCRTCCCCACCTTCCTCCG-3') (De Gregaris et al, 2011). O programa utilizado no termociclador foi de 95 °C por 5 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 61,5 °C por 25 segundos e 72 °C por 20 segundos. 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.

Para o gene *alkB*, foram utilizados os *primers* AlkB-1F (5'-AAYACNGCNCAYGARCTNGGNCAYAA -3') e Alkb–1R (5'-GCRTGRTGRTCNG ARTGNCGYTG -3') (Kloos,2006). O programa utilizado no termociclador foi de 95 °C por 10 minutos; ; 5 ciclos em tauch dowm de 95 °C por 45 segundos, 62 °C a 57 °C por 1 minuto, 72 °C por 45 segundos; 40 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 57 °C por 1 minuto e 72 °C por 45 segundos. Ao final foi incluída uma curva de *melting* com 95 °C por 15 segundos, 57 °C por 1 minuto e 95 °C por 15 segundos com leitura de dados a cada 0,7 °C.

4.8.4 Processamento de 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. Os dados insatisfatórios de acordo com esses parâmetros foram refeitos. Os dados obtidos foram exportados para uma planilha eletrônica no programa *Excel* (Microsoft). Na planilha, os dados de abundância de cada amostra foram convertidos em número de cópias do gene por grama de solo.

A análise estatisticas foram realizadas no software e *SAS 9.3* (SAS Institute), no qual foi analisada a normalidade dos dados pelo teste de *Shapiro-Wilk* e a homogeneidade das variâncias. A análise das variâncias foi feita e, quando significativa, seguida do teste de *Tukey*, para dados que seguiram os pressupostos dos testes paramétricos.

4.9 Polimorfismo dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP) do gene 16S rRNA de Bacteria das amostras de solo

4.9.1 Amplificação por PCR do gene 16S rRNA de Bacteria

Foi realizada a amplificação do gene 16S rRNA de bacteria por PCR em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems).

Para esta reação foram utilizados os *primers* universais 27F (5'-AGAGTTGTATCCTGGCTCAG-3') e 1492r (5'-ACCTTGTTACGACTT-3') (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995), sendo que o primer 27F continha a extremidade 5' marcada com 6-carboxyfluorescein (FAM). A PCR de cada amostra foi preparada contendo 2,5 µL de 10X PCR Buffer; 50 mM de $MgCl_2$; 5 mM de dNTP; 2,5 pmol de cada *primer*, 0,25 µL BSA (Bovine serum albumin – Termo Scientific) a 20mg/ml, 0,20 U *Platinum Taq DNA Polymerase* (Life Technologies); 1 µL de DNA e H_2O ultrapura esterilizada para um volume final de 25 µL. O programa utilizado no termociclador foi de 94 °C por 3 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 59 °C por 45 segundos, 72 °C por 1 minuto; e 72 °C por 15 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 40 minutos e, posteriormente, foto-documentado

4.9.2 Purificação dos produtos de PCR

A Purificação do produto de PCR foi realizada da mesma forma descrita no item 4.8.2.

4.9.3 Reação de restrição dos produtos de PCR

Os produtos purificados proveniente da amplificação do gene 16s rRNA de Bacteria foram utilizados na reação de restrição com as endonucleases *HhaI* (GCG^C) e *MspI* (C^CGG). Para esta reação foram utilizados 1,5 µL do Buffer React 10; 0,15 µL de BSA a 1ng. μL^{-1}; 0,06 µL da endonuclease 10U (Invitrogen); 5 µL do produto de pcr purificado e H_20 ultrapura esterilizada para um volume final de 15 µL. A reação ocorreu em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied

Biosystems), programado a 37 °C por 3 horas e 68 °C po 10 min, para a inativação da endonuclease.

4.9.4 Precipitação do produto de restrição

Os produtos da reação de restição foram precipitado para análise do fragmento no sequenciador automático. Para isso, foram adicionados a 15 µL do produto da restrição 2 µL de tampão Acetato de Sódio/EDTA e 60 µL de etanol absoluto, esta mistura foi agitada levemente no vortex e centrifulgada por 15 min a 12.000x g, após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 150 µL de etanos 70% recém preparado, em seguida a mistura foi centrifulgada por 5 min a 12.000x g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em concentrador (concentrador 5301, Eppendorf) as 45 °C por 10 min. As amostras concentradas foram guardadas em freezer a -20°C até a analise no sequenciador automático.

4.9.5 Análise do T-RFLP do gene 16S rRNA de *Bacteria*

Os Fragemntos terminais de restrição (T-RFs) foram análisado no sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Para a introdução das amostras no equipamento o produdo precipitado foi ressuspendido em 9,75 µL de formamida HiDi e 0,25 µL de padrão de comprimento GeneScan™-500 ROX™ Size Standard (Applied Biosystems) e posteriormente desnaturado a 95 °C por 5 min e resfriado a 0°C por 4 min.

4.9.6 Processamento de dados do T-RFLP

Os dados de T-RFLP foram inicialmente análisados no programa PeakScanner v1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA), sendo que a qualidade da corrida foi visualmente conferida. Os dados foram exportados para o programa Excel (Microsoft) e organizados para as analises multivariadas. O limete de 50 unidades de fluorescência foi utilizada para discriminar os “picos verdadeiros” de ruidos do background gerados pela técnica, os T-RFs eliminados foram os que apresentaram menos de 50 pares de base ou mais de 800 pares de base (CULMAN et al.,2008). As alturas dos picos (unidades de fluorescência) foram transformados em dados relativos, esta transformação de dados foi calculada dividindo cada valor de tamanho de pico pelo valor total dos picos de uma amostra. Assim, após a mostagem da

matriz de dados, esta foi transformada em uma matriz de distância, usando a medida de Hellinger (LEGENDRE; GALLAGHER, 2001). Posteriormente, as analises estatisticas foram realizadas nos programas Canoco for Windows 4.5 (Biometris, Wageningen, Holanda) e Primer5 (Plymouth Marine Laboratory, Primer-E, Reino Unido).

4.10 Sequenciamento das amostras de solo

O DNA rizosférico e do controles foram sequenciados no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), utilizando o sequenciador MiSeq Illumina®. As amostras selecionadas para o sequenciamento foram as réplicas 1, 3 e 5 dos solos rizosféricos e controle, sob os diferentes sistemas de colheita (com queima e sem queima).

4.10.1 Contrução das bibliotecas

As amostras foram preparadas para o sequenciamento utilizando se o Nextera DNA Library Preparation Kit , seguindo o protocolo do fabricante.

O protocolo se inicia com a quantificação da amostra de DNA em *Nanodrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific) com densidade ótica adotada de 260 nm, a partir da quantificação foi separado um volume de 20 µl com uma concentração total de 50 ng de cada amostra. A seguir foi realizada a tagmentação das amostras colocando os 20 µl do DNA em uma placa de PCR e adicionando 25 µl de TD Buffer e 5 µl da enzima TDE 1, a placa de PCR foi selada com adesivo , centrifugada em centrifuga de placa Centrifuge 5804R (Eppendorf) e levada ao termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) programado a 55 °C por 5 minutos e hold a 10 °C. Ao final da tagmentação o produto gerado foi purificado utilizando o *GFX PCR DNA and Gel Band Kit* (GE Healthcare) como descrito no topico 3.8.2. Posteriormente foi realizada a reação de PCR para a amplificação e inserção dos indexes em cada amostra, para isso se adicionou em cada 20 µl da amostra de DNA 5 µl de um par de índex (totalizando 10 µl), 15 µl de NPM e 5 µl de PPC. A reação foi levada ao termociclador programado com 72 °C por 3 minutos, 98 °C por 30 segundos, 5 ciclos de 98 °C por 10 segundos, 63 °C por 30 segundos e 72 °C por 3 minutos, seguidos de hold a 10 °C. Após a PCR foi realizada a purificação das bibliotecas, para isso se adicionou uma placa da PCR 25 µl de beads e 50 µl do

produto de PCR, esta reação foi incubada por 5 minutos em temperatura ambiente. Ao final da incubação a placa de PCR foi colocada na estante magnética Magnetic stand – 96 Ambion® RNA (Life Technologies™) e incubada por 2 minutos em temperatura ambiente, em seguida se retirou o sobrenadante cuidadosamente, com a placa ainda na estante magnética adicionou-se 200 µl de álcool 80% aguardou-se 30 segundos e o sobrenadante foi retirado novamente, esse processo se repetiu por 2 vezes, no final da segunda aplicação de álcool 80% a placa foi seca em termociclador a 30 °C por 2 minutos. Após a secagem o DNA foi ressuspendido adicionando 32,5 µl do tampão RSD, incubou-se a placa por 2 minutos em temperatura ambiente e mais 2 minutos sobre a estante magnética na mesma condição, depois da incubação 30 µl do sobrenadante foi transferido para um novo poço da placa de PCR. Com a biblioteca finalizada realizou-se a quantificação do DNA para a formação do pool de biblioteca, nesta etapa cada amostra foi quantificada no *Nanodrop*, após a quantificação uma alíquota de cada amostra contendo 80 ng de DNA foi juntada em um novo poço da placa formando assim o pool equimolar das bibliotecas. O pool de bibliotecas foi quantificado por Real Time utilizando o KAPA Library Quantification Kits for Illumina®, para a quantificação o pool de bibliotecas foi diluído na seguintes proporções: 1:100, 1:1000 e 1:2000. O mix preparado para a reação continha 6 µl do máster mix , 2 µl de água miliq autoclavada e 2 µl da amostra (pool das bibliotecas e padrões). A quantificação em Real Time foi realizada no equipamento *StepOne Plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) com o seguinte programa: 95 °C por 5 minutos, 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos e 60 °C por 45 segundos. Ao final da quantificação foi escolhido a diluição de 1:100 para se realizar a concentração do pool de bibliotecas, obtendo um amostra de 10 µl de DNA a 2 nM. A partir dessa amostra se realizou a diluição da biblioteca para a aplicação da mesma no MiSeq. A amostra de DNA foi misturada a 10 µl de NaOH a 0,2N, vortexada levemente e incubada por 5 minutos em temperatura ambiente, após a incubação foi adicionado 980 µl de tampão HT1, gerando assim um volume de 1000 µl, Aliquotou-se 600 µl desta solução e adicionou-se 400 µl de HT1, obtendo-se assim uma solução de DNA com concentração de 12 pM. Ao final da diluição 600 µl desta foram carregados no slot do cartucho e este carregado no MiSeq para sequenciamento.

4.10.2 Processamentos dos dados do sequenciamento

as sequências obitidas ao final do processo de sequenciamento foram unidas utilizando o programa *FLASH version 1.2.5* (MAGOČ; SALZBERG, 2011) para se produzir sequências consenso. as seqências consenso foram trimadas quanto à qualidade de modo que bases com baixa qualidade(<20) foram identificadas e removidas usando o algoritmo *phred* e um scrip de comandos execut´sveis utilizando SeqClean. As sequências, devidamente tratadas, foram anotadas utilizando o software Metagenomic Rapid Annotation versão 3.5 (MG-RAST) (MEYER et al., 2008).

No MG-RAST (MEYER et al., 2008) os dados passaram, inicialmente, por um filtro de controle de qualidade (YANG et al.,2013) para remover sequências artificiais e de baixa qualidade. Após o filtro, foi realizado o processo de predição de genes (RINO et al., 2010) e identificação de proteínas (OEHMEM, NIEPLOCHA, 2006) com base na similaridade dos genes preditos presentes nos metagenomas com as sequências de proteínas que estão disponíveis no banco de dados M5nr (WILK et al., 2012).

Já a identificação taxonômica foi realizada com base na identificação do melhor hit utilizando a estrutura do NCBI taxonomy como referência de taxonomia e a estrutura hierárquica de subsistemas SEED (OVERBEEK et al., 2005).

Os perfis de abundância taxonômica foram comparados entre os tratamentos a partir de testes estatísticos implementados no software Stamp (PAKES et al., 2014). O teste-t foi aplicado para a identificação de táxons diferencialmente abundantes entre os tratamentos com um critério de $p < 0.05$.

Para a identificação das sequências do gene *alkB* as sequências ortólogas aos genes foram identificadas a partir uma busca por similaridade no banco de dados M5nr (e-value < 0.0005) utilizando as sequências de aminoácidos de cada gene predito durante a fase de anotação do MG-RAST. A identificação taxonômica desses genes foi realizada no software MEGAN (HUSON et al., 2016).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Análises físico – químicas das amostras de solo

As análises físico–químicas das amostras de solo apresentaram similaridades e diferenças entre as áreas de estudo de acordo com o parâmetro analisado (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Atributos físico-químicos dos solos coletados nas duas áreas de estudo.

Parâmetros físico - químicos	Área de coleta	
	Solo com manejo de colheita sem queima	Solo com manejo de colheita com queima
pH H_2O	6,2 ±0,3	6,0 ±0,1
pH KCL	5,2 ±0,4	5,1 ±0,3
P	22,4 ±14,8	36,8 ±9,0
K	4,4 ±0,5 a	0,7 ±0,1 b
Ca	30,2 ±2,8 a	19,6 ±4,9 b
Mg	13,6 ±2,2 a	6,4 ±2,2 b
Al	< 1,0 ±0	< 1,0 ±0
H+Al	15,8 ±5,8	17,4 ±5,1
SB	48,4 ±4,5 a	26,6 ±6,9 b
CTC	63,7 ±5,0 a	44,1 ±3,4 b
V	76,2 ±8,3	60,0 ±12,4
M	0,4 ±0,9	1,6 ±2,2
M.O.	17,2 ±6,0	12,6 ±0,9
Areia total	706,0 ±26,2 a	778,6 ±7,9 b
Areia grossa	152,6 ± 19,7 a	272,2 ±22,1 b
Areia fina	553,4 ±21,6 a	506,6 ±18,1 b
Silte	23,4 ±10,8	21,0 ±2,0
Argila	270,8 ±32,9 a	200,2 ±8,8 b

Em cada linha, os resultados apresentados correspondem as médias e aos desvios dos parâmetros analisados para cada área do 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; matéria orgânica (M.O.) em g/kg; areia total, areia grossa, areia fina, silte e argila em g/kg.

Nos resultados obtidos com similaridade estatística ($p > 0,05$) estão os parâmetros de pH em H_2O e em KCL, sendo estes considerados ácidos, abaixo de 7. Também se observou similaridade estatística ($p > 0,05$) nos parâmetro de fósforo (P), Alumínio (Al), potencial de acidez (H + Al) e matéria orgânica (M.O.).

As análises de potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e nitrogênio (N) mostraram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre as áreas, sendo encontrados em maior concentração na área com manejo de colheita sem queima. Mendonza ET AL (2000), em suas análises, também observou um aumento nos teores de magnésio (Mg) e carbono orgânico na área com manejo de colheita sem queima. Já Mitchell e colaboradores (2000), identificaram em seu trabalho, que o potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e nitrogênio (N) podem ser readiquiridos, sendo que o potássio apresenta maiores taxas de reestabelecimento. A área de cultivo de cana-de-açúcar com manejo de colheita sem queima também apresentou uma maior ($p > 0,05$) capacidade de troca catiônica (CTC) e soma de bases (SB).

Ambas as áreas apresentaram valores de saturação de bases (V) acima de 50%, valor este indicativo de fertilidade (EMBRAPA,2010), assim os solos amostrados podem ser considerados férteis.

5.2 Análise do teor de água das amostras de solo

As amostras de solo cultivadas com manejo de colheita sem queima apresentaram média de 12,4% de umidade; com queima, 11,9% de umidade. Estes valores se mostraram semelhantes estatisticamente.

5.3 Extração e quantificação de DNA das amostras de solo

O DNA total do solo rizosférico e do controle foram extraídos em duplicata para cada amostra coletada. Todas as amostras apresentaram resultados entre 1,8 a 2,0 do parâmetro 260/280, medidos no *Nanodrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific). Os solos rizosféricos da cana-de-açúcar cultivada no solo proveniente da área com manejo de colheita sem queima apresentaram concentração entre 6,03 a 33,5 ng/µL

de DNA, já no controle desta área a variação da concentração foi de 6,43 a 19,93 ng/µL de DNA. Para os solos rizosféricos da cana-de-açúcar cultivada no solo proveniente da área com manejo de colheita com queima apresentaram concentração entre 3,06 a 16,06 ng/µL de DNA, e no controle desta área a variação da concentração de DNA foi de 4,6 a 11,96 ng/µL.

5.4 qPCR do Filo Actinobacteria e do gene *alkB*

O PCR quantitativo em tempo real foi realizado para estimar as comunidades de Actinobacteria e o gene *alkB* presentes nos solos rizosférico e controle mantidos em experimento de mesocosmo.

Para a quantificação do gene 16S rRNA de Actinobacteria foi utilizando a curva padrão com 10^9 a 10^5 copias do gene, as amostras apresentaram eficiência maior que 93% e R^2 maior que de 0,99. Na quantificação do gene *alkB* foi utilizando a curva padrão com 10^8 a 10^4 copias do gene, as amostra apresentaram eficiência maior que 75% e R^2 maior que de 0,99.

Os valores obtidos na quantificação do gene 16S rRNA de Actinobacteria (Figura 5.1) não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados os tratamentos controles de cana-de-açúcar crua ($4{,}20 \times 10^8$) e queimada ($9{,}51 \times 10^8$). Quando comparado os resultado para rizosfera ($3{,}53 \times 10^8$) e controle ($4{,}20 \times 10^8$) da cana-de-açúcar crua também não houve diferença estatística. O mesmo se repete quando analisado os solos, rizosférico ($4{,}84 \times 10^8$) e controle ($9{,}51 \times 10^8$) da cana-de-açúcar queimada.

Navarrete e colaborados (2015) em um experimento comparando solos com e sem aplicação de fertilizantes nitrogenados, vinhaça e manutenção da palhada obtiveram quantificações para os gene 16S rRNA de Actinobacteria nos vasos controle, na ordem de $3{,}1 \times 10^8$ a $3{,}6 \times 10^8$ no decorrer dos 210 dias de experimento.

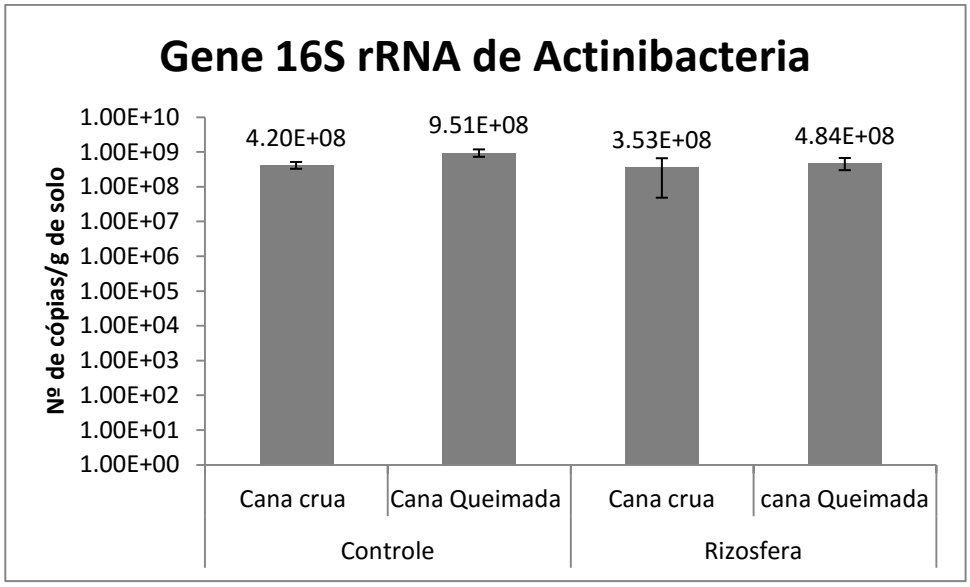

Figura 5.1 - Número de cópias do gene 16S rRNA de *Actinobacteria* para cada tipo de solo. Os resultados apresentados correspondem as médias para cada tratamnento.

Para a quantificação do gene *alkB* (figura 5.2) também foram realizadas as comparações estatísticas entre os solos controles de cana-de-açúcar crua e queimada, assim como as comparações entre controle e rizosfera de cada tipo de manejo de colheita.

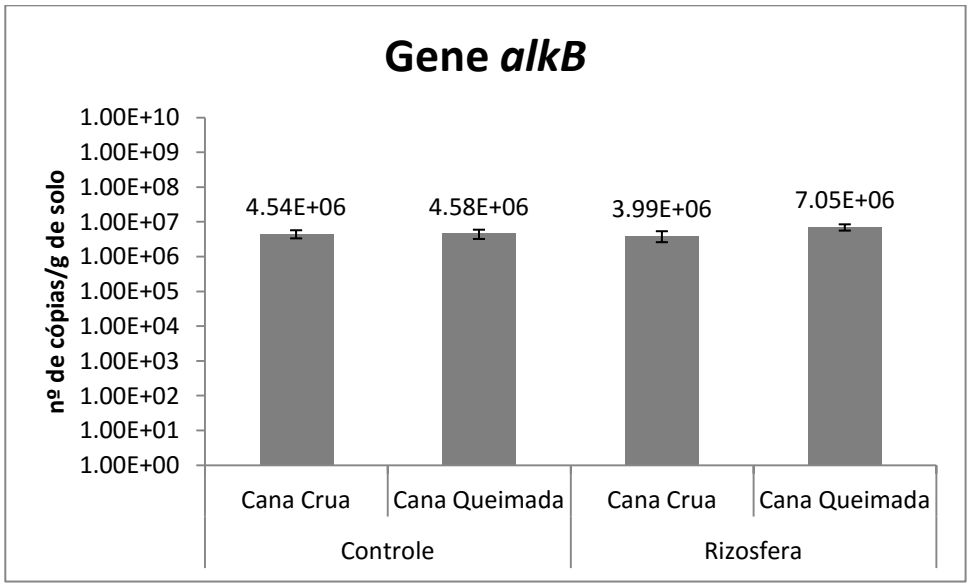

Figura 5.2 - Número de cópias do gene *alkB* para cada tipo de solo. Os resultados apresentados correspondem as médias para cada tratamnento.

Entre os tratamentos controle de cana-de-açúcar crua ($4{,}54x10^6$) e cana-de-açúcar queimada ($4{,}58x10^6$) não houve diferença estatística O mesmo se repete quando comparados os resultados de rizosfera ($3{,}99x10^6$) e controle ($4{,}54x10^6$) de

cana-de-açúcar crua, e rizosfera ($7,05x10^6$) e controle ($4,58x10^6$) de cana-de-açúcar queimada.

Heiss-blanquet e colaboradores (2005) quantificaram o gene *alkB* em solo não contaminado com hidrocarbonetos e obtiveram valores entre 4,2 e 5,8 x 10^6, o que corrobora com a quantificação obtida neste trabalho. Já Kloos et al.(2006), obteve uma quantificação entre 1,0 $x10^4$ e $5,5x10^5$ em diferentes solos agrícolas. Assim, todos esses dados mostram uma ampla distribuição do gene *alkB* em diferentes tipos de manejo do solos.

5.5 T-RFLP do gene 16S rRNA de Bacteria

A análise do Polimorfismo dos Fragmentos Terminais de Restrição (FTR) do gene 16S rRNA de *Bacteria* foi realizada para observar a diferenciação da comunidade bacteriana presente nos solos provenientes do experimento de mesocosmos.

Utilizando o índice de diversidade Shannon (Tabela 5.2) gerado pela análise no programa Primer 6, observa-se que na comparação entre os tratamentos controle de cana-de-açúcarcrua e queimada, o solo de cana-de-açúcarcrua controle apresenta maior diversidade e também maior diversidade quando comparado ao solo rizosférico de cana-de-açúcarcrua. Esses resultados também foram observados na riqueza dos FTRs. Já na comparação dos solos controles e rizosférico de cana-de-açúcarqueimada observa-se uma maoir riqueza no solo rizosférico, e no Indíce de Shannon não se encontra diferença estatisticas entre os solos.

Tabela 5.2 - Indice de diversidade para o gene 16S rRNA de Bacteria nos diferentes solos amostrados.

Análises	**Índices**			
	Riqueza	**p**	**Shannon**	**p**
Cana-de-açúcarCrua controle	173±12 a	< 0,01	4,45±0,2 a	< 0,01
Cana-de-açúcarqueimada controle	71±25 b		3,77±0,2 b	
Cana-de-açúcarcrua rizosfera	79±18 b	< 0,01	3,73±0,3 b	< 0,01
Cana-de-açúcarcrua controle	173±12 a		4,45±0,2 a	
Cana-de-açúcarqueimada rizosfera	139±18 a	< 0,011	4,15±0,1	< 0,01
Cana-de-açúcarqueimada controle	71±25 b		3,77±0,2	

O teste estatistico ANOSIM foi realizado para se comparar os perfis resultantes do FTRs analisando a significância de dissimilaridade (CLARKE, 1993; RAMETTE, 2007), entre os solos rizosférico e controle da cana-de-açúcarcrua e queimada (tabela 5.3). O resultado do teste mostra uma sobreposição entre o solos rizosférico e controle tanto para o solo de cana-de-açúcarcrua quanto para o solo de cana-de-açúcarqueimada.

Tabela 5.3 - Teste estatístico ANOSIM para as comunidades do gene 16S rRNA de *Bacteria*

Análises	**R**	**p**
Cana-de-açúcarcrua rizosfera x controle	0,36	< 0.01
Cana-de-açúcarqueimada rizosfera x controle	0,27	< 0.01

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

Rachid e colaboradores (2013), comparam a comunidade bacteriana em solo cultivado com cana-de-açúcar com o manejo de colheita com e sem queima e também em área preservada adjacente, e não foi encontada diferenças para os indices de diversidade, porém a quantificação do gene específico para bactéria realizada pela técnica de qPCR mostrou uma diminuição no número de cópias do gene 16S por grama de solo nas áreas cultivadas em comparação com a preservada.

Na análise de DCA (do inglês *Detrended Correspondence Analysis*) (Figura 5.3) observamos uma separação na comunidades bacterianas encontrada nos solos controles de cana-de-açúcarcrua e queimada. Quando se compara os solos rizosférico e controle com o mesmo manejo de colheita, também se observa uma separação entre os solos, mostrando assim uma diferenciação na comunidade bacteriana presentes nestes solos e detectadas pelo T-RFLP.

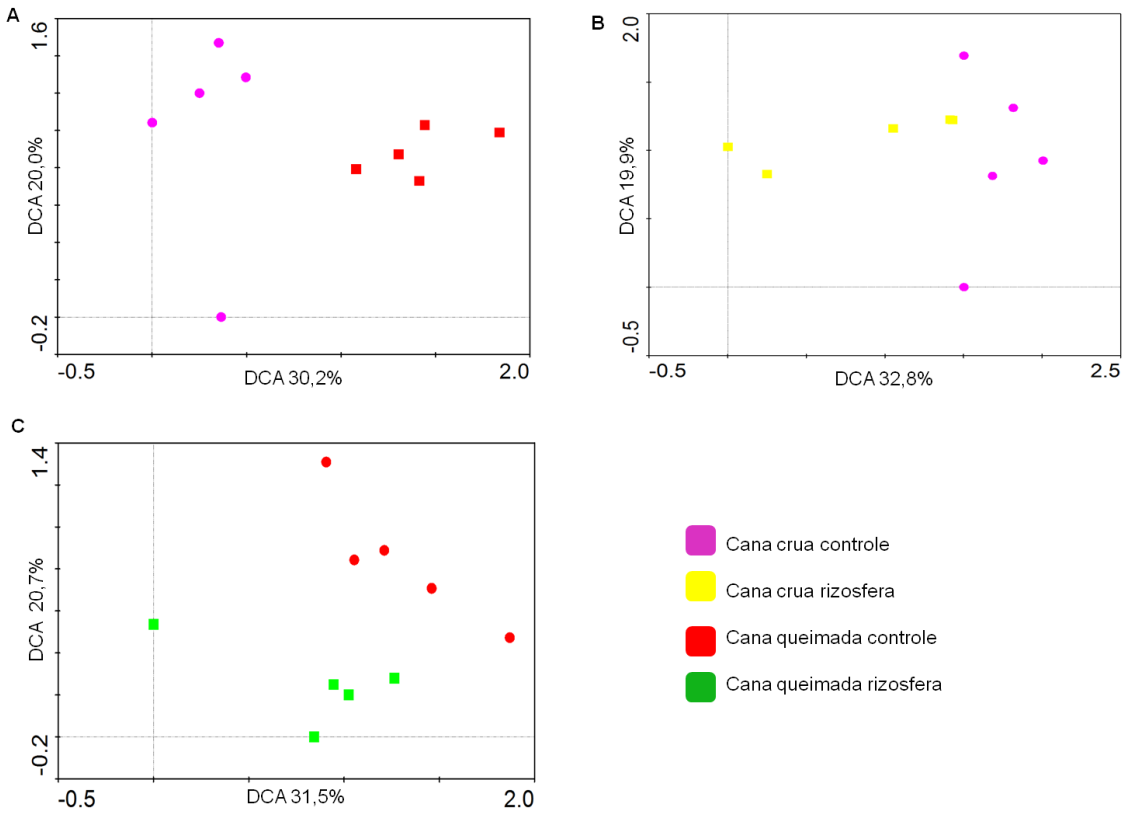

Figura 5.3 - Analise de DCA (*detrended correspondence analysis*) da conunidade bacteriana dos solos estudados. (A) DCA da estrutura da comunidade de Bacteria dos solos controles de cana-de-açúcarcrua e queimada. (B) DCA da estrutura da comunidade de Batéria do solo rizosférico e controle de cana-de-açúcarcrua. (C) DCA da estrutura da comunidade de Bacteria do solo rizosférico e controle da cana-de-açúcarqueimada.

Com os resultados obtidos por T-RFLP dos solos controles e os parametros fisíco-químicos que apresentaram diferenças estatisticas ($p<0,05$) se realizou a análise de correspondência canônica (CCA) para se análisar a relação entre as comunidades bacterianas e os atributos fisíco-químicos presentes nos solos (figura 5.4)

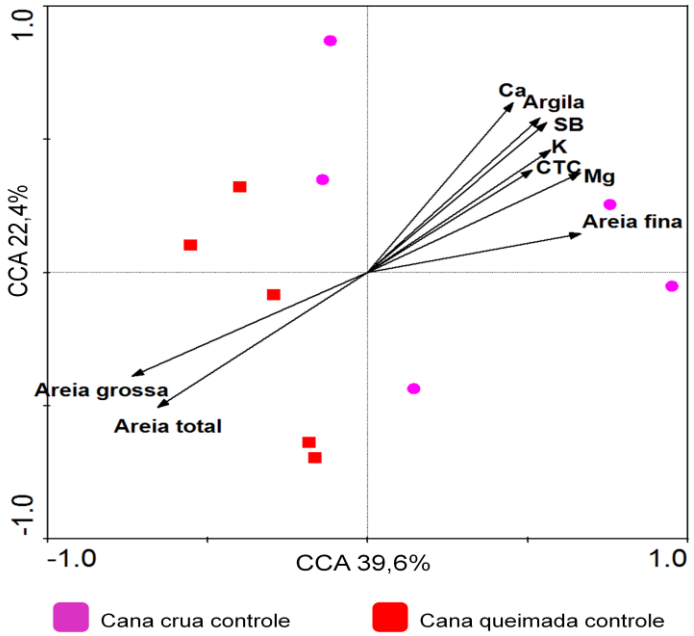

Figura 5.4 - Análise de correspondência canonica (CCA) com os solos controles de cana-de-açúcarcrua e queimada jantamento com os atributos fisicos-químicos do solo. Cálcio (Ca); Potássio (K); Magnesio (Mg); Somas de bases trocadas (SB); Capacidade de troca catiônica (CTC).

A CCA mostrou que o solo controle de cana-de-açúcarcrua apresenta maior correlação com o cálcio (Ca), o potássio (K), o magnésio (Mg), a soma de bases trocadas (SB), a capacidade de troca catiônica (CTC), a argila e a areia fina. Enquanto o solo controle da cana-de-açúcarqueimada mostra maior correlação com a concentração de areia grossa e a areia total presente no solo. Resultados semelhantes foram obtidos por Bigaton (2015), onde suas análises mostraram que a comunidade bacteriana em solo cultivado com cana-de-açúcar sofreram maior influência do pH, fósforo (P), potássio (K), magnésio (Mg), matéria orgânica (MO), capacidade de troca catiônica (CTC), argila, areia e silte.

5.6 Análise taxonômica e funcional das amostras de solo rizosférico e controle.

Foram sequenciadas 18 amostras de DNA, sendo 3 proveniente de cada tipo de solo do experimento de mesocosmo. Esta técnica foi aplicada para analisar a estrutura da comunidade bacteriana presente nos solos amostrados, bem como a comunidade portadora do gene *alkB*. Com o sequenciamento metagenômico, após a aplicação dos filtros de qualidade, obtivemos um número de sequências por

amostras que variou de 492.167 a 1.605.480, sendo que o tamanho médio destas sequências variou de 182 a 193 pares de base (pb) (tabela 5.4).

Tabela 5.4 - Características gerais dos metagenomas após o filtro de qualidade QC.

	Amostra	MG-RAST ID	N. de sequências	Tamanho médio das sequências (bp)	Total bp	Conteúdo GC médio (%)	% proteínas preditas
Cana-de-acúcarCrua	Controle 1	4546163	701,963	189 ± 56	133,026,242	64 ± 9	93.6
	Controle 2	4546165	982,077	188 ± 54	184,954,365	64 ± 8	94.1
	Controle 3	4546167	1,408,387	192 ± 53	270,557,544	63 ± 8	94.6
	Rizosfera 1	4546164	729,304	190 ± 55	138,960,541	65 ± 8	93.9
	Rizosfera 2	4546166	504,733	193 ± 56	97,512,465	64 ± 8	94.2
	Rizosfera 3	4546168	599,928	192 ± 56	115,756,449	64 ± 8	94
Cana-de-acúcarQueimada	Controle 1	4546169	1,222,861	187 ± 56	229,129,633	63 ± 9	93.3
	Controle 2	4546171	502,914	187 ± 58	94,195,949	64 ± 9	93
	Controle 3	4546173	1,470,055	186 ± 55	274,209,671	64 ± 8	93.6
	Rizosfera 1	4546170	728,937	182 ± 56	132,698,148	64 ± 8	92.9
	Rizosfera 2	4546172	492,167	186 ± 59	91,799,068	64 ± 8	92.5
	Rizosfera 3	4546174	1,605,480	182 ± 57	293,538,535	64 ± 8	93.1

5.6.1 Abundância taxonômica do metagenoma

Os dados do NCBI *Taxonomy* foram utilizados como base na identificação taxonômica para a análise da comunidade bacteriana presente nos solos rizosférico e controle de cana-de-açúcarcrua e de cana-de-açúcarqueimada e, posteriormente, o teste-t foi aplicado para determinar as diferenças estatísticas ($p<0,05$) dentre os tratamentos.

Tanto para o solo controle quanto rizosférico de cana-de-açúcarcrua (Tabela 5.5) os Filos Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes e Acidobacteria, respectivamente, se mostraram como os mais abundantes nas comunidades. Porém nenhum dos filos encontrados apresenta diferença estatística significativa quando se compara os solos rizosférico e controle de cana-de-açúcar crua.

Tabela 5.5 - Abundância dos filos encontrados nos solos controle e rizosférico de cana-de-açúcarcrua.

Phylum	Cana-de-açúcarCrua				
	Controle		Rizosfera		
	Média (%)	DV	Média (%)	DV	p-values
Proteobacteria	41,02	4,10	37,91	3,01	0.43948
Actinobacteria	30,09	5,04	35,61	6,13	0.38336
Firmicutes	6,42	0,95	5,94	0,33	0.55758
Acidobacteria	5,47	0,50	5,00	0,68	0.48545
Chloroflexi	3,68	0,31	3,39	0,37	0.45009
Planctomycetes	2,95	0,30	2,73	0,49	0.61805
Bacteroidetes	2,44	0,35	2,24	0,15	0.52999
Cyanobacteria	2,05	0,19	1,87	0,34	0.55724
Verrucomicrobia	1,73	0,24	1,65	0,26	0.76972
Deinococcus-Thermus	0,76	0,02	0,71	0,07	0.45101
unclassified (derived from Bacteria)	0,74	0,05	0,69	0,10	0.5572
Gemmatimonadetes	0,71	0,11	0,52	0,11	0.14887
Nitrospirae	0,45	0,07	0,33	0,09	0.23604
Chlorobi	0,35	0,05	0,33	0,06	0.67951
Spirochaetes	0,18	0,01	0,17	0,03	0.66903
Thermotogae	0,18	0,02	0,17	0,03	0.61806
Aquificae	0,17	0,01	0,16	0,03	0.6743
Chlamydiae	0,15	0,02	0,13	0,03	0.47841
Synergistetes	0,11	0,01	0,11	0,02	0.9479
Fusobacteria	0,07	0,00	0,07	0,01	0.75053
Deferribacteres	0,06	0,01	0,06	0,01	0.88244
Poribacteria	0,06	0,01	0,04	0,01	0.11615
Dictyoglomi	0,05	0,00	0,05	0,01	0.8119
Lentisphaerae	0,04	0,00	0,04	0,00	0.91274
Tenericutes	0,02	0,00	0,02	0,00	0.84071
Chrysiogenetes	0,02	0,00	0,02	0,01	0.92827
Elusimicrobia	0,02	0,00	0,01	0,00	0.43954
Fibrobacteres	0,01	0,00	0,01	0,00	0.34036

Nos solos rizoférico e controle de cana-de-açúcar queimada (tabela 5.6) os Filos mais abundantes são Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes e Acidobacteria, respectivamente (Figura 5.5). Apenas os Filos Proteobacteria, Actinobacteria e *Bacteroidetes* apresentaram diferença estatística ($p<0,05$) significativa na comparação entre os solos, sendo que o Filo Actinobacteria teve um aumento da abundância na rizosfera, enquanto os Filos Proteobacteria e Bacteroidetes tiveram uma diminuição (figura 5.6).

Os filos predominantes nas análises de metagenoma estão entre os mais abundantes em solos com cultivo de cana-de-açúcar. Costa e colaboradores (2014) avaliaram o solo adjacente e a rizosférico de seis variedades de cana-de-açúcar e

encontraram os Filos Actinobacteria, Proteobacteria, Acidobacteria e Firmicutes como os mais abundantes, respectivamente. Já Dini-Andreote et al (2010), obtiveram como os principais filos constituintes de solo com monocultura de cana-de-açúcar os filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Acidobacteria*. Assim, observa-se que apesar das variações nas quantificações tais filos são predominantes no solo com monocultura de cana-de-açúcar.

Tabela 5.6 - Abundância dos filos encontrados nos solos controle e rizosférico de cana-de-açúcar queimada

Phylum	**Cana-de-açúcarQueimada**				
	Controle		**Rizosfera**		
	Média (%)	**DV**	**Média (%)**	**DV**	**p-values**
Bacteroidetes	2,5028	0,0792	1,8868	0,0966	0.00255
Actinobacteria	30,9957	0,8906	38,1124	20,541	0.02511
Proteobacteria	41,2023	0,0998	36,2170	12,959	0.03152
Gemmatimonadetes	0,7611	0,1209	0,4685	0,0048	0.07554
Tenericutes	0,0208	0,0026	0,0172	0,0021	0.21442
Poribacteria	0,0485	0,0119	0,0344	0,0021	0.2323
Firmicutes	6,8950	0,8298	5,9121	0,0793	0.23511
Elusimicrobia	0,0148	0,0019	0,0125	0,0015	0.24597
Nitrospirae	0,3986	0,0931	0,3036	0,0059	0.28588
Chlamydiae	0,1420	0,0351	0,1073	0,0165	0.29886
Fusobacteria	0,0638	0,0082	0,0562	0,0030	0.32211
unclassified (derived from Bacteria)	0,6480	0,0273	0,6246	0,0232	0.40915
Fibrobacteres	0,0119	0,0024	0,0102	0,0008	0.42457
Chrysiogenetes	0,0167	0,0023	0,0154	0,0011	0.51383
Lentisphaerae	0,0364	0,0068	0,0396	0,0040	0.59991
Dictyoglomi	0,0442	0,0051	0,0421	0,0003	0.62764
Deferribacteres	0,0481	0,0047	0,0463	0,0025	0.66976
Cyanobacteria	1,8206	0,1458	1,7701	0,0894	0.70236
Spirochaetes	0,1574	0,0199	0,1511	0,0111	0.71805
Thermotogae	0,1600	0,0061	0,1580	0,0063	0.76284
Aquificae	0,1454	0,0167	0,1415	0,0084	0.78814
Acidobacteria	5,0810	0,2588	5,0220	0,2373	0.82388
Planctomycetes	2,8218	0,2707	2,8715	0,1529	0.83497
Synergistetes	0,0956	0,0125	0,0974	0,0043	0.85798
Deinococcus-Thermus	0,6769	0,0435	0,6721	0,0309	0.90423
Verrucomicrobia	1,4385	0,2144	1,4608	0,1290	0.90704
Chloroflexi	3,4484	0,0111	3,4455	0,0544	0.94792
Chlorobi	0,3039	0,0238	0,3038	0,0236	0.99895

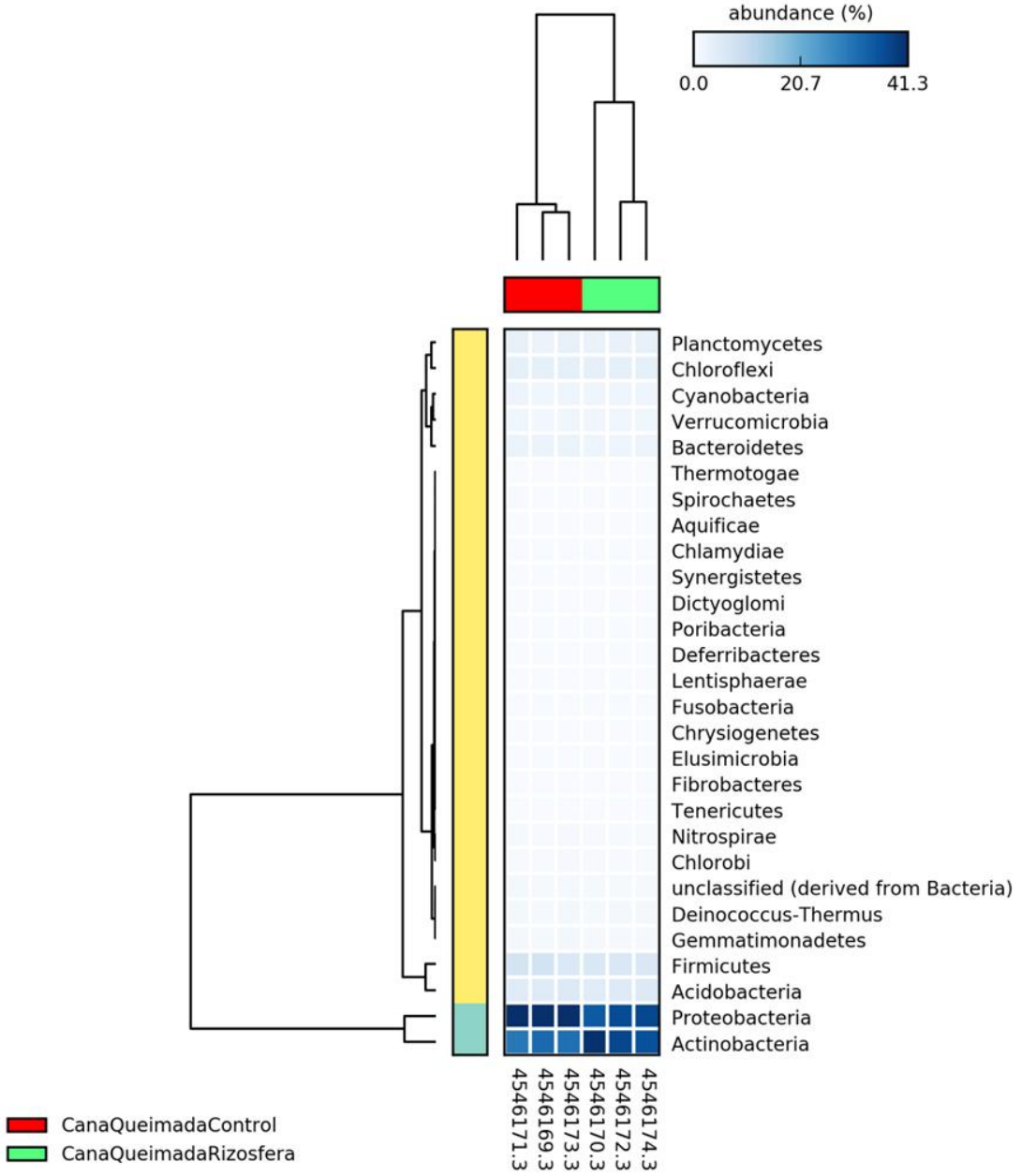

Figura 5.5 - Abundância Taxonômica dos Filos identificados nos solos controle e rizosférico de cana-de-açúcar queimada.

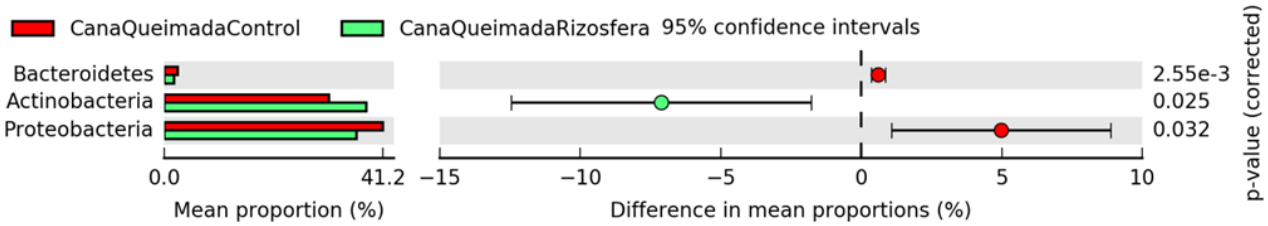

Figura 5.6 – Análise de STAMP dos perfis taxonômicos em nível de filo entre as amostras controle e rizosféra de cana-de-açúcar queimada.

É possível observar uma correlação negativa entre o Filo Actinobacteria e os Filo Proteobacteria e Bacteroidetes. A relação negativa entre os Filos Actinobacteria e *Proteobacteria* foi descrita por Bigaton (2014), em sua análise de *network* utilizando solo provenientes de 10 áreas com o cultivo de cana-de-açúcar, e por Navarrete et al.(2015) em experimento de casa de vegetação com cana-de-açúcar.

Analisando as Famílias encontradas nos solos controle e rizosférico de cana-de-açúcarcrua (tabela 5.7), apenas cinco apresentaram diferença significativa (p< 0,05), sendo que duas são não classificadas, onde uma deriva de Planctomycetales e outra de Gemmatimonadales. Já as Famílias que apresentaram diferença estatística (p<0,05) entre os solos controle e rizosférico de cana-de-açúcarqueimada (tabela 5.8), estão Famílias pertencentes aos Filos Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteriodetes e Firmicutes. Estudos mostram a dominância destes mesmos filos em diferentes solos (Jansses, 2006).

Tabela 5.7 - Abundância de Famílias que apresentam diferença significativa (p<0,05) presentes em solos controle e rizosférico de cana-de-açúcar crua

Família	**Cana-de-açúcarCrua**				
	Controle		**Rizosfera**		
	Média (%)	**DV**	**Média (%)**	**DV**	**p-values**
unclassified (derived from Planctomycetales)	0,0071	0,0004	0,0056	0,0004	0,01
Rhodobiaceae	0,0002	0,0001	0,0006	0,0001	0,02
unclassified (derived from Gemmatimonadales)	0,0082	0,0010	0,0050	0,0005	0,02
Coxiellaceae	0,0556	0,0026	0,0425	0,0040	0,02
Legionellaceae	0,1348	0,0050	0,1076	0,0085	0,03

Tabela 5.8 - Abundância de Famílias que apresentam diferença significativa (p<0,05) presentes em solos controle e rizosférico de cana-de-açúcar queimada.

Phylum	Class	Family	Cana-de-açúcarQueimada Controle		Rizosfera		
			Média	DV	média	DV	p-values
Actinobacteria	Actinobacteria	*Frankiaceae*	2,0642	0,0557	2,5934	0,0406	0,001
		Micrococcaceae	0,8976	0,0438	1,4026	0,0690	0,002
		Conexibactera-ceae	2,2158	0,0829	2,7414	0,1003	0,005
		Segniliparaceae	0,0431	0,0023	0,0565	0,0027	0,006
		Caténulisporaceae	0,6707	0,0270	10,684	0,0654	0,006
		Nocardiopsaceae	0,7310	0,0257	0,8883	0,0372	0,011
		Streptomyceta-ceae	5,0715	0,2734	6,5152	0,3476	0,011
		Acidimicrobiaceae	0,1308	0,0086	0,1706	0,0033	0,013
		Thermomonospo-raceae	0,6267	0,0312	0,7613	0,0329	0,014
		Glycomycetaceae	0,2553	0,0117	0,3023	0,0113	0,015
		Tsukamurellaceae	0,0819	0,0053	0,1040	0,0059	0,018
		Bifidobacteriaceae	0,0812	0,0055	0,1005	0,0033	0,020
		Nocardiaceae	1,3866	0,0689	1,6971	0,0971	0,025
		Geodermatophila-ceae	0,6293	0,0271	0,7789	0,0465	0,026
		Corynebacteria-ceae	0,2406	0,0078	0,3014	0,0188	0,030
		Dermabactera-ceae	0,0539	0,0025	0,0686	0,0048	0,031
		Propionibacteria-ceae	0,1048	0,0047	0,1276	0,0085	0,043
		Streptosporangia-ceae	0,8084	0,0571	0,9546	0,0368	0,047
		Pseudonocardia-ceae	2,2964	0,1687	2,7227	0,0967	0,049
Proteobacteria	Gamma-proteobacteria	*Alteromonada-ceae*	0,2118	0,0100	0,1701	0,0033	0,019
		Pseudoalteromo-nadaceae	0,0790	0,0018	0,0673	0,0021	0,004
		Shewanellaceae	0,2031	0,0102	0,1649	0,0107	0,022
		Legionellaceae	0,1729	0,0148	0,1232	0,0119	0,023
		unclassified (derived from Gammaproteo-bacteria)	0,2347	0,0096	0,2005	0,0116	0,034
		Colwelliaceae	0,0266	0,0011	0,0222	0,0016	0,036
		Methylococcaceae	0,1864	0,0077	0,1555	0,0070	0,014
		Coxiellaceae	0,0624	0,0034	0,0487	0,0051	0,042

	Beta-proteobacteria	*Methylophilaceae*	0,1627	0,0136	0,1231	0,0071	0,035
		Hydrogenophila-ceae	0,1140	0,0078	0,0795	0,0090	0,016
		Rhodocyclaceae	0,4909	0,0214	0,4073	0,0313	0,042
		Neisseriaceae	0,2466	0,0065	0,2005	0,0062	0,002
		Comamonada-ceae	1,5010	0,0288	1,2306	0,0958	0,048
	Alpha-proteobacteria	*Brucellaceae*	0,3418	0,0211	0,2683	0,0172	0,020
		Caulobacteraceae	0,7799	0,0282	0,6466	0,0517	0,047
	Delta-proteobacteria	*Bacteriovoraca-ceae*	0,0184	0,0019	0,0124	0,0008	0,035
Bacteroidetes	Sphingo-bacteriia	*unclassified (derived from Sphingobacteria-les)*	0,3293	0,0188	0,2283	0,0134	0,005
		Sphingobacteria-ceae	0,3603	0,0246	0,2470	0,0146	0,009
	Flavo-bacteriia	*Flavobacteriaceae*	0,4864	0,0190	0,3576	0,0247	0,005
		Blattabacteriaceae	0,0029	0,0004	0,0009	0,0003	0,006
		unclassified (derived from Flavobacteriales)	0,0168	0,0008	0,0127	0,0010	0,011
	Bacteroidia	*Prevotellaceae*	0,0506	0,0019	0,0397	0,0007	0,009
		Rikenellaceae	0,0167	0,0014	0,0126	0,0003	0,045
	Cytophagia	*Cytophagaceae*	0,5606	0,0521	0,4226	0,0244	0,046
		Flammeovirga-ceae	0,0361	0,0046	0,0212	0,0022	0,028
Firmicutes	Bacilli	*Aerococcaceae*	0,0090	0,0006	0,0073	0,0004	0,041

5.6.2 Identificação do gene *alkB*

Nos dados de metagenomas foram identificadas as sequências ortólogas do gene *alkB* utilizando os bancos de dados M5nr na buscas de sequências com similaridade (e-value < 0.0005). Foram obtidas 123 sequências com nível de identidade entre 54 e 97% (Apêndice A). Sendo que foi identificado maior número de sequências no solo controle de cana-de-açúcar crua, 34 sequências das 53 identificadas, e em solos rizosférico de cana-de-açúcar queimada, 41 sequências das 70 identificadas em cana-de-açúcar queimada.

Dentre as sequências identificadas observa-se uma dominância dos Filos Actinobacteria e Proteobacteria tanto no solo de cana-de-açúcar queimada quanto de cana-de-açúcar crua (figura 5.7). As sequências identificadas se assemelham principalmente as espécies de *Conexibacter sp, Nocardioides sp, e Mycobacterium sp*, todas pertencentes ao Filo Actinobacteria.

Kloos et al (2006), analisando sequências do gene alkB provenientes de pastagem degradada e plantação de cevada, obteve como maioria as sequências de *Rhodococcus sp, Nocardioides sp*, e *Mycobacterium SP*.

Porém, dentre as sequências identificadas como gene *alkB*, 14 delas foram classificadas como “uncultured bacterium”, ou seja, essas sequências do gene pertencem a espécies de bactéria desconhecidas e não cultiváveis, assim necessitam de maior atenção e estudo para uma possível identificação.

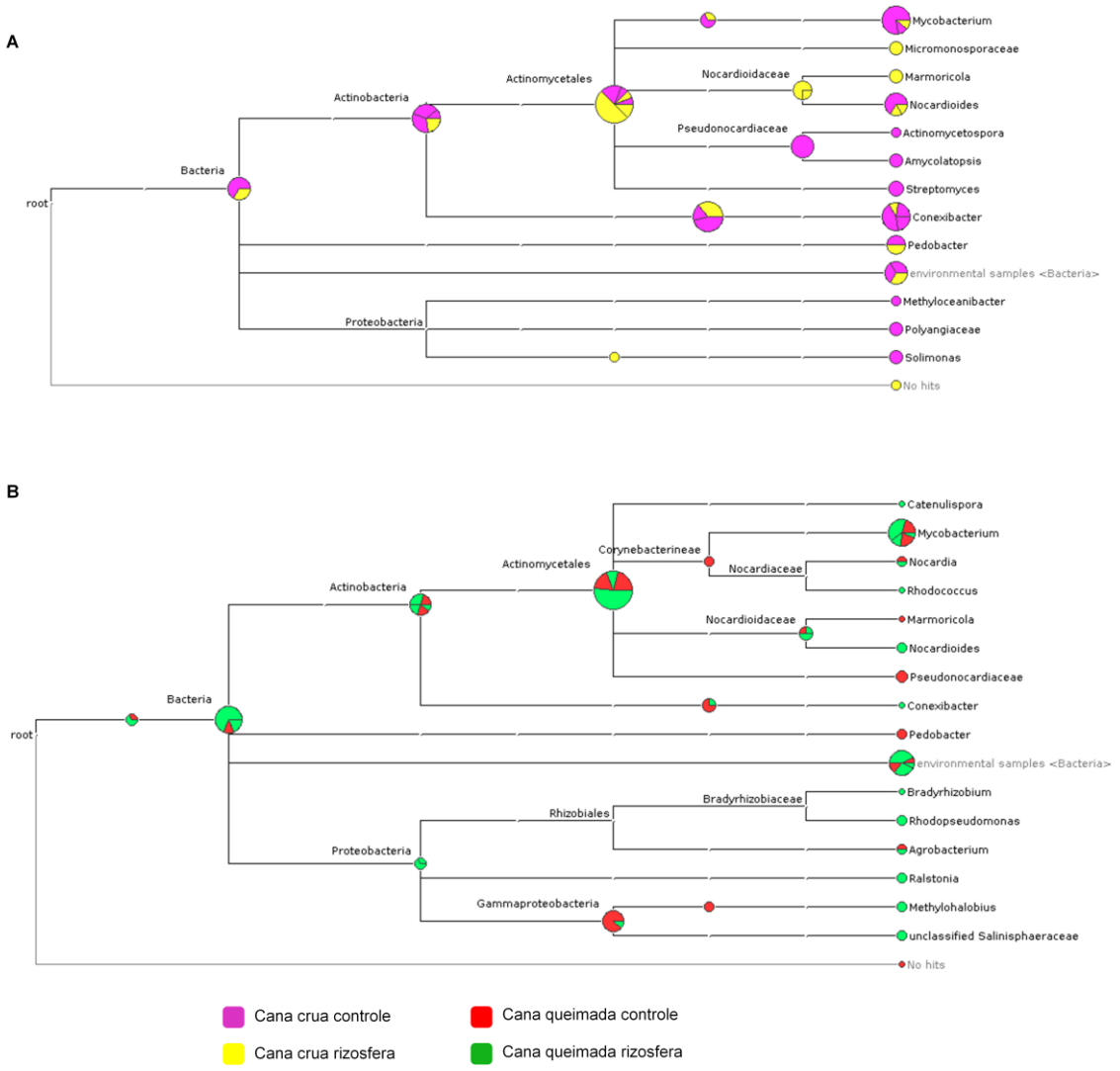

Figura 5.7 - Identificação taxonômica do gene *alkB* obtidos no metagenoma. (A) identificação taxonômica do gene *alkB* presentes nas amostra controle e rizosferica de cana-de-açúcarcrua, bem como as suas proporções. (B) identificação taxonômica do gene *alkB* presentes nas amostra controle e rizosférica de cana-de-açúcarqueimada, bem como as suas proporções.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível identificar os Filos Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes e Acidobacteria como os mais abundantes nos solos rizosférico e controle com o manejo de colheita da cana-de-açúcar com e sem queima. Sendo que a variação na estrutura da comunidade, em nível de filo é mínima. Porém quando analisado níveis taxonômicos mais baixos é possível notar a influência do manejo do solo na comunidade bacteriana do solo.

Já em relação ao gene *alkB*, ele se mostra igualmente presente nos solos com manejo de colheita com e sem queima, sendo classificado em sua grande maioria nos Filos Proteobacteria e Actinobacteria. Contudo ainda se faz necessários estudos mais específicos na detecção e classificação das bactérias portadoras deste gene que ainda não foram identificadas.

7. REFERÊNCIAS

ACD/STRUCTURE ELUCIDATOR.Version 12.01.Toronto, ON:**Advanced Chemistry Development**, Inc., 2014.Disponível em: www.acdlabs.com.

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

AMANN, RI; LUDWIG, W.; SCHILEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v.59, p. 143-169, 1995

BIGATON, ADEMIR DURRER, **Diversidade de bactérias e arquéias em solo cultivados com cana-de-açúcar: um enfoque biogeográfico**. 2014, 94 f. Tese (doutorado)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba,2014.

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

BULL, A. T. **Microbial Diversity and Bioprospecting**. 1a Edição. American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, 2004

CANNAVAN, F.S. **Diversidade das comunidades bacterianas em solo de terra preta antropogênica da Amazônia Central e Oriental**. 2007.116f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de So Paulo~, Piracicaba, 2007.

CANOSA, I.; YUSTE, L.; ROJO, F.Role of the alternativesigma factor sigma S in expression of the regulator of the Pseudomonas oleovorans alkane degradation pathway.**Journal Bacteriol**, v. 181, p. 1748-1754, 1999

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

CHEAVEGATTI-GIANOTTO A.;, ABREU, H.M.C; ARRUDA, P.; FILHO, J.C.B.; BURNQUIST, W.L.; CRESTE, S.; 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.; , W.J.; FILHO M.C.S.; ULIAN, E.C. Sugarcane (Saccharum X officinarum): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Tropical plant biology**, v.4, n.1, p. 62-89,2011.

CLARKE, K.R. Nonparametric multivariate analyses of chenges in community structure. **Australian Journal of Ecology.** Carlton, v18, p. 117-143,1993.

COLEMAN J.N.; KHAN, U.; GUN'KO, Y.K. Mecahanical reinforcement of polymers using carbon nanotubes. **Advanced Materials**, v. 18, p 689-706, 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. **Publicação Conab**, Brasilia, v. 2, n. 1, 2015.

COOPER, H.L.R.; MISHRA, G.; HUANG, X.; CUDLIP, M.P.; AUSTIN, R.N.; SHANKLIN, J.; GROVES, J.T. Parallel and competitive pathways for substrate desaturation, hidroxylation, and radical rearrangement by the non-heme diiron hydroxylase alkB. **Journal of the American Chemical Society,** v. 134, p. 20365-20375, 2012

COSTA, D.P.; DIAS, A.C.F.; DURRER, A. ; ANDRADE,P.A.M. ; GUMIERE, T. ; ANDREOTE, F.D. Composição diferencial das comunidades bacterianas na rizosfera de variedades de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** v. 38, p. 1694-1702, 2014.

CULMAN, S.W.; GAUCH, H.G.; BLACKWOOD,C.B.; THIES,J.E. Analysis of T-FRLP data using analysis of variance and ordination methods: A comparative study. **Journal of MAcrobiological Methods,** Amsterdam, v.75, p.55-63, 2008.

DE GREGORIS, T. B.; ALDRED, N.; CLARE,A. S.; BURGESS, J. G. Improvement of phylum-and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. **Jornal of microbiological methods.** v. 86, p. 351-356, 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**, v.40, n.3, 2005.

DEMATTE, 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**, v. 28, n. 5, p. 877-889, 2004.

DINI-ANDREOTE,F.; ANDREOTE, F.D.; COSTA, R.; TAKETANI, R.G.; ELSAS, J.D.; ARAÚJO, W.L. Bacterial soil community in brazilian sugarcane field. **Plant and Soil**, London, v.336, n. ½, p. 337-349,2010.

EMBRAPA. Conceitos **de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais.** Campinas, SP, 2010. 26 p.

EMBRAPA. **Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos** (Rio de Janeiro, RJ). Manual de métodos de análise de solo. Rio de Janeiro, 1979. 271p.

ESCUDERO, E. L. R., DAZA, O. D. S.; TORRES, J. H. Caracterización de actinobacterias raras, degradadoras de lignocelulosa: demostración de actividad lacasa en dos aislados de Tsukamurella sp y Cellulosimicrobium SP. **Rev. Colombiana de Biotecnologia**. v. 14, n. 2, Dec. 2012.

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**, v. 71, n. 7, p. 4117-4120, 2005.

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

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

GAO,B.; PARAMANATHAN,R.; GUPTA,R.R. Signature proteins that are distinctive characteristics of actinobacteria and thei subgroup. Antonie van Leeuwenhoek, Amsterdam, v. 90, n.1, p. 69-91, 2006.

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

GAŠPARIČ et al., 2009 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,** v. 396, n. 6, p. 2023-2029, 2010

GAVA, C. A. T; PEREIRA, J. C.; FERNANDES, M. C.; NEVES, M. C. P. Seleção de isolados de estreptomicetos para controle de Ralstonia solanacearum em tomateiro. **Pesquisa agropecuária brasileira** Vol.37 no.10 Brasília Oct. 2002.

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

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, 2001.

HEISS-BLANQUET S.; BENOIT Y.; MARECHAUX C.; MONOT F. Assessing the role of alkane hydroxylase genotypes in environmental samples by competitive PCR**. Journal Appl Microbiol** v. 99, p.1392–14032005

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**, Malden, v. 6, n. 7, p. 613-622, 2003.

HUSON, D.H.; AUCH, A.F.; QI, J. SCHUSTER, S.C. MEGAN analysi of metagenomic data. **Genome research,** v. 17, p 377-386, 2016.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. Mecanização na colheita da cana-de-açucar atinge 84% na safra agrícola 2013/14. **Análise e indicadores do agronegócio**, v.10, n. 2, 2015.

JANSSEN, P.H.Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries od 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applies and Env. Microbiology**, v. 72,n. 3, p1719-1728, 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.

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystem. Agriculture, **Ecosystems and Environment.** v. 74, p. 65–76, 1999.

KLOOS, K.;. MUNCH, J.C.; SCHLOTER, M. A new method for the detection of alkane-monooxygenase homologous genes (alkB) in soils based on PCR-hybridization. **Journal of Microbiological Methods,** v. 66, p. 486-496,2006.

KOK, M.; OLDENHUIS, R.; VAN DER LINDER, M.P.; RAATJES,P.; KINGMA, J.; VAN LELYVELD, P.H.; WHITHOLT, B. The Pseudomanas oleovorans alkane hydroxylase gene: Sequence and expression. **Journal Biol. Chem.**, v 264, p 5435-5441,1989.

KUSTER, E. **Taxonomy of soil actinomycetes and related organisms**. In: Gray, T.R.G., Parkinson, D. (Eds.), The ecology of soil bacteria. University of Toronto Press, Toronto, Canada, p. 322–336, 1968.

LABINGER, J.A.; BERCAW, J.E. Understanding and exploiting C-H bond activation. **Nature**, v. 417, p. 507-514, 2002.

LECHEVALIER, M.P.; LECHEVALIER, H. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. **International Journal of Systematic Bacteriology, Reading,** v. 20, n. 4, p. 435-443, 1970.

LEGENDRE, P.; GALLAGHER, E.D. Ecologically meaningful transformationd for ordination of species data. **Oecologia**, New York, v.129, p. 271-280,2001.

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, v. 63, n. 11, 4516- 4522, 1997.

LUTON, P.E.; WAYNE, J.M.; SHARP,R.J.; RILEY,P.E. The mcrA gene as na alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analusis of methanogen population in landfill. **Microbiology, eading**, v.148, p 3521-3530,2002.

MAGOČ, T.; SALZBERG, S.L. FLASH: Fast Length Adjustment of Short Reads to Improve Genome Assemblies. **Bioinformatics,** v.27, p. 2957-63, 2011.

MENDONZA, H.N.S.; LIMA.E.; ANJOS, L.H.C.; SILVA,L.A; CEDDIA, M.B; ANTUNES, M.V.M.A .Propiedades químicas e biológicas de solo de tabuleiro cultivado com cana-de-açúcar com e sem queima da palhada. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v 24, p. 201-207, 2000.

MEYER, F.; PAARMAN, D.; D'SOUZA, M.; OLSON, R.; GLASS, E.M.; KUBAL, M.; PACZIAN, T.; RODRIGUEZ, A.; STEVENS, R.; WILKE, A.; WILKENING, J.; EDWARDS, R.A. The Metagenomics RAST server – A public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics,** v. 9, p. 386, 2008.

MIAO, DAVIES, 2012; MIAO,V.; DAVIES,J. Actinobacteria: the good, the bad and the ugly. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.98, n. 2, p. 143-150, 2012.

MITCHELL, R. D. J.; THORBURN, P. J.; LARSEN, P. Quantifying the loss of nutrients from the inmediate area when sugarcane residues are burnt. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technology**, 22, p. 206-211, 2000.

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

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.

NAVARRETE, A.A.; DINIZ ,T.R.; BRAGA, L.P.P.; SILVA, G.G.Z.; FRANCHINI, J.C.; ROSSETTO, R.; EDWARDS, R.A.; TSAI, S.M. Multi-Analytical approach reveals potential microbial indicators in soil for sugarcane model systems. **Journal PlosOne**, v 10, n. 6, p.1-19,2015.

NAVARRETE, et al. Acidobacterial community responses to agricultural management of soybean in Amazon forest soils. **FEMS Microbiology Ecology,** p. 1-15, 2012.

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

OEHMEN, C.S.; NIEPLOCHA, J. ScalaBLAST: A Scalable Implementation of BLAST for High-Performance Data-Intensive Bioinformatics Analysis. **IEEE Transactions on Parallel and Distributed Systems**, v.17,n. 8, p.740- 749 , 2006

OVERBEEK, R , et al. The Subsystems Approach to Genome Annotation and its Use in the Project to Annotate 1000 Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 17, p 5691-5702, 2005

PARK, J.; CROWLEY, D. E. Dynamic changes in nahAc gene copy numbers during degradation of naphthalene in PAH-contaminated soils. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin,v.72, p.1322-1329, 2006

PARKS, D.H; TYSON, G.W.; HUGENHOLTZ ,P.; BEIKO, R.G. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles.**Bioinformatics,** v. 20, n. 21, p. 3123-3124, 2014

PESSOA FILHO, M. A. C. P. **Metagênoma e suas aplicações no estudo de diversidade e função de microrganismos de solos do Cerrado**.Embrapa Cerrado – Planaltina, D.F., 2010, 29 p.

QUATRINI,P., SCAGLIONE, G., DE PASQUALE, C., RIELA, S., PUGLIA, A. M. Isolation of Gram-positive n-alkane degraders from a hydrocarbon- contaminated Mediterranean shoreline. **Jornal Appl.Microbiol**.v.104, p. 251–259, 2008.

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**, v. 8, n. 3, 2013.

RAMETTE, a. Multivariate analyse in microbial ecology.**FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 62, p.142-160,2007.

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

RANJARD, L; POLY, F; LATA, J-C; MOUGEL, C; THIOULOUSE, J; NAZARET, S. Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communities by Automated Ribosomal

Intergenic Spacer Analysis Fingerprints: Biological and Methodological Variability. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 10, p. 4479-4487, 2000.

RHO, M.; TANG, H.; YE,Y. FragGeneScan: predicting genes in short and error-prone reads. **Nucleic Acids Research**, V. 38, N. 20, p. 1 – 12, 2010

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**, v. 67, n. 1, p. 6-20, 2009.

SMITS T.H.M.; BALADA, S.B.; WITHOLT, B.; VAN BEILEN, J.B. Functional analysis of alkane hydroxylases from Gram-negative and Grampositive bacteria**. Journal Bacteriol**, v. 184 ,p.1733–1742, 2002.

SMITS, T.H.; BALADA, S.B; WITHOLT, B.; VAM BEILEN, J.B. Funcional analysis of alkane hydroxylases from gram-negative ande gram-possitive bactéria. **Journal Bacterial**, v.184, p. 1733-1742, 2002

SÖHNGEN N.L. Benzin, Petroleum, Paraffinöl und Paraffin als Kohlenstoff- und nergiequelle für Mikroben. **Zentr Bacteriol Parasitenk** , v. 37, p. 595–609,1913.

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**, v. 155, p. 1-6, 2012.

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

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.

TORSVIK, V.; GOKSØYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 3, p.782-787, 1998.

TORSVIK, V.; ØVREAS, L.; THINGSTAD, T.F. Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors. Science, v. 296, p. 1064-1066, 2002.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME- UNEP. **Determinations of petroleum hydrocarbons in sediments.** Monaco: Marine Environmental Studies Laboratory; IAEA Marine Environment Laboratory, 1992. (Reference Methods for Marine Pollution Studies, 20). Disponível em: http://iwlearn.net/publications/regional-seas-reports/referencemethods-for-marine-pollution-studies-no.20.

VAN BEILEN et al. 1994; van Beilen JB, Wubbolts MG, Witholt B (1994) Genetics of alkane oxidation by Pseudomonas oleovorans. **Biodegradation** 5:161–174

VAN BEILEN J.B.; SMITS, T.H.M.; SCHORCHT, W.S.; RÖTHLISBERGER, M.; PLAGGEMEIER, T.; ENGESSER,K.H.; WITHOLT,B. Alkane hydroxylase homologues in Grampositive strains. **Environ Microbiol** v.4, p.676–682,2002

VAN BEILEN, J. B.; SMITS, T. H.; ROOS, F. F.; BRUNNER, T.; BALADA, S.; RÖTHLISBERGER, M.; WITHOLT, B. Identification of an amino acid position that determines the substrate range of integral membrane alkane hydroxylases. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.187, n.1, p.85-91, 2005.

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

VAN HAMME, J.D; SINGH, A.; WARD, O.P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiol Mol. Bio. Rev.**, v. 67, p. 503-549, 2003.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; SINDEREN, D. Genomics of Actinobacteria: Tracing the evolutionary History of an Ancient Phylum. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**. Vol. 71, No. 3,p. 495–548, 2007.

VOMBERG ,A.; KLINNER, U. Distribution of *alkB* genes within *n*-alkane-degrading bactéria**.** **Journal Appl. Microbiol**, v.89 , p. 339–348,2000.

WENTZEL, A.; ELLINGSER, T.E; KOTLAR, H. K.; ZOTCHEV, S.B; THRONE-HOLST, M. Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes, **Appl. Microbiol Biotechnol**, v. 76, p. 1209-1221, 2007.

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

WILKE,A.; HARRISON, T.; WILKENING, J.; FIELD, D.; GLASS, E.M.; KYRPIDES, N.; MAVROMMATIS, K.; MEYER,F. The M5nr: a novel non-redundant database containing protein sequences and annotations from multiple sources and associated tools. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 141, p. 1- 5, 2012

YANG,X.; LIU,D.; LUI,F.; WU, J.; ZOU, J.; XIAO, X.; ZHAO, F.; ZHU, B. HTQC:a fast quality control toolkit for illumina sequencing data.**BCM Bioinformatics,** v 33, p 33-36, 2013

Apêndice

Apêndice A - tabela de sequências homologas ao gene *alkB*

Amostra	Nome da sequência	E-value	Identidade (%)	Cobertura (%)	Espécie mais similar
CC1Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1114:19807:17284_1:N:0:16	0	96.23	98	*uncultured bacterium*
CC1Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2105:6970:15644_1:N:0:16	0	86.25	99	*Pseudonocardia acaciae*
CC1Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2105:6970:15644_1:N:0:16	0	86.25	99	*Pseudonocardia acaciae*
CC1Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2107:13324:23416_1:N:0:16	0	93.98	99	*uncultured bacterium*
CC1Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1101:15046:19442_1:N:0:16	0	81.82	66	*Streptomyces fradiae*
CC1Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1107:23763:21742_1:N:0:16	0	66.67	72	*Conexibacter woesei;Conexibacter woesei DSM 14684*
CC1Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2105:6970:15644_1:N:0:16	0	86.25	99	*Pseudonocardia acaciae*
CC1Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1102:12807:7133_1:N:0:13	0	76.83	98	*Conexibacter woesei;Conexibacter woesei DSM 14684*
CC1Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2104:26423:10495_1:N:0:13	0	84.34	99	*Micromonospora sp. ATCC 39149*
CC1Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1102:12807:7133_1:N:0:13	0	76.83	98	*Conexibacter woesei;Conexibacter woesei DSM 14684*
CC1Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1107:12236:23249_1:N:0:13	0	74.39	98	*Conexibacter woesei;Conexibacter woesei DSM 14684*
CC1Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2104:26423:10495_1:N:0:13	0	84.34	99	*Micromonospora sp. ATCC 39149*
CC2Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1108:21913:18744_1:N:0:17	0	79.52	100	*Lentzea albidocapillata*
CC2Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2105:6146:18430_1:N:0:17	0	68.67	99	*Conexibacter woesei;Conexibacter woesei DSM 14684*
CC2Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2107:11660:6422_1:N:0:17	0	79.52	99	*Conexibacter woesei;Conexibacter woesei DSM 14684*
CC2Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2110:7770:3915_1:N:0:17	0	77.11	99	*Conexibacter woesei;Conexibacter woesei DSM 14684*
CC2Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1104:4537:16789_1:N:0:17	0	72.22	44	*Burkholderia pseudomallei NCTC 13179*
CC2Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1104:4537:16789_1:N:0:17	0	72.22	44	*Burkholderia pseudomallei NCTC 13179*
CC2Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2105:6146:18430_1:N:0:17	0	68.67	99	*Conexibacter woesei;Conexibacter woesei DSM 14684*
CC2Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2107:11660:6422_1:N:0:17	0	79.52	99	*Conexibacter woesei;Conexibacter woesei DSM 14684*
CC2Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2110:7770:3915_1:N:0:17	0	77.11	99	*Conexibacter woesei;Conexibacter woesei DSM 14684*
CC2Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1110:8998:27093_1:N:0:17	0	95.92	59	*Rhodococcus yunnanensis*
CC2Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1110:8998:27093_1:N:0:17	0	95.92	59	*Rhodococcus yunnanensis*
CC2Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2101:21780:10496_1:N:0:17	0	62.5	100	*Sinobacter flavus*

Amostra	Nome da sequência	E-value	Identidade (%)	Cobertura (%)	Espécie mais similar
CC2Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1104:4537:16789_1:N:0:17	0	72.22	44	*Burkholderia pseudomallei NCTC 13179*
CC2Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1104:4537:16789_1:N:0:17	0	72.22	44	*Burkholderia pseudomallei NCTC 13179*
CC2Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1111:24794:22333_1:N:0:17	0	92.86	99	*Mycobacterium peregrinum*
CC2Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2109:6287:6093_1:N:0:17	0	72	60	*Mycobacterium llatzerense;Mycobacterium sp. UNC280MFTsu5.1*
CC3Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2110:8574:5421_1:N:0:14	0	92.77	99	*Demetria terragena*
CC3Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2110:8574:5421_1:N:0:14	0	92.77	99	*Demetria terragena*
CC3Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2103:24703:25075_1:N:0:14	0	95.31	100	*uncultured bacterium*
CC3Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1103:4381:18125_1:N:0:18	0	80	78	*Amycolatopsis mediterranei;Amycolatopsis mediterranei S699;Amycolatopsis mediterranei U32;Amycolatopsis mediterranei RB*
CC3Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2102:27522:17042_1:N:0:18	0	96.39	99	*Nocardioides sp. Root122*
CC3Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2104:14335:4674_1:N:0:18	0	68.42	91	*Conexibacter woesei;Conexibacter woesei DSM 14684*
CC3Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2107:19912:21397_1:N:0:18	0	91.57	99	*Nocardioides sp. CF8*
CC3Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1103:4381:18125_1:N:0:18	0	80	78	*Amycolatopsis mediterranei;Amycolatopsis mediterranei S699;Amycolatopsis mediterranei U32;Amycolatopsis mediterranei RB*
CC3Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1109:25996:13849_1:N:0:18	0	74.39	99	*Conexibacter woesei;Conexibacter woesei DSM 14684*
CC3Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2107:19912:21397_1:N:0:18	0	91.57	99	*Nocardioides sp. CF8*
CC3Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2102:27522:17042_1:N:0:18	0	96.39	99	*Nocardioides sp. Root122*
CC3Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2104:14335:4674_1:N:0:18	0	68.42	91	*Conexibacter woesei;Conexibacter woesei DSM 14684*
CC3Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2104:8878:22482_1:N:0:18	0	90	98	*Streptomyces cellulosae*
CC3Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2112:4322:10991_1:N:0:18	0	83.13	99	*Chondromyces apiculatus;Chondromyces apiculatus DSM 436*
CC5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1107:11434:16251_1:N:0:15	0	85.54	99	*Marmoricola sp. URHB0036*
CC5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1108:14139:10801_1:N:0:15	0	85.37	98	*Marmoricola sp. Leaf446*
CC5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1111:10322:3809_1:N:0:15	0	95.18	99	*Marmoricola sp. URHB0036*
CC5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1108:14139:10801_1:N:0:15	0	85.37	98	*Marmoricola sp. Leaf446*
CC5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1111:10322:3809_1:N:0:15	0	95.18	99	*Marmoricola sp. URHB0036*
CC5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1111:11461:20336_1:N:0:15	0	83.13	99	*Conexibacter woesei;Conexibacter woesei DSM 14684*
CC5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2108:25260:19271_1:N:0:15	0	69.88	99	*Marinobacter sp. AK21*
CC5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2111:25324:20069_1:N:0:15	0	75.71	84	*Pedobacter sp. MS245e*

Amostra	Nome da sequência	E-value	Identidade (%)	Cobertura (%)	Espécie mais similar
CC5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1102:14173:7291_1:N:0:15	0	73.21	67	*Luteipulveratus mongoliensis*
CC5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1111:11461:20336_1:N:0:15	0	83.13	99	*Conexibacter woesei;Conexibacter woesei DSM 14684*
CC5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2104:25981:23335_1:N:0:15	0	74.07	32	*Patulibacter minatonensis*
CQ1Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1104:20395:10256_1:N:0:22	0	76.83	98	*Nocardioides luteus*
CQ1Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2102:25360:23097_1:N:0:22	0	66.67	96	*Nocardioides sp. CF8*
CQ1Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1114:14443:28318_1:N:0:22	0	97.59	99	*Nocardia sp. NRRL WC-3656*
CQ1Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2106:22881:10841_1:N:0:22	0	85.54	99	*Nevskia soli*
CQ1Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2106:22881:10841_1:N:0:22	0	85.54	99	*Nevskia soli*
CQ1Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2106:22881:10841_1:N:0:22	0	85.54	99	*Nevskia soli*
CQ1Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2106:22881:10841_1:N:0:22	0	85.54	99	*Nevskia soli*
CQ1Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2106:22881:10841_1:N:0:22	0	85.54	99	*Nevskia soli*
CQ1Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2106:22881:10841_1:N:0:22	0	85.54	99	*Nevskia soli*
CQ1Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2106:22881:10841_1:N:0:22	0	85.54	99	*Nevskia soli*
CQ1Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2106:22881:10841_1:N:0:22	0	85.54	99	*Nevskia soli*
CQ1Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2104:27246:17369_1:N:0:22	0	95.12	99	*uncultured bacterium*
CQ1Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1107:28975:14252_1:N:0:22	0	91.57	99	*Conexibacter woesei;Conexibacter woesei DSM 14684*
CQ1Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2101:12825:12464_1:N:0:22	0	60.61	39	*Conexibacter woesei;Conexibacter woesei DSM 14684*
CQ1Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2102:16833:19214_1:N:0:22	0	55.42	99	*Thecamonas trahens ATCC 50062*
CQ1Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1104:20395:10256_1:N:0:22	0	76.83	98	*Nocardioides luteus*
CQ1Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1103:22360:23596_1:N:0:19	0	95.18	99	*Agrobacterium sp. MS189b*
CQ1Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2110:18796:12688_1:N:0:19	0	57.32	98	*Amycolatopsis halophila*
CQ1Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2112:5905:11932_1:N:0:19	0	94.87	94	*uncultured soil bacterium*
CQ1Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1102:15509:15670_1:N:0:19	0	90.79	92	*Mycobacterium gordonae*
CQ1Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2111:14856:8749_1:N:0:19	0	86.75	99	*Alcanivorax sp. 97CO-5*
CQ1Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1102:15509:15670_1:N:0:19	0	90.79	92	*Mycobacterium gordonae*
CQ1Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2108:15852:11168_1:N:0:19	0	96.39	99	*uncultured bacterium*
CQ1Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2114:22818:21247_1:N:0:19	0	97.59	99	*Mycobacterium sp. IS-3022*
CQ1Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2112:5905:11932_1:N:0:19	0	94.87	94	*uncultured soil bacterium*
CQ1Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2113:13149:6570_1:N:0:19	0	75.9	99	*Conexibacter woesei;Conexibacter woesei DSM 14684*
CQ1Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2113:24157:10316_1:N:0:19	0	70.15	100	*Cryptosporangium arvum*
CQ1Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2108:15852:11168_1:N:0:19	0	96.39	99	*uncultured bacterium*
CQ1Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2104:8031:15285_1:N:0:19	0	64.86	88	*Streptomyces albus*

Amostra	Nome da sequência	E-value	Identidade (%)	Cobertura (%)	Espécie mais similar
CQ1Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2114:22818:21247_1:N:0:19	0	97.59	99	*Mycobacterium sp. IS-3022*
CQ1Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2110:18796:12688_1:N:0:19	0	57.32	98	*Amycolatopsis halophila*
CQ3Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2109:17470:14303_1:N:0:23	0	68.29	98	*Marmoricola sp. URHB0036*
CQ3Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2111:26325:19896_1:N:0:20	0	93.98	99	*Caténulispora acidiphila;Caténulispora acidiphila DSM 44928*
CQ3Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1106:25726:21613_1:N:0:20	0	89.02	98	*uncultured soil bacterium*
CQ3Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1106:12233:6618_1:N:0:20	0	78.87	85	*Conexibacter woesei;Conexibacter woesei DSM 14684*
CQ3Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2106:5838:8236_1:N:0:20	0	79.31	69	*Conexibacter woesei;Conexibacter woesei DSM 14684*
CQ3Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1113:11049:7926_1:N:0:20	0	80.72	99	*Streptomyces cellulosae*
CQ3Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2103:10632:9876_1:N:0:20	0	78.85	62	*Nocardia takedensis*
CQ3Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2103:12047:22091_1:N:0:20	0	97.59	99	*Mycobacterium wolinskyi*
CQ5Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1102:12805:24277_1:N:0:24	0	86.75	99	*Pedobacter sp. MS245e*
CQ5Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1110:13499:18480_1:N:0:24	0	70.24	99	*Nocardioides;Nocardioides sp. Root1257;Nocardioides sp. Root224*
CQ5Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1112:21901:17812_1:N:0:24	0	73.17	98	*Nocardioides sp. URHA0020*
CQ5Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2109:15035:9695_1:N:0:24	0	74.42	96	*Nocardioides sp. JS614*
CQ5Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1102:12805:24277_1:N:0:24	0	86.75	99	*Pedobacter sp. MS245e*
CQ5Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2102:23278:15013_1:N:0:24	0	80.72	99	*Conexibacter woesei;Conexibacter woesei DSM 14684*
CQ5Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1114:24285:18311_1:N:0:24	0	97.59	99	*uncultured bacterium*
CQ5Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1110:13499:18480_1:N:0:24	0	70.24	99	*Nocardioides;Nocardioides sp. Root1257;Nocardioides sp. Root224*
CQ5Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2102:23278:15013_1:N:0:24	0	80.72	99	*Conexibacter woesei;Conexibacter woesei DSM 14684*
CQ5Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1104:9508:13509_1:N:0:24	0	84.72	86	*Streptomyces albus*
CQ5Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1114:24285:18311_1:N:0:24	0	97.59	99	*uncultured bacterium*
CQ5Cont	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1111:10367:18686_1:N:0:24	0	54.55	99	*Legionella wadsworthii*
CQ5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1108:8421:25080_1:N:0:21	0	85.54	99	*Nocardioides sp. Root122*
CQ5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1114:5111:18050_1:N:0:21	0	81.48	32	*Demetria terragena*
CQ5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2103:5328:7259_1:N:0:21	0	92.77	99	*Lentzea albidocapillata*

Amostra	Nome da sequência	E-value	Identidade (%)	Cobertura (%)	Espécie mais similar
CQ5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2104:5443:20028_1:N:0:21	0	82.76	35	*Rhodococcus;Rhodococcus erythropolis;Rhodococcus erythropolis PR4;Rhodococcus erythropolis CCM2595;Rhodococcus erythropolis R138;Rhodococcus sp. P27*
CQ5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2108:12890:21301_1:N:0:21	0	96.39	99	*Marmoricola sp. URHB0036*
CQ5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2114:26971:13584_1:N:0:21	0	87.95	99	*Nocardioides sp. Root122*
CQ5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2103:5328:7259_1:N:0:21	0	92.77	99	*Lentzea albidocapillata*
CQ5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1109:18895:28074_1:N:0:21	0	75.61	98	*Rhodococcus ruber*
CQ5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2102:5523:18252_1:N:0:21	0	90.41	97	*uncultured bacterium;Ralstonia sp. PT11*
CQ5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1114:24248:19921_1:N:0:21	0	74.63	89	*Pseudomonas mendocina;Pseudomonas mendocina ymp;Pseudomonas mendocina DLHK*
CQ5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2113:27263:16492_1:N:0:21	0	73.97	97	*uncultured bacterium*
CQ5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1101:14208:27158_1:N:0:21	0	91.46	98	*Mycobacterium tusciae*
CQ5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2108:8083:26025_1:N:0:21	0	81.25	96	*uncultured bacterium*
CQ5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2103:5328:7259_1:N:0:21	0	92.77	99	*Lentzea albidocapillata*
CQ5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1112:17134:15242_1:N:0:21	0	59.46	97	*Methylohalobius crimeensis*
CQ5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1112:17134:15242_1:N:0:21	0	59.46	97	*Methylohalobius crimeensis*
CQ5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:1109:18895:28074_1:N:0:21	0	75.61	98	*Rhodococcus ruber*
CQ5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2106:5064:21287_1:N:0:21	0	75.61	98	*Pimelobacter simplex*
CQ5Riz	M01146:11:000000000-A4J5R:1:2107:9562:25812_1:N:0:21	0	82.14	98	*Mycobacterium kyorinense*