



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RENATA CAROLINI DE SOUZA

**METAGENÔMICA DE UM SOLO SOB PLANTIO DIRETO E
PLANTIO CONVENCIONAL EM ROTAÇÃO E SUCESSÃO
DE CULTURAS NO NORTE DO PARANÁ**

RENATA CAROLINI DE SOUZA

**METAGENÔMICA DE UM SOLO SOB PLANTIO DIRETO E
PLANTIO CONVENCIONAL EM ROTAÇÃO E SUCESSÃO
DE CULTURAS NO NORTE DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Mariangela Hungria.

Londrina
2012

RENATA CAROLINI DE SOUZA

**METAGENÔMICA DE UM SOLO SOB PLANTIO DIRETO E PLANTIO
CONVENCIONAL EM ROTAÇÃO E SUCESSÃO DE CULTURAS NO
NORTE DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Mariangela Hungria
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA-CNPSO

Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA-CNPSO

Dr. Mauricio Egídio Cantão
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA-CNPSA

Londrina, 29 de fevereiro de 2012.

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central
da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S729m Souza, Renata Carolini de.

Metagenômica de um solo sob plantio direto e plantio convencional em rotação e sucessão de culturas no norte do Paraná / Renata Carolini de Souza. – Londrina, 2012.
87 f. : il.

Orientador: Mariangela Hungria da Cunha.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Microbiologia do solo – Teses. 2. Genética microbiana – Teses. 3. Solos – Diversidade microbiana – Teses. 4. Solos – Manejo – Teses. 5. Plantio direto – Teses. 6. Rotação de cultivos – Teses. I. Cunha, Mariangela Hungria da. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 631.461

*Às minhas “jóias” Maria Fernanda e Ana Clara que deram outro sentido a minha vida.
Aos meu pais Nilse e Vanderci pelo apoio ao longo da minha vida.
Ao companheiro e tão querido Fernando.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Com o fim de mais uma etapa da minha vida, onde pude contar com muitas pessoas, faço um agradecimento especial e sincero..

À Dra. Mariangela Hungria pela acolhida no laboratório, pelo apoio, confiança e paciência com que me orientou para a realização deste trabalho, além de todos os ensinamentos. E também por sempre cuidar, proteger e defender todos os seus “filhos postiços”. Pra mim é uma verdadeira lição de pesquisadora e de pessoa.

Ao Dr. Marco Antonio Nogueira pelas ótimas sugestões e correções que muito contribuíram e, sobretudo, por ser uma pessoa admirável e um pesquisador muito competente que sempre está pronto para ajudar.

Ao Dr. Mauricio Egídio Cantão que contribuiu muito para o desenvolvimento desse trabalho e, com quem aprendi muito, mesmo estando longe e, para quem tenho muito a agradecer, principalmente pela paciência e amizade.

Ao Fernando, pelo amor, pela paciência e pelo apoio e incentivo durante todos os momentos, principalmente nos períodos de desânimo.

Aos meus pais, Maria Nilse e Vanderci, pela confiança e vibrações positivas.

Às sobrinhas Maria Fernanda e Ana Clara por proporcionarem tantas alegrias à titia com os mais belos e puros sentimentos.

Aos amigos do laboratório, antigos e novos, Jake, Gê, Josi, Jesi, Gisa, Hosana, Bettina, Diogo, Dáfila, Paula, Vivian, Eduara, Lígia, Dona Rosa, Arthur, Rinaldo, Marcos, Rebeca, Adriana, Renan, Marquito, André, Leticia, Talita, Douglas, Leopoldo, Noéli pela amizade, pelas conversas e risadas, me sinto privilegiada por conviver com pessoas tão maravilhosas e espetaculares.

Às grandes companheiras do coração Mônica e Tati pela amizade sincera, por muitos momentos de alegria e carinho, pelas festas e por estarem sempre torcendo

pelo sucesso uma da outra.

À todos os docentes que colaboraram para minha formação.

À Embrapa soja pelo suporte e estrutura concedida.

Ao LNCC pelo priorseqüenciamento das amostras.

À CAPES pelo apoio financeiro.

E principalmente a Deus, por iluminar meus pensamentos, por sempre me fortalecer nos momentos difíceis, por abençoar a minha vida me acompanhando em toda minha caminhada e permitindo a realização dos meus projetos.

SOUZA, Renata Carolini. **Metagenômica de um solo sob plantio direto e plantio convencional em rotação e sucessão de culturas no norte do Paraná.** 2012. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

RESUMO

Os sistemas de manejo de solos agrícolas são conhecidos como plantio direto (semeadura sobre os restos vegetais sem revolvimento do solo) e plantio convencional (preparo do solo com aração e gradagem antes da semeadura), em geral combinados com sucessão ou rotação de culturas. Sabe-se que existe uma grande diversidade de microrganismos do solo, porém limitações nas técnicas de cultivo em laboratório restringem as avaliações a apenas uma porcentagem ínfima desses microrganismos. No entanto, com a metagenômica tem-se revelado uma grande quantidade de microrganismos não cultiváveis do solo. Neste estudo, amostras de solo foram coletadas na camada de 0-10 cm de profundidade em ensaios de longa duração conduzidos na área experimental da Embrapa Soja. Os tratamentos consistiram de áreas sob plantio direto e plantio convencional estabelecidas há 14 anos, cada um sob sucessão (soja/trigo, verão/inverno) ou rotação (soja, tremoço, milho, trigo e aveia) de culturas, resultando em quatro tratamentos, cada um com quatro repetições. Foram retiradas oito amostras simples de cada repetição que, após verificada a homogeneidade da diversidade microbiana pela análise do DNA pela técnica do DGGE, foram unidas em uma amostra composta para cada um dos tratamentos. O DNA total do solo foi extraído e sequenciado na plataforma 454 (*Life Sciences*), resultando em cerca de 1 milhão de sequências por tratamento, que foram analisadas pelos programas MEGAN e STAMP. O domínio Bactéria agrupou a maioria das sequências, sendo várias delas associadas a bactérias dos ciclos do nitrogênio e do carbono e à promoção do crescimento em plantas. Menor quantidade de sequências foi observada para o domínio Archaea, sendo a maioria no tratamento em plantio direto com sucessão de culturas, considerado o manejo mais conservacionista. Conseqüentemente, os representantes desse domínio poderiam ser utilizados como bioindicadores de qualidade do solo, visando o monitoramento do impacto de práticas agrícolas, pois foram sensíveis aos diferentes manejos de solo e das culturas. O domínio Eucarya também apresentou menor número de sequências, a maioria associada ao plantio convencional sob rotação e sucessão de culturas. A maior diversidade de fungos no solo sob plantio convencional pode estar relacionada à maior tolerância a estresses ambientais, pela formação de estruturas de resistência, como os esporos. Grande parte das sequências não foi atribuída a nenhum domínio, não apresentando similaridade com nenhuma sequência depositada nos bancos de dados do NCBI. Dessas, a maioria foi proveniente do solo sob plantio direto em rotação e sucessão de culturas, indicando que sistemas conservacionistas de solo guardam maior riqueza de microrganismos e genes desconhecidos. A abordagem metagenômica confirmou que cada um dos sistemas diferiu em termos de biodiversidade microbiana, com várias ordens diferindo estatisticamente entre os tratamentos. Os maiores efeitos foram associados ao manejo do solo e, em menor grau, ao manejo das culturas.

Palavras-chave: Metagenômica shotgun. Biodiversidade microbiana do solo. Metagenômica do solo. Biodiversidade estrutural. Manejo do solo. Manejo das culturas. Plantio direto.

SOUZA, Renata Carolini. **Metagenomics of a soils under no-tillage and conventional tillage with crop rotation and succession in the north of Paraná State, Brazil**. 2012. Dissertation (master on Microbiology)- Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

ABSTRACT

Soil management systems used for grain cropping In Brazil are mainly no-tillage (sowing directly on crop residues without soil disturbance) and conventional tillage (traditional practices of plowing and harrowing before sowing), in general combined with crop succession or rotation. It's known that there is a great diversity of soil microorganisms, but limitations in traditional culture techniques under laboratory conditions restrict the evaluations to a very small percentage of microorganisms. However, the establishment of metagenomics comprising molecular tools independent of cultivation, has revealed a large amount of non-cultivable soil microorganisms. In this study, soil samples were collected at the 0-10 cm depth of soil layer in a long-term studies conducted at the experimental station of Embrapa Soja. Treatments consisted of areas under no-tillage and conventional tillage established 14 years ago, with crop succession (soybean/wheat, summer/winter) or rotation (soybeans, lupins, maize, wheat and oats), resulting in four treatments, each one with four replicates. Eight single samples were taken from each plot and, after checking the homogeneity based on the analysis of the DNA by the DGGE method, were pooled for each treatment. Total DNA was extracted soil and sequenced in the 454 platform (*Life Sciences*), resulting in about 1 million sequences per treatment, which were analyzed by using the programs MEGAN and STAMP. The Bacteria domain grouped the majority of the sequences, with several orders associated with the cycles of carbon and nitrogen and to the plant growth promotion capacity. Fewer sequences were observed for the Archaea domain, and most were associated with the no-tillage system in crop rotation, considered as the most conservationist system. Therefore, the representatives of this domain could be used as bioindicators of soil quality to monitor the impact of agricultural practices, as they were the most sensitive to different soil and crop managements. The Eucarya domain showed also shown small number of sequences, the majority in the conventional tillage under crop rotation and succession. The greatest diversity of fungi in the soils under conventional tillage may be related to an increased tolerance to environmental stresses, including the formation of structures of resistance, the spores. Many sequences were not assigned to any domain, showing no similarity to any sequence deposited in the NCBI database. From these sequences, the majority came from the no-tillage system under crop succession or rotation, indicating that conservating, systems keep high richness of unknown microorganisms and genes. The metagenomics approach confirmed that microbial biodiversity was different in each one of the four studied systems, with several orders showing statistical difference between treatments. The highest effects were attributed to the soil management and, to a lesser degree, to the crop management.

Keywords: Environmental shotgun sequence (ESS), soil microbial biodiversity. Soil metagenomics. Structural biodiversity. Soil management. Crop management. No-tillage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Construção e triagem de biblioteca metagenômica a partir de amostras ambientais (Handelsman, 2004)21
- Figura 2** - Amostragem do solo utilizando um trado tipo holandês. Os círculos vermelhos representam os oito pontos de coleta dentro de uma parcela com 15 m de comprimento por 8 m de largura..... 30
- Figura 3** - DNA total extraído de amostras do solo em gel de agarose a 1%. PC: plantio convencional; PD: plantio direto; R: rotação (soja, milho, tremoço, trigo e aveia) e S: sucessão (soja e trigo).....33
- Figura 4** - Resumo esquemático do sequenciamento na plataforma 454. (a) O DNA genômico é isolado, fragmentado e ligado a adaptadores; (b) Um único tipo de fragmento é ligado a uma micro-esfera que é capturada pelas micelas onde ocorre a PCR de emulsão; (c) As microesferas com as sequências ligadas são colocadas no suporte de sequenciamento, cada uma em um poço. O pirosequenciamento é baseado na detecção de luz emitida a cada base incorporada, em cada poço..... 36
- Figura 5** - Fluxo de processamento MEGAN (Huson et al., 2007)38
- Figura 6** - Curvas de rarefação para o nível taxonômico de espécie das amostras metagenômicas de solo sob plantio direto e convencional em rotação e sucessão de culturas, geradas pelo programa MEGAN. Plantio direto com sucessão de culturas (PDS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-verde); plantio convencional com rotação de culturas (PCR-roxo).....40
- Figura 7** - Árvore comparativa de quatro amostras metagenômicas do solo, gerada com o programa MEGAN. Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo). O diâmetro do círculo é proporcional à quantidade de sequências41

- Figura 8** – Árvore comparativa do Domínio Bacteria gerada pelo programa MEGAN, indicando a classificação em nível de Filo. Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo). O diâmetro do círculo é proporcional à quantidade de sequências 42
- Figura 9** - Abundância das classes do Filo Proteobacteria nos quatro sistemas de manejo, segundo análise gerada pelo programa MEGAN. Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo) 43
- Figura 10** - Abundância das ordens da classe Alfareobacteria presentes nos quatro sistemas de manejo gerada pelo programa MEGAN. Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo)..... 44
- Figura 11** - Abundância das ordens da classe Betaproteobacteria presentes nos quatro sistemas de manejo gerada pelo programa MEGAN. Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo)..... 45
- Figura 12** - Abundância das ordens da classe Deltaproteobacteria presentes nos quatro sistemas de manejo gerada pelo programa MEGAN. Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo)..... 46
- Figura 13** - Abundância das ordens da classe Gammaproteobacteria presentes nos quatro sistemas de manejo gerada pelo

	programa MEGAN. Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio convencional com sucessão de 7 culturas (PCS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo).....	47
Figura 14 -	Abundância das ordens do filo Actinobacteria presentes nos quatro sistemas de manejo gerada pelo programa MEGAN. Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo).....	48
Figura 15 -	Abundância das ordens do filo Acidobacteria presentes nos quatro sistemas de manejo gerada pelo programa MEGAN. Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo).....	49
Figura 16 -	Abundância dos principais filos do Domínio Bacteria presentes nos quatro sistemas de manejo gerada pelo programa MEGAN. Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo).....	50
Figura 17 -	Árvore comparativa do Domínio Archaea com nível de classificação de filos nos quatro sistemas de manejo, gerada pelo programa MEGAN. Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo). O diâmetro do círculo é proporcional à quantidade de sequências.....	51
Figura 18 -	Abundância das classes do filo Euryarchaeota presentes nos quatro sistemas de manejo gerada pelo programa MEGAN. Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho);	

- plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul);
 plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio
 direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo).....52
- Figura 19** - Árvore comparativa do Domínio Eucarya com nível de
 classificação de filós gerada pelo programa MEGAN. Plantio
 convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio
 convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio
 direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com
 sucessão de culturas (PDS-amarelo). O diâmetro do círculo é
 proporcional à quantidade de sequências53
- Figura 20** - Abundância das classes do filo Ascomycota presentes nos
 quatro sistemas de manejo gerada pelo programa MEGAN.
 Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho);
 plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul);
 plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio
 direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo).....54
- Figura 21** - Árvore comparativa da composição viral, com nível de
 classificação de família gerada pelo programa MEGAN. Plantio
 convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio
 convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio
 direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com
 sucessão de culturas (PDS-amarelo). O diâmetro do círculo é
 proporcional à quantidade de sequências. 55
- Figura 22** - Agrupamento com base na matriz de distância euclidiana
 gerada pelo programa MEGAN pelo método de clusterização
 hierárquica UPGMA, a partir das sequências de DNA de
 amostras de solo submetido aos sistemas de manejo. Plantio
 convencional em rotação de culturas (PCR), plantio
 convencional em sucessão de culturas (PCS), plantio direto em
 sucessão de culturas (PDS) e plantio direto em rotação de
 culturas (PDR)56
- Figura 23** - Diferenças significativas entre as ordens de microrganismos
 presentes nos solos sob os manejos de cultura rotação e
 sucessão em plantio direto. O gráfico da esquerda mostra a

proporção de sequências atribuídas, enquanto que o gráfico da direita mostra a significância da diferença entre as proporções com intervalo de confiança de 95% gerado pelo programa STAMP. Plantio direto com rotação de culturas (PDR-azul) e plantio direto com sucessão de culturas (PDS-laranja) 58

Figura 24 - Diferenças significativas entre as ordens de microrganismos presentes nos solos sob os manejos de plantio direto em rotação de culturas com plantio convencional em rotação de culturas. O gráfico da esquerda mostra a proporção de sequências atribuídas, enquanto que o gráfico da direita mostra a significância da diferença entre as proporções com intervalo de confiança de 95% gerado pelo programa STAMP. Plantio direto com rotação de culturas (PDR-azul) e plantio convencional com rotação de culturas (PCR-laranja) 59

Figura 25 - Diferenças significativas entre as ordens de microrganismos presentes nos solos sob os manejos de plantio convencional em sucessão de culturas com plantio direto em sucessão de culturas. O gráfico da esquerda mostra a proporção de sequências atribuídas, enquanto que o gráfico da direita mostra a significância da diferença entre as proporções com intervalo de confiança de 95% gerado pelo programa STAMP. Plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul) e plantio direto com sucessão de culturas (PDS-laranja) 61

Figura 26 - Diferenças significativas entre as ordens de microrganismos presentes nos solos sob os manejos de cultura sucessão e rotação em plantio convencional. O gráfico da esquerda mostra a proporção de sequências atribuídas, enquanto que o gráfico da direita mostra a significância da diferença entre as proporções com intervalo de confiança de 95% gerado pelo programa STAMP. Plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul) e plantio convencional com rotação de culturas (PCR-laranja) 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistema de manejo do solo, rotação e sucessão de culturas adotadas no período de 2003 a 2010	29
Tabela 2 - Propriedades químicas do solo na camada de 0-10 cm, na área do ensaio conduzido em Londrina, PR.	31

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVO	15
2.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1.	SOLO	16
3.2.	DIVERSIDADE MICROBIANA DO SOLO.....	17
3.3.	METAGENÔMICA	20
3.4.	EXTRAÇÃO DE DNA.....	24
3.5.	TECNOLOGIAS DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO.....	25
3.6.	FERRAMENTAS COMPUTACIONAIS PARA ESTUDOS METAGENÔMICOS.....	26
4.	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1.	Amostragem de Solo	29
4.2.	Extração de DNA Genômico Total do Solo	31
4.3.	Quantificação do DNA Extraído	32
4.4.	Repetibilidade Entre Amostras.....	33
4.5.	Sequenciamento do DNA na Plataforma 454 Life Sciences	34
4.6.	Análise das Sequências Usando o Programa Megan	36
4.7.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
5.	RESULTADOS	39
5.1.	DADOS GERAIS DOS METAGENOMAS OBTIDOS	39
5.1.1.	Sequências Obtidas.....	39
5.1.2.	Curvas de Rarefação	39
5.2.	DIVERSIDADE MICROBIANA NOS DIFERENTES MANEJOS.....	40
5.2.1.	Diversidade Microbiana pela Análise de Dados Normalizados	40
5.2.2.	Composição Microbiana e Funcionalidades nos Diferentes Domínios	42
5.2.2.1.	Domínio Bactéria	42
5.2.2.2.	Domínio Archaea	51
5.2.2.3.	Domínio Eucarya	52
5.2.2.4.	Vírus	54
5.2.3.	Diversidade Avaliada pela Distância Euclidiana	55
5.3.	COMPARAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS DE MANEJO DO SOLO E DAS CULTURAS.....	56
5.3.1.	Análise Estatística entre os Sistemas de Manejo	56
6.	DISCUSSÃO	62
7.	OBSERVAÇÕES FINAIS	69
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
	ANEXOS	85

1. INTRODUÇÃO

O solo é um ambiente complexo devido a diversas características, como conteúdo de água, pH, variações climáticas e atividade biótica, bem como pela textura e estrutura, que são determinados pelo conteúdo de areia, silte, argila e matéria orgânica e a organização dessas partículas em micro e macroagregados (Robe *et al.*, 2003). É também um ambiente rico em comunidades de microrganismos (Amann *et al.*, 1995), que participam de atividades críticas como os ciclos biogeoquímicos e processos de decomposição. As formas de uso do solo podem causar impactos nessas comunidades e alterar suas características. Em solos agrícolas é comum práticas de manejos conhecidos como plantio direto e plantio convencional. O plantio direto se caracteriza pela semeadura diretamente sobre os restos da cultura anterior, sem o revolvimento do solo com grade ou arado. No plantio convencional, antes da semeadura realiza-se o revolvimento do solo, o que deixa sua superfície desprotegida contra erosão, flutuações térmicas e hídricas. Por sua vez, a cobertura vegetal também influencia na comunidade microbiana. A monocultura, assim como a simples sucessão de culturas (isto é, as mesmas culturas de verão e de inverno por anos consecutivos), podem prejudicar o solo e favorecer ao estabelecimento de patógenos. Por sua vez, a rotação de culturas aumenta a diversidade de resíduos que retornam ao solo, o que também pode favorecer a diversidade microbiana do solo, além de interromper o ciclo de pragas e patógenos.

Microrganismos estão presentes praticamente em todos os ambientes do solo, em água doce e salgada, além de tecidos de animais e plantas. Por muito tempo, a descrição de espécies ou táxons, e o isolamento de enzimas e produtos antimicrobianos pelos microbiologistas têm sido realizados com base em isolamento de culturas puras em meio artificial em laboratório (Rodríguez-Valera, 2002). Essa técnica, porém, não é muito confiável e apropriada, pois não permite o crescimento da maioria dos microrganismos. Isso porque, mesmo tentando imitar as condições naturais de algum ambiente, o meio de cultura não fornece condições para o crescimento de muitas espécies, devido a que, no ambiente natural, essas espécies estão submetidas, por exemplo, a interações com outros microrganismos, com partículas do solo, sofrendo alterações de temperatura, pH, luminosidade, tensão de oxigênio etc. Devido a essa limitação de crescimento, a descoberta de novas

espécies de microrganismos ou de novos produtos metabólicos pelo crescimento em meio de cultura torna-se mais difícil, pois a chance de já terem sido isolados anteriormente é maior, uma vez que aqueles que conseguem crescer, provavelmente já foram isolados.

Em 1998, uma pesquisadora americana, Dra. Jo Handelsman, usou pela primeira vez o termo metagenômica, que consiste no uso de técnicas moleculares independentes de cultivo para a análise do metagenoma total de uma determinada amostra (Handelsman *et al.*, 1998). Por essa técnica, o DNA é extraído diretamente da amostra, clonado em um vetor apropriado e transformado em uma célula hospedeira, produzindo bibliotecas onde será feita a triagem, que pode ser funcional ou de sequências. Entretanto, atualmente a metagenômica pode ser realizada com o emprego das novas tecnologias de sequenciamento a partir da extração do DNA total com posterior emprego de programas de bioinformática para análise das sequências. Com o uso da metagenômica é possível determinar a diversidade e a atividade de comunidades, vias metabólicas, microrganismos ou genes específicos (Steele & Streit, 2005). A análise metagenômica pode ser empregada em estudos em ambientes diversos, como por exemplo, o intestino humano ou animal (Guan *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2010), água doce e salgada (Venter *et al.*, 2004; Cottrell *et al.*, 2005), biofilmes (Schmeisser *et al.*, 2003; Tyson *et al.*, 2004), solos (Buckley & Schmidt, 2003; Riesenfeld *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2009;) e sedimentos (Couto *et al.*, 2010).

A análise funcional é baseada no metabolismo de clones, onde uma substância de interesse é produzida e secretada, como por exemplo, novos antibióticos e enzimas. Enquanto que a análise da sequência envolve o sequenciamento completo de clones ou o sequenciamento aleatório guiado pela identificação de marcadores filogenéticos (Handelsman, 2004), para identificação de genes ou vias metabólicas.

Atualmente, para análises de diversidade de comunidades microbianas do solo, existem algumas técnicas baseadas em PCR, como por exemplo, o DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). No entanto, a utilização exclusiva dessas técnicas nem sempre representa uma imagem completa e acurada das comunidades presentes no solo. Sequências publicadas do gene ribossomal 16S representam uma pequena fração da diversidade total dos microrganismos. No entanto, a metagenômica shotgun permite acessar a diversidade microbiana total de uma

amostra quantitativa e qualitativamente, além de examinar a genômica funcional de seus membros. Isso é importante, por exemplo, em estudos de solos agrícolas submetidos a diversos manejos de solo e das culturas e para melhor compreender os efeitos dessas práticas na diversidade e na funcionalidade da comunidade microbiana nesses agroecossistemas. Teoricamente, o plantio direto sob rotação de culturas possui condições mais favoráveis ao ambiente edáfico, e pode conter maior quantidade e diversidade de microrganismos, ao contrário do plantio convencional sob sucessão de culturas. Isso porque o plantio direto apresenta melhores condições ambientais e edáficas para a maioria dos microrganismos, incluindo estrutura do solo, umidade e temperatura. O conhecimento da diversidade nesses sistemas de manejo do solo pode fornecer informações mais abrangentes sobre a organização e a função das comunidades microbianas, possibilitando encontrar, por exemplo, microrganismos indicadores de qualidade do solo.

2. OBJETIVO

Estudar o metagenoma de microrganismos do solo em um ensaio de longa duração conduzido sob plantio direto e plantio convencional em rotação e sucessão de culturas em uma área experimental da Embrapa Soja.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Por meio de técnicas moleculares, identificar diversidade genética de microrganismos ainda não cultiváveis pelas técnicas padrão de cultivo em laboratório.
- Conhecer a biodiversidade e as potencialidades biotecnológicas dos microrganismos nos solos sob diferentes condições de manejo do solo e das culturas.
- Comparar comunidades microbianas de solos sob sistema de plantio direto e convencional em rotação e sucessão de culturas e inferir sobre a sustentabilidade dos diferentes sistemas de manejo, usando a diversidade de microrganismos do solo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. SOLO

O solo é um recurso natural vital para o funcionamento dos ecossistemas terrestres, constituído de fase sólida (minerais e matéria orgânica), líquida (solução do solo), gasosa (ar) e da biota composta pela fauna e pelos microrganismos, como as bactérias fixadoras de N_2 e os fungos micorrízicos. Esses componentes podem ser encontrados em diferentes proporções, dependendo de fatores como tipo de solo e manejo, cujo equilíbrio é fundamental para a sustentabilidade dos sistemas de produção (Hungria, 2000). Atenção especial é necessária para a conservação das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, bem como para as diversas comunidades microbianas nele existentes, que podem ser profundamente impactadas pelas práticas agrícolas, como por exemplo, pela utilização inadequada de fertilizantes, agrotóxicos e manejos equivocados (Pereira *et al.*, 2000), causando, por exemplo, alterações na aeração, na disponibilidade de nutrientes no solo (Pereira *et al.*, 1999) e conseqüente diminuição no crescimento das plantas. Essas atividades antrópicas podem afetar o funcionamento e diminuir a biodiversidade, resultando em desequilíbrios ecológicos de conseqüências imprevisíveis, podendo chegar até na extinção de espécies essenciais à manutenção desse ecossistema (Brown *et al.*, 2002; FAO, 2012).

Sistemas conservacionistas de manejo do solo como o plantio direto, se caracterizam pela semeadura sobre os resíduos vegetais da cultura anterior, sem aração ou gradagem, com o intuito de conservar o solo, diminuir os custos e o tempo de preparo, o tempo de colheita da safra anterior e a semeadura da safra seguinte e, também, de aumentar a produtividade das culturas (Inoue, 2003). A permanência dos restos culturais na superfície protege o solo contra a erosão, aumenta a retenção de água, mantém a permeabilidade tornando mais favoráveis as condições de temperatura e de umidade, além de permitir maior teor de matéria orgânica e melhores condições físicas (Valpassos *et al.*, 2001). É na camada superficial do solo que ocorre maior atividade biológica. Contudo, essa é justamente a camada mais sensível a fatores como a exposição aos processos erosivos, com remoção de solo e seus nutrientes por lixiviação, devido ao uso e/ou manejo inadequados, provocando redução de sua qualidade (Alvarenga *et al.*, 1999) e na biomassa microbiana (Carter, 1986). O plantio direto é uma prática comum em mais de 117

milhões de hectares em todo o mundo, dos quais 48% é na América do Sul (FAO, 2012). O Brasil é referência mundial com mais de 25,5 milhões de hectares, o que deverá aumentar para 33 milhões nos próximos dez anos (FEBRAPDP, 2012).

No plantio convencional, ocorre a utilização intensiva de máquinas e implementos agrícolas para o revolvimento, o que leva à desestruturação do solo (Bettiol *et al.*, 2002), com grande índice de compactação, dificultando ou até impedindo a penetração das raízes à procura de nutrientes e água, a infiltração da água das chuvas, que acabam escorrendo superficialmente e carregando a parte mais fértil por erosão, resultado da falta de cobertura na superfície do solo, o que a deixa desprotegida. Dessa forma, o solo permanece suscetível a flutuações térmicas e hídricas, favorecendo também os patógenos. Segundo Hungria (2000), o sistema de plantio direto favorece, em relação ao plantio convencional, a biota do solo. Além de proporcionar maior biomassa microbiana de carbono e nitrogênio (Kaschuk *et al.*, 2010), apresenta menor coeficiente metabólico, o que representa menor perda de carbono por unidade de biomassa microbiana (Balota *et al.*, 1998).

Em solos agrícolas, a monocultura ou o sistema de sucessão de culturas contínuo (por exemplo, de soja no verão e trigo no inverno) provoca a degradação do solo, influencia negativamente o desenvolvimento microbiano, além de favorecer o desenvolvimento de doenças, de pragas e de plantas daninhas. Já no sistema de rotação de culturas, há uma melhoria no controle de doenças, pela quebra do ciclo dos patógenos com a diversificação das espécies vegetais, diminuindo a presença de hospedeiros específicos, além de ser importante na manutenção ou aumento da biodiversidade. A rotação de culturas, associada ao manejo correto do solo faz com que este seja biologicamente mais ativo e com maior potencial produtivo (Cattelan *et al.*, 1997). Assim, práticas de preparo do solo, de manejo de plantas e de adubação causam modificações mensuráveis na biomassa microbiana, que atua como reservatório de nutrientes que podem ser disponibilizáveis às plantas (Marchiori-Junior & Melo, 1999).

3.2. DIVERSIDADE MICROBIANA DO SOLO

A grande maioria da vida na terra é microbiana. Nos solos, os microrganismos compreendem as arqueobactérias, bactérias, fungos, microalgas e, protozoários e, embora não sejam considerados microrganismo, partículas virais também fazem parte dessa diversidade.

O solo é um importante reservatório de diversidade microbiana (Curtis *et al.*, 2002). Amann e colaboradores (1995) sugerem que um grama de solo contém cerca de 10 bilhões de procariotos pertencentes a milhares de espécies redundantes, sendo o grupo mais numeroso da biota do solo. Os procariotos estão envolvidos em processos importantes no solo, como por exemplo, a fixação biológica de nitrogênio (Hungria & Vargas, 2000), a supressão de doenças (Keel *et al.*, 1992), a decomposição da matéria orgânica (Boehm *et al.*, 1993), a ciclagem de nutrientes (Arrigo, 2005), a promoção de crescimento em plantas (Compant *et al.*, 2005), dentre outros. Essa enorme variedade de processos resulta em uma grande capacidade dos microrganismos em se adaptar e habitar todos os ambientes, desde águas termais até solos extremamente ácidos, devido a sua diversidade fisiológica e metabólica (Steele & Streit, 2005). Os fungos desempenham funções importantes, como sua atividade heterotrófica sobre o material orgânico, controle biológico de patógenos, além de relações simbióticas mutualísticas, como é o caso das micorrizas (Barea *et al.*, 2002), entre outras. As algas contribuem para a incorporação de carbono ao solo e, assim como os fungos, auxiliam na estabilização dos agregados no solo (Starks *et al.*, 1981). Os vírus estão presentes em grande número no solo, em quantidade que supera até a de procariotos, com valor estimado em mais que 10^{30} na biosfera (Brussow & Hendrix, 2002). Já os protozoários são predadores bacterianos e alguns são capazes de promover o crescimento em plantas (Bonkowski, 2004). Estima-se que um grama de solo contenha 100 mil protozoários (Findlay *et al.*, 2000). Existem estudos que supõem que os vírus, assim como os protozoários, auxiliem no controle de populações de bactérias (Swanson *et al.*, 2009).

A microbiologia ambiental estuda a composição e fisiologia das comunidades microbianas no ambiente (solo, água, ar ou sedimentos). No solo, a grande diversidade de microrganismos presentes, atuam em conjunto no funcionamento e no equilíbrio do ecossistema (Buckley & Schmidt, 2003), como na maioria dos ciclos biogeoquímicos, na cadeia alimentar, em processos de decomposição onde os resíduos de animais e plantas são degradados e incorporados como matéria orgânica, podendo liberar nutrientes após sua mineralização. Essa diversidade é sensível a alterações ambientais, como a utilização inadequada do solo. Nesse contexto, o conhecimento da diversidade

microbiana associada aos diferentes manejos agrícolas pode contribuir para o entendimento da qualidade do solo, e para a sustentabilidade dos agroecossistemas, além de possibilitar identificar novas espécies e substâncias de interesse biotecnológico.

Franchini et al. (2007) realizaram um estudo em solos com 10 anos de cultivo sob plantio direto e convencional em rotação de culturas, e observaram que a biomassa microbiana de carbono e de nitrogênio eram maiores em plantio direto em relação ao plantio convencional e, também, com maior eficiência metabólica microbiana (menor quociente metabólico). Esses parâmetros não foram afetados pelo manejo de culturas. Outros trabalhos, desenvolvidos também no norte do Paraná, mostraram resultados semelhantes em solos manejados há 14 anos sob plantio direto (Hungria *et al.*, 2009). Em outros estudos também foi relatado que a prática do plantio direto favorece ao aumento no teor de matéria orgânica (Balota *et al.*, 1998) e a diversidade genética da comunidade bacteriana do solo (Pereira *et al.*, 2007).

A diversidade genética nem sempre está relacionada com a funcionalidade. Às vezes, a abundância relativa de microrganismos pode se dar pela propagação de uma única espécie, ou poucas. Desse modo, um microrganismo presente em maior número em um hábitat, pode resultar em menor diversidade genética, porém com estirpes provavelmente mais eficientes em desempenhar suas funções (Pereira *et al.*, 2007; Youssef & Elshahed, 2009). Entretanto, a qualidade do solo nos sistemas de plantio direto pode estar relacionada a uma mudança na estrutura da comunidade microbiana do solo (Hungria *et al.*, 2009).

Os estudos de diversidade microbiana sempre foram vistos como um desafio. Descrever a diversidade de comunidades microbianas no solo, assim como suas funções, exige o desenvolvimento de metodologias cada vez mais avançadas, pois fatores como chuvas, temperaturas extremas, manejo inadequado do solo, presença de animais e plantas podem causar mudanças no solo que resultam em alterações na microbiota. Os estudos de diversidade ganharam ainda maior destaque após a introdução de metodologias moleculares, baseadas na amplificação pela PCR (Polymerase Chain Reaction) de regiões conservadas do genoma, como o DNA que codifica para os genes RNA ribossomais 16S ou 18S e, também a região ITS, nas quais se baseiam os princípios atuais de filogenia e taxonomia.

Por muito tempo os microbiologistas têm usado técnicas de cultivo em laboratório para isolar microrganismos de diferentes ambientes. No entanto, essa metodologia tem se demonstrado limitada devido à baixa capacidade de crescimento da maioria dos microrganismos. Somente cerca de 0,1% a 1% dos microrganismos do solo são cultiváveis por práticas padrões de laboratório (Torsvik *et al.*, 1990; Amann *et al.*, 1995), indicando que os outros 99% representam espécies desconhecidas ou não identificadas que poderiam compor novos filos e/ou domínios. Além disso, pode ser possível que muitas espécies do solo tenham sido ou estão sendo perdidas antes mesmo de serem estudadas (Beare *et al.*, 1995). Isso impede o melhor conhecimento da estrutura das comunidades microbianas do solo, bem como entender como essas populações respondem às alterações no seu ambiente (Buckley & Schmidt, 2003), e o equilíbrio biológico criado pelas associações e interações entre os indivíduos encontrados na comunidade. Mesmo tentando imitar as condições naturais no meio de cultura, existem fatores que inibem o crescimento de células (pH, temperatura, umidade, etc.) e efeitos dos microhabitats nas condições de vida microbiana (Rodríguez-Valera, 2002).

Estudos recentes passaram a explorar a diversidade microbiológica do ambiente por técnicas independentes de cultivo (Venter *et al.*, 2004). A caracterização dos microrganismos não cultiváveis, utilizando-se de métodos moleculares e análises filogenéticas a partir de sequências de DNA, é uma forma de identificar e conhecer suas distribuições e funções no ambiente. A partir disso, pode-se também procurar novos genes, vias metabólicas completas e seus produtos.

3.3. METAGENÔMICA

A metagenômica pode ser definida como a análise funcional e das sequências nucleotídicas do metagenoma coletivo de uma microbiota encontrada em determinada amostra ambiental, através da combinação de técnicas moleculares independentes de cultivo (Handelsman *et al.*, 1998).

O termo metagenômica foi proposto em 1998 pela pesquisadora Jo Handelsman trabalhando com diversidade de microrganismos do solo (Handelsman *et al.*, 1998). No entanto, apenas se tornou popular com a publicação do trabalho do pesquisador Craig Venter e colaboradores, em 2004, em um estudo de metagenômica de água do mar (Mar de Sargasso) e no qual encontrou 1,2 milhão de genes e 148 novos filotipos bacterianos (Venter *et al.*, 2004). Uma forma de

estudo metagenômico consiste na extração do DNA total de um ambiente, na clonagem em um vetor apropriado, que pode ser um plasmídeo (se o inserto for menor que 15 kb), cosmídeo e foscídeo (se o inserto for menor que 40 kb) ou cromossomo bacteriano artificial (se o inserto for maior que 40 kb) e, depois, na transformação em um hospedeiro cultivável (geralmente a bactéria *Escherichia coli*), produzindo bibliotecas para análise metagenômica com base na função e/ou em sequências genéticas (Fig. 1). Entre esses vetores, os plasmídeos, devido ao seu tamanho reduzido, são úteis apenas para pesquisar novas funções metabólicas codificadas por um gene ou pequenos *operons*, como a maioria das enzimas. Contudo, os plasmídeos não são adequados para pesquisar vias metabólicas grandes, como as vias biossintéticas, sendo mais indicado, neste caso, o uso de cosmídeos, foscídeos ou BACs.

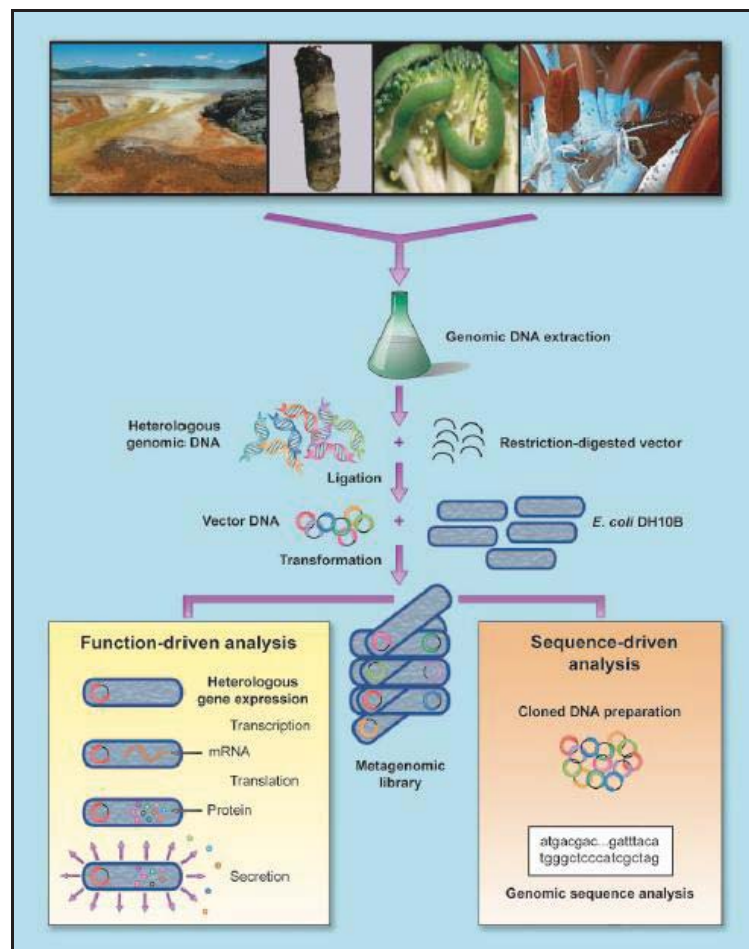


Figura 1 – Construção e triagem de biblioteca metagenômica a partir de amostras ambientais (Handelsman, 2004).

Teoricamente, uma biblioteca metagenômica possui os clones representando a amostra, porém isso vai depender da eficiência dos métodos de extração de DNA, clonagem e sequenciamento que são as fontes dos vieses em um protocolo de metagenômica do tipo *shotgun*.

Após a obtenção da biblioteca metagenômica, são realizadas as triagens funcionais e baseadas em sequências. A análise baseada na função é feita com base na atividade metabólica, com a identificação de clones que expressam uma marca desejada, conferida ao hospedeiro pelo DNA clonado (Schloss & Handelsman, 2003) e não necessita de conhecimento prévio da sequência. Triagens de alto desempenho podem ser usadas quando funções de interesse não fornecem base para a seleção dos clones na biblioteca e é a abordagem mais eficiente de detecção. Em geral, é realizado o teste direto das colônias para uma função específica, como por exemplo, a presença de substratos ou indicadores no meio de crescimento, que permitem a distinção de características de clones ativos através da presença de halo ao redor da colônia ou alteração da cor do meio de cultura (Handelsman, 2004); ensaios de resistência a moléculas específicas; ou o uso de estirpes hospedeiras ou estirpes hospedeiras mutantes que requerem complementação heteróloga para o crescimento sob condições seletivas (Daniel, 2004). Outro método usado é o chamado de “triagem da expressão de genes induzidos pelo substrato” ou SIGEX, desenvolvido por Uchiyama *et al.* (2005) com o uso da proteína verde fluorescente (GFP). Esse método permite uma forma rápida de identificação de novas vias catabólicas de microrganismos não cultiváveis (Handelsman, 2005). Essa abordagem possui um grande potencial para identificação de clones codificadores de novos genes para antibióticos, enzimas de degradação e resistência a antibióticos, com aplicação potencial na medicina, agricultura, indústria farmacêutica ou de alimentos. Contudo, é muito difícil conseguir isolar um produto funcional, pois a frequência de clones metagenômicos que expressam uma dada atividade é baixa (Handelsman, 2004). Por exemplo, em uma pesquisa para seleção de clones produtores de novas lipases a partir de sedimento de mangue na costa sul do Brasil, somente 1 em cada 2400 clones apresentou atividade (Couto *et al.*, 2010). Isso acontece porque existem alguns fatores limitantes, como a dificuldade de expressão heteróloga de genes em célula hospedeira, a baixa probabilidade de obtenção de fragmentos grandes de DNA contendo operons ou vias extensas e a baixa disponibilidade de estratégias de alto

desempenho para a triagem funcional (Daniel, 2005). Além disso, para o sucesso das triagens é necessária uma transcrição e tradução fiel do gene ou de genes de interesse e a secreção do produto gênico pelo hospedeiro (Handelsman, 2004).

A análise baseada em sequências de DNA tem como princípio a procura de diferentes sequências alvos de nucleotídeo para a triagem metagenômica de clones da biblioteca através de sondas de hibridização ou PCR (Lorenz & Schleper, 2002), não dependendo da expressão de clones em hospedeiros. Contudo, ambos necessitam de *primers* e sondas para regiões gênicas conhecidas, o que limita a identificação de novos genes e, além disso, somente os genes que apresentam similaridade com aqueles já conhecidos, que estão depositados em banco de dados, podem ser identificados.

Atualmente, com o surgimento de novas tecnologias de sequenciamento e o intenso desenvolvimento de *pipelines* de bioinformática, a metagenômica pode seguir um caminho diferente, com maior precisão, rapidez e baixo custo. Essa abordagem, metagenômica *shotgun*, pode ser realizada a partir da extração do material genético total de uma amostra, sendo submetido diretamente ao sequenciamento de segunda ou terceira geração e, em seguida, à análise das sequências obtidas em programas de bioinformática. Entretanto, não são considerados estudos metagenômicos verdadeiros aqueles que utilizam a PCR associada a bibliotecas de clones a partir de um único gene evolutivamente conservado como os genes ribossomais (Kakirde; Parsley; Liles, 2010). A metagenômica está associada ao estudo do metagenoma total de uma amostra, ou seja, de todos os possíveis genes, havendo possibilidade de triagens dirigidas para genes e funções. Procariotos, eucariotos e vírus fazem parte do metagenoma de todas as amostras e, na maioria das vezes, os vírus são os constituintes mais abundantes (Brussow & Hendrix, 2002). Dessa forma, o estudo metagenômico a partir de um gene evolutivamente conservado não se encaixa para os vírus, ainda mais que não existe ainda um gene marcador para estas partículas. Portanto, não cabe ao estudo metagenômico o emprego de apenas um gene em toda amostra, pois imensa parte do metagenoma deixaria de ser representado.

Mesmo sendo recente, a metagenômica vem despertando o interesse em muitos pesquisadores frente às possíveis aplicações biotecnológicas dos microrganismos. As aplicações biotecnológicas da metagenômica não são limitadas apenas à identificação de novas substâncias, mas também é possível encontrar

microrganismos bioindicadores de qualidade e sequências para produção de *primers* e sondas. Devido à importância da metagenômica, cada vez mais algoritmos, ferramentas de bioinformática, *pipelines* de análise de sequenciamento e banco de dados vêm sendo explorados, visando tornar possível a análise de grandes quantidades de dados metagenômicos.

3.4. EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA de uma amostra ambiental permite a obtenção de material biológico sem a necessidade de cultivar microrganismos em meio de cultura, já que a grande maioria não é cultivável. A extração do DNA pode ser mais ou menos eficiente em alguns organismos, dependendo de diferenças, como por exemplo, na estrutura da parede e na membrana da célula (Krsek *et al.*, 1999). Entretanto, uma das etapas mais importantes e críticas para o estudo metagenômico é da extração do DNA. A qualidade da análise metagenômica está diretamente relacionada com a qualidade do DNA usado (Green & Keller, 2006).

Para obtenção do DNA da comunidade microbiana do solo, vários protocolos de extração foram desenvolvidos, inclusive *kits* de extração que estão disponíveis comercialmente, como por exemplo, *SoilMasterTM DNA Extraction Kit* (Epicentre, Madison, WI) e *PowerMaxTM Soil Isolation kit* (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA).

A extração de DNA do solo pode ser baseada em lise direta de células em solos ou sedimentos, seguida pela purificação (Ogram *et al.*, 1987) ou lise indireta, em que primeiramente se realiza a extração de células do solo ou sedimento e posteriormente, realiza-se a lise e purificação do DNA (Holben *et al.*, 1988). Segundo Leveau (2007), no processo da extração existem quatro pontos principais a serem ponderados depois de isolar o DNA: quantidade, pureza, integridade e representatividade da comunidade microbiana da amostra. Na lise direta, são utilizados métodos brutos de forças químicas ou físicas para extração do material genético, garantindo uma grande quantidade de DNA, com maior representatividade da diversidade microbiana da amostra, já que extrai também aquelas células microbianas aderidas às partículas do solo; o DNA, porém, apresenta baixa pureza e integridade. Na lise indireta o DNA recuperado apresenta maior pureza e o tamanho dos fragmentos obtidos são maiores, porém, recupera-se menor quantidade de DNA, com baixa representatividade (Daniel, 2005).

Dependendo do interesse do estudo, o tamanho dos fragmentos de DNA interfere no sucesso da pesquisa. Quando o objetivo é a triagem da biblioteca metagenômica, para a presença de grandes operons envolvidos na produção de diversos compostos ou a procura de âncoras filogenéticas, o fragmento deve ser grande (Leveau, 2007). Contudo, os processos brutos da extração causam fragmentação aleatória excessiva nos fragmentos, podendo interromper genes importantes, o que dificulta a descoberta de muitos genes de interesse.

Um problema da extração de DNA microbiano de solos ricos em matéria orgânica, principalmente na extração direta, é a co-extração de alguns componentes do solo, como ácidos húmicos ou outras substâncias húmicas que interferem negativamente nos processos de hibridização DNA-DNA, na digestão do DNA por endonucleases, na PCR e na transformação em células competentes (Tebbe & Vahjen 1993). A lise indireta confere menor contaminação do material devido à lise das células dos microrganismos ocorrer após sua separação da matriz do solo.

3.5. TECNOLOGIAS DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

Desde o início de 1990, o sequenciamento de DNA foi quase que exclusivamente baseado em capilaridade pelo método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Devido ao surgimento de vários métodos moleculares e ao desenvolvimento de novas estratégias de sequenciamento de DNA, o método de Sanger deixou de ser predominante na obtenção de sequências, principalmente com o surgimento de novas tecnologias de sequenciamento de DNA de alto desempenho. Essas tecnologias são chamadas de sequenciamento de segunda geração e consistem no sequenciamento em arranjos cíclicos, sendo empregados em produtos comerciais desde 2005 (Shendure & Ji, 2008). Entre essas tecnologias estão o sequenciamento 454 GS FLX Life Sciences, comercializado pela Roche Applied Science, o sistema Solexa Genome Analyzer, agora comercializado pelo Illumina Genome Analyzer e a plataforma SOLiD da Applied Biosystems (AB).

Todas essas novas tecnologias possibilitam o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informações muitas vezes superiores à do sequenciamento de Sanger. Milhões de *reads* são gerados sem a necessidade de clonagem em célula hospedeira, evitando os vieses de clonagem (Morgan *et al.*, 2010), com uma grande economia de tempo e custo por nucleotídeo (Harkins & Jarvie, 2007).

O sistema 454 (GS20) foi a primeira plataforma de sequenciamento de nova geração a ser comercializada (Margulies *et al.*, 2005). Baseia-se no método do pirosequenciamento (Ronaghi, 2001) pela síntese da enzima DNA polimerase, produzindo fragmentos de comprimento médio de 200 pb. O modelo atual 454 GS-FLX Titanium obtém sequências de até 500 pb. Outra plataforma também comercializada atualmente é a Solexa Genome Analyzer, em que o método de sequenciamento é semelhante ao do Sanger, realizado por síntese da enzima DNA polimerase com o uso de terminadores químicos reversíveis que emitem fluorescência, gerando de 18-35 Gpb por corrida, com sequências de 75-100 pb. No sistema SOLiD, o sequenciamento é catalisado por uma enzima ligase, e pode gerar de 30-50 Gpb por corrida, com comprimento de 50 pb (Suzuki *et al.*, 2011). O Solexa e o SOLiD podem gerar gigabases de nucleotídeos sequenciados por semana (Paszkiwicz & Studholme, 2010), porém, uma limitação é o tamanho muito curto dos *reads* (Imelfort & Edwards, 2009). No método de Sanger podem ser obtidos *reads* com tamanhos de até 1.000 pb com 99,999% de precisão por base (Shendure & Ji, 2008).

Embora sejam plataformas diversas, os procedimentos para realizar o sequenciamento são semelhantes. Para a preparação da biblioteca é realizada a fragmentação aleatória do DNA, ligação *in vitro* de adaptadores, amplificação e sequenciamento por síntese enzimática de uma polimerase ou uma ligase.

3.6. FERRAMENTAS COMPUTACIONAIS PARA ESTUDOS METAGENÔMICOS

Em estudos metagenômicos, milhares de sequências de DNA são obtidas e usadas, por exemplo, para a análise de biodiversidade das espécies e a bioprospecção *in silico* em amostras de um determinado ambiente. Essa grande quantidade de dados gerados necessita de ferramentas de bioinformática para a análise, processamento e armazenamento. Em estudos de genômica, após a obtenção de sequências, os fragmentos são montados por algoritmos computacionais, como por exemplo, Euler e Velvet (para genomas sequenciados com as plataformas Solid e Solexa) e Newbler (para genomas sequenciados na plataforma 454). Depois são utilizados programas para identificação de genes, como o ORFinder (Rombel *et al.*, 2002) do NCBI e glimmer (Kelley *et al.*, 2011) que procuram quadros abertos de leitura pelo códon de início e fim na sequencia analisada. Outra ferramenta do NCBI é o BLAST (*Basic Local Alignment Search*

Tool) que alinha e compara as sequências depositadas em banco de dados.

Em metagenoma, a montagem dos *reads*, em geral, é feita por programas de montagem de genomas, como por exemplo o Newbler, que vem associado à plataforma de sequenciamento 454. Em 2010 foi criado um programa montador de metagenomas, chamado de Genovo (Laserson *et al.*, 2010), porém ainda não é muito utilizado. Após a montagem é feita a predição de genes. Existe uma ferramenta chamada SMASH que faz a predição dos *reads* após a montagem pelo programa Celera e, também, daqueles *reads* que não foram montados, chamados de *singlet*. Existem outras ferramentas, como por exemplo, MetaGene Annotator (Noguchi *et al.*, 2008), Orphelia (Hoff *et al.*, 2009) e FragGeneScan (Rho *et al.*, 2010), que são treinadas para identificar ORFs (*Open Reading Frame*) e fazem a predição nos *reads*. Outra alternativa consiste do uso de programas que fazem a busca em bancos de dados de proteínas, famílias e domínios conservados. No entanto, pode acontecer de muitas sequências não encontrarem similaridade com sequências depositadas nos bancos de dados. Li & Godzik (2006) desenvolveram um programa chamado CD-HIT, para análise rápida e eficiente da diversidade de sequências para grandes conjuntos de dados metagenômicos, que agrupa (“clusteriza”) as sequências por similaridade, em bancos de domínios e famílias, permite inferir novas famílias as sequências conservadas que não tem similaridade com os dados depositados nos bancos.

Em projetos de metagenomas, além de identificar os microrganismos e os genes sequenciados, é possível comparar o conjunto de dados gerados em diferentes amostras em um tipo de análise chamada de metagenoma comparativa. A metagenômica comparativa estuda relações entre genes, segmentos de cromossomos e sequências proteicas, e é importante para estudos funcionais e evolutivos de comunidades microbianas coletadas em diferentes ambientes. Para este tipo de análise, alguns programas foram desenvolvidos, tais como MEGAN (*Metagenome Analyser*), uma ferramenta que realiza comparação visual e estatística de metagenomas, com estudo da distribuição taxonômica de uma amostra baseado no algoritmo “*Lowest Common Ancestor*”- (LCA) (Harkins & Jarvie, 2007). Outra ferramenta para análise de sequências metagenômicas chama-se CARMA (*Characterizing Short Read Metagenomes*). Este programa baseia-se no banco do PFAM (*Protein Families*) para analisar os dados, procurando famílias e domínios de proteínas conservados (Krause *et al.*, 2008). Outros programas para análises de

sequências metagenômicas são: RAMMCAP (*The Rapid Analysis of Multiple Metagenomes with a Clustering and Annotation Pipeline*) (Li, 2009); Phymm (Metagenomic phylogenetic classification with interpolated Markov models) (Brady & Salzberg, 2009); CAMERA (*Community Cyberinfrastructure for Advanced Marine Microbial Ecology Research and Analysis*) (Seshadri *et al.*, 2007) e MG-RAST (*Metagenome Rapid Annotation using Subsystem Technology*) (Meyer *et al.*, 2008), MetaRep (Goll *et al.*, 2010) e Smash (Arumugam *et al.*, 2010).

Por meio de novas tecnologias, como a bioinformática e técnicas de sequenciamento de alto desempenho, tornou-se possível avaliar o potencial genético de um ambiente tão diverso como o solo, permitindo, entender melhor o funcionamento desse ecossistema e como o manejo pode influenciar a diversidade e o funcionamento microbiano no solo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAGEM DE SOLO

A amostragem de solo foi realizada na área experimental do Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Embrapa Soja), em Londrina/PR, em um ensaio de longa duração estabelecido no verão de 1997/98. A estação está localizada a 23°11'W de latitude e 51°11'S de longitude, com 630 m de altitude. O clima em Londrina é classificado como subtropical úmido, *Cfa*, de acordo com a classificação de Köppen. Em um período de 20 anos, a temperatura média anual em Londrina foi de 21,0°C, com a temperatura média máxima de 28,5°C em fevereiro e mínima de 13,3°C em julho. A precipitação pluviométrica anual é de 1.651 mm, com janeiro sendo o mês mais chuvoso (217 mm) e agosto o mês mais seco (60 mm). Em novembro de 2010, mês da amostragem, a temperatura média máxima foi de 28,2°C e a mínima de 16,9°C, a pluviosidade de 2,7 mm, com 22 MJ/m² de radiação solar.

O ensaio está estabelecido em um Latossolo Vermelho Eutroférico (classificação brasileira), ou Rhodic Eutrudox (classificação americana). O delineamento experimental do ensaio é em blocos inteiramente casualizados com quatro repetições, em parcela com 15 m de comprimento por 8 m de largura. Os tratamentos consistem do manejo do solo sob plantio direto e plantio convencional, cada um em sucessão (soja no verão e trigo no inverno) ou rotação de culturas (com as culturas soja, trevoço, milho, trigo e aveia). Nos últimos sete anos as rotações utilizadas constam na tabela 1.

Tabela 1 - Sistema de manejo do solo, rotação e sucessão de culturas adotadas no período de 2003 a 2010.

Manejo Solo ¹	Manejo Culturas ²	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão
		03/04	04	04/05	05	05/06	06	06/07	07	07/08	08	08/09	09	09/10
PC	S	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S
PC	R	S	L	M	A	S	T	S	L	M	A	S	T	S
PD	S	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S
PD	R	S	L	M	A	S	T	S	L	M	A	S	T	S

¹Sistema de preparo do solo: plantio direto (PD) e plantio convencional (PC)

²Sistema de manejo das culturas: rotação (R): trevoço(L)/milho(M)/aveia preta(A)/soja(S)/trigo(T)/soja/trigo/soja; Sucessão (S): trigo/soja.

Após a remoção da palhada da superfície, foram coletadas amostras de solo na camada de 0-10 cm de profundidade, com a utilização de um trado tipo holandês. De cada repetição foram coletadas oito subamostras deformadas, em pontos

aleatoriamente escolhidos distintos na área total da parcela, representados por círculos vermelhos (Fig. 2). A seguir, as amostras foram cuidadosamente homogeneizadas para formar uma amostra composta representativa de cada repetição, com aproximadamente 2 kg. As amostras foram então acondicionadas em sacos plásticos e encaminhadas ao laboratório, onde foram peneiradas (2 mm) e mantidas, com a umidade de campo, à temperatura de 4°C, por até 24 horas, para a extração do DNA. Amostras também foram enviadas aos Laboratórios de Solos para a realização das análises químicas e granulométricas.

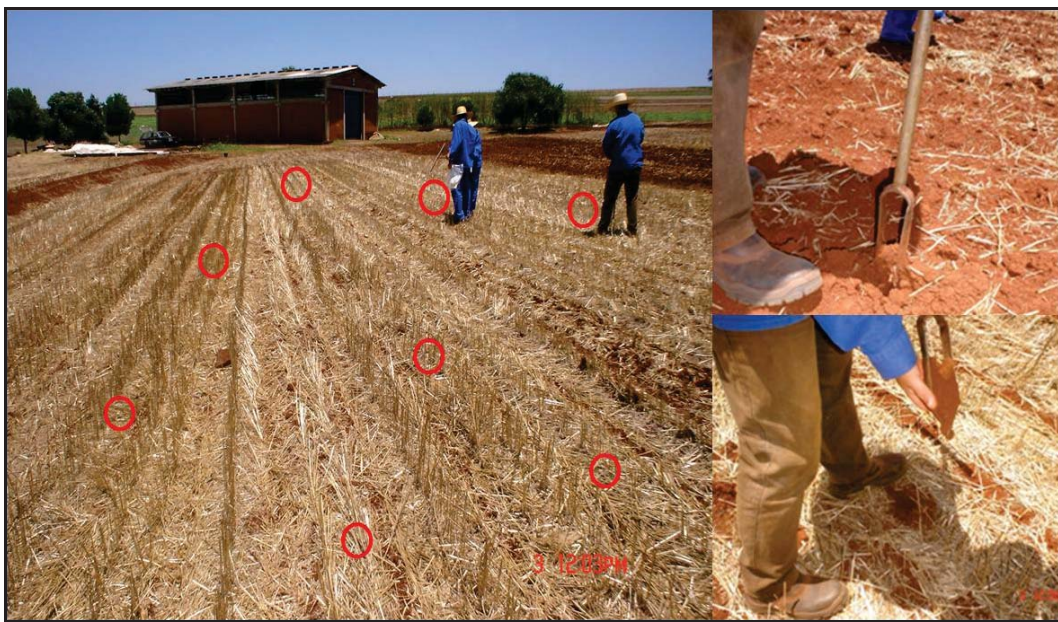


Figura 2 - Amostragem do solo utilizando um trado tipo holandês. Os círculos vermelhos representam os oito pontos de coleta dentro de uma parcela com 15 m de comprimento por 8 m de largura.

A composição granulométrica do solo da área consiste de 710 g/kg⁻¹ de argila, 82 g/kg⁻¹ de silte e 208 g/kg⁻¹ de areia. Os resultados da análise química são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Propriedades químicas do solo na camada de 0-10 cm, na área do ensaio conduzido em Londrina, PR.

Manejo Solo ¹	Manejo Culturas ²	pH CaCl ₂	Al	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC ³	P mg dm ³	C g dm ³	V ⁴ %
PD	S	5,39±0,2	0	4,67±0,6	0,53±0,1	4,03±0,7	1,24±0,1	5,79±0,9	10,47±0,3	66,02±32,3	24,04±0,8	55,00±7,1
PD	R	5,68±0,2	0	3,95±0,4	0,58±0,1	4,50±0,3	1,20±0,1	6,28±0,5	10,22±0,2	55,53± 9,3	25,80±1,3	61,24±4,2
PC	S	5,23±0,1	0	4,77±0,3	0,46±0,1	3,73±0,6	1,01±0,0	5,20±0,5	9,97±0,4	14,78± 7,8	19,19±1,7	52,11±3,8
PC	R	5,32±0,2	0	3,91±0,2	0,47±0,1	4,06±0,2	1,15±0,1	5,68±0,1	9,60±0,2	20,62± 2,4	19,37±0,8	59,22±1,3

Composição granulométrica (g kg⁻¹): argila, 710; silte, 82; areia, 208.

¹Sistema de manejo do solo: plantio direto (PD) e plantio convencional (PC).

²Sistema de manejo das culturas: rotação (R): tremoço/milho/aveia preta/soja/trigo/soja/trigo/soja; sucessão (S): (trigo/soja).

³CTC-pH7,0 (capacidade de troca de cátion) = K + Ca + Mg + (H+Al); V⁴ (saturação por bases) = (SB/CTC efetiva) X 100.

4.2. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO TOTAL DO SOLO

Após a coleta do solo, o DNA metagenômico de procariotos, eucariotos e vírus foi extraído e isolado utilizando os reagentes do *PowerMax™ Soil DNA Isolation Kit* (MoBio), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante e descrito a seguir.

Foram pesados 10 g de cada amostra de solo em um tubo contendo esferas de sílica e cerâmica que aumentam a eficiência da lise das células microbianas presentes na amostra. Na sequência foram acrescentados 15 mL da solução *Power Bead* e o tubo foi agitado rigorosamente em *vortex* por um minuto. A solução contém um tampão que ajuda a dispersar as partículas do solo, a dissolver os ácidos húmicos e a proteger os ácidos nucleicos da degradação. Também foi acrescentado 1,2 mL da solução C1 (solução de *lise*) e o tubo foi agitado por 30 segundos. A seguir, os tubos foram submetidos à agitação em *vortex* em velocidade máxima por dez minutos, onde ocorreu a homogeneização e a *lise* celular microbiana devido à ação mecânica de esferas, juntamente com os agentes químicos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 2500 X g por 3 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foram adicionados 5 mL de solução C2 (solução removedora de matéria orgânica e

inorgânica contaminantes do DNA). A solução foi misturada agitando-se o tubo manualmente e seguida de incubação a 4°C por 10 minutos. Os tubos foram centrifugados a 2500 x g por 4 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante foi transferido a um novo tubo ao qual foram adicionados 4 mL da solução C3 (segundo reagente usado na remoção de matéria orgânica e inorgânica para garantir a pureza do DNA). A solução foi misturada manualmente e incubada a 4°C por 10 minutos. A seguir, os tubos foram centrifugados a 2500 x g por 4 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante transferido a um novo tubo ao qual foram adicionados 30 mL da solução C4 (solução salina altamente concentrada que faz o DNA se ligar fortemente à membrana do filtro). A solução foi manualmente misturada e transferida para um tubo de filtro tipo *spin*, o qual foi centrifugado a 2500 x g por 2 minutos em temperatura ambiente. O conteúdo do tubo de coleta foi descartado e adicionado um segundo volume do sobrenadante no mesmo filtro *spin* que novamente foi centrifugado a 2500 x g por 2 minutos em temperatura ambiente. O conteúdo do tubo de coleta foi novamente descartado e a operação repetida até que todo o volume fosse processado. Ao filtro *spin* foram adicionados 10 mL da solução C5 (etanol para lavagem do DNA no filtro) e o tubo foi centrifugado a 2500 x g por 3 minutos. O líquido no tubo de coleta foi descartado, o filtro recolocado no tubo de coleta e novamente centrifugado a 2500 x g por 5 minutos em temperatura ambiente para retirar a solução de lavagem (C5) residual. O filtro foi acoplado a um novo tubo. Depois, foram adicionados 5 mL da solução C6 (tampão de eluição estéril – Tris 10 mM) no centro da membrana do filtro *spin* e o tubo foi centrifugado a 2500 x g por 3 minutos em temperatura ambiente. O filtro foi descartado e o DNA do tubo de coleta estava pronto para o uso.

4.3. QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO

O DNA foi quantificado em um espectrofotômetro NanoDrop, que mede a absorvância de ácidos nucleicos que absorvem no comprimento de onda de 260 nm, sendo usada a relação de absorvância 260 nm e 280 nm para avaliar a pureza do DNA. Um valor dessa relação de aproximadamente 1,8 é em geral, aceito como DNA com pureza suficiente para a análise. Se a proporção for significativamente menor, isso pode indicar a presença de proteínas, fenol ou outras substâncias com absorvância próxima a 260 nm. O DNA também foi quantificado em gel de agarose a 1%, o qual foi corado em brometo de etídeo, visualizado sob luz ultravioleta (UV) e

documentado em foto documentador (Fig. 3). As amostras de DNA foram ajustadas a uma concentração de 50 ng/ μ L.

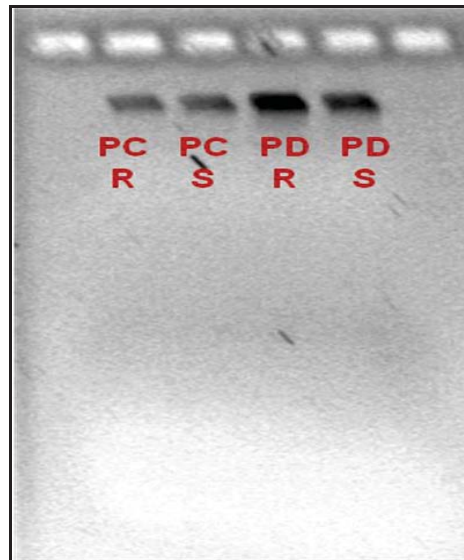


Figura 3 - DNA total extraído de amostras do solo em gel de agarose a 1%. PC: plantio convencional; PD: plantio direto; R: rotação (soja, milho, tremoço, trigo e aveia) e S: sucessão (soja e trigo).

4.4. REPETIBILIDADE ENTRE AMOSTRAS

Para verificar a homogeneidade entre as repetições foi realizada a análise genética da comunidade bacteriana pela técnica do DGGE, conforme descrito anteriormente (Pereira *et al.*, 2007). Foram realizadas duas reações de amplificação do DNA total do solo para a região que codifica o gene 16S rRNA. Inicialmente, 20 ng do DNA foram amplificados com os *primers* rD1 e fD1 (15 pmol de cada *primer* por reação), descritos por Weisburg *et al.* (1991), que amplificam praticamente toda a região do DNA que codifica para o gene 16S rRNA (~1.500 pares de bases, pb). Seguindo a metodologia de Pereira *et al.* (2007), a amplificação foi realizada usando os seguintes ciclos: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 2 min.; 15 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 seg.; 93°C por 45 seg.; anelamento dos *primers* a 55°C por 45 seg.; e extensão a 72°C por 2 minutos. A reação foi finalizada com manutenção a 4°C. Na segunda reação, 10 ng dos produtos da reação foram submetidos a uma nova amplificação, também com *primers* específicos para o 16S rRNA, mas codificando uma região menor: *primer* F (5'-CGCCCGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGAACGCGAAGA ACCTTAC-3') e R (5'-GCGTGTGTACAAGACCC-3') (10 pmol de cada "primer" por

reação). A amplificação foi realizada usando os seguintes ciclos: 1 ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 2 min.; 2 ciclos a 94°C por 1 min., a 60°C por 2 min., e a 72°C por 2 min.; 2 ciclos a 94°C por 1 min., a 59°C por 2 min., e a 72°C por 2 min.; e assim por diante, em ciclos de 2 vezes, até atingir a temperatura de anelamento de 55°C. As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador PTC-100™ MJ Research, Inc. Os produtos das amplificações foram visualizados por eletroforese em gel de agarose (1,5%, p/v) a pureza confirmada antes da análise de DGGE.

Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em um aparato de DGGE (Bio-Rad DCode), no gradiente desnaturante de 20% a 75% de ureia e formamida, a 100 V, por 16 h. Após a corrida, os geis foram corados com brometo de etídeo, fotografados sob radiação UV (302 nm) e as bandas resultantes analisadas pelo programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, v.4.1), com um nível de tolerância de 3%. Para o agrupamento foi usado o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

O nível de dissimilaridade entre as quatro repetições de cada tratamento na análise dos produtos de DGGE foi inferior a 5%. Valores de homogeneidade entre repetições (Souza *et al.*, 2008) inferiores a 10% são considerados aceitáveis para permitir juntar as repetições de cada tratamento em uma única amostra para a análise do metagenoma.

4.5. SEQUENCIAMENTO DO DNA NA PLATAFORMA 454 LIFE SCIENCES

As amostras de DNA metagenômico foram submetidas ao sequenciamento 454 (GS-FLX *Titanium* Roche Applied Science) de segunda geração no Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil). Essa técnica é baseada em nanotecnologia com sequenciamento individual das moléculas de DNA com emprego de PCR de emulsão e pirosequenciamento.

Para o pirosequenciamento o DNA é fragmentado aleatoriamente. Nesse trabalho foi empregada a fragmentação por nebulização usando o gás nitrogênio comprimido que força a passagem da amostra através de uma pequena abertura em um nebulizador e, assim, o DNA é fragmentado aleatoriamente. Em seguida os fragmentos são selecionados (Bioanalyzer DNACip) para tamanhos adequados, de preferência entre 300 e 800 pares de bases, com mediana de 500 pb (Jones, 2010). Se a amostra for aceitável, os fragmentos devem ser ligados a adaptadores A e B,

de sequências conhecidas, em cada fragmento de fita simples, nas extremidades 5' e 3'. Tanto o adaptador A como o B se ligam no mesmo fragmento, um em cada extremidade, sendo de interesse A-B. O adaptador B possui biotina, ligado na sua extremidade 5', que se liga na microesfera na reação de PCR, enquanto no adaptador A haverá a ligação do *primer*. Em seguida, são ligados às microesferas emulsionadas em uma mistura de água e óleo com reagentes de PCR para amplificação do fragmento, durante a reação de emulsão (Margulies *et al.*, 2005), que é uma modificação da PCR padrão. O óleo na água forma micelas, onde as microesferas penetram e a reação de PCR ocorre (Fig. 4).

Após a PCR de emulsão, as microesferas ligadas aos fragmentos amplificados são depositadas em um suporte para o sequenciamento. Recentemente foi lançada a série *Titanium* de pirosequenciamento pela Roche, com novo suporte *PicoTiterPlate*, que permite leituras mais acuradas, tamanho e número de leituras maiores por corrida. Esse suporte consiste de uma placa metálica e possui 3,5 milhões de poços, onde o sequenciamento das amostras da biblioteca ocorre separadamente em cada um deles. Cada poço abriga apenas uma microesfera com um tipo de fragmento amplificado milhões de vezes, além dos reagentes de sequenciamento distribuídos em todos os poços para a realização do sequenciamento baseado em síntese (Imelfort & Edwards, 2009) (Fig. 4).

Após a montagem da biblioteca, a placa é inserida no equipamento que realiza a leitura óptica para o sequenciamento, onde são adicionados os reagentes e as soluções necessárias nos poços. O pirosequenciamento se realiza com a detecção de pirofosfato (PPi), liberado durante a adição de um nucleotídeo (dATP) à cadeia de DNA pela DNA polimerase. Esse pirofosfato liberado é convertido a uma molécula de adenosina trifosfato (ATP) pela enzima ATP sulfúrilase, sendo então utilizado pela enzima luciferase para oxidar a luciferina e produzir um fóton (Ronaghi, 2001). Os fótons são detectados por uma câmera CCD (“charge-coupled device”) acoplada ao sistema (Shendure & Ji, 2008). O sequenciamento é realizado em ciclos (200 ciclos de 4 bases). Quando o nucleotídeo adicionado é incorporado na cadeia em síntese, um fóton é produzido, sendo que a intensidade de luz emitida corresponde ao número de vezes que essa base se repete e quantas bases incorporadas. Fótons de luz emitidos de uma sequência de mais que quatro nucleotídeos iguais (homopolímeros), tornam a leitura imprecisa, sendo uma importante limitação da plataforma 454 (Ronaghi, 2001; Shendure & Ji, 2008). Outra

limitação dos sequenciadores 454 é a produção de *reads* duplicados artificialmente ou artefatos (cópias de uma mesma sequência gerada durante o sequenciamento). A quantidade de *reads* é usada como uma medida de abundância, então os duplicados artificialmente superestimarão a abundância do táxon, do gene e de sua função (Niu *et al.*, 2010). Neste estudo, as sequências obtidas foram analisadas para retirada de artefatos com o programa *replicates* (Gomes-Alvarez *et al.*, 2009) e depois filtradas para excluir sequências curtas e de baixa qualidade através do programa Lucy (Chou *et al.*, 2001).

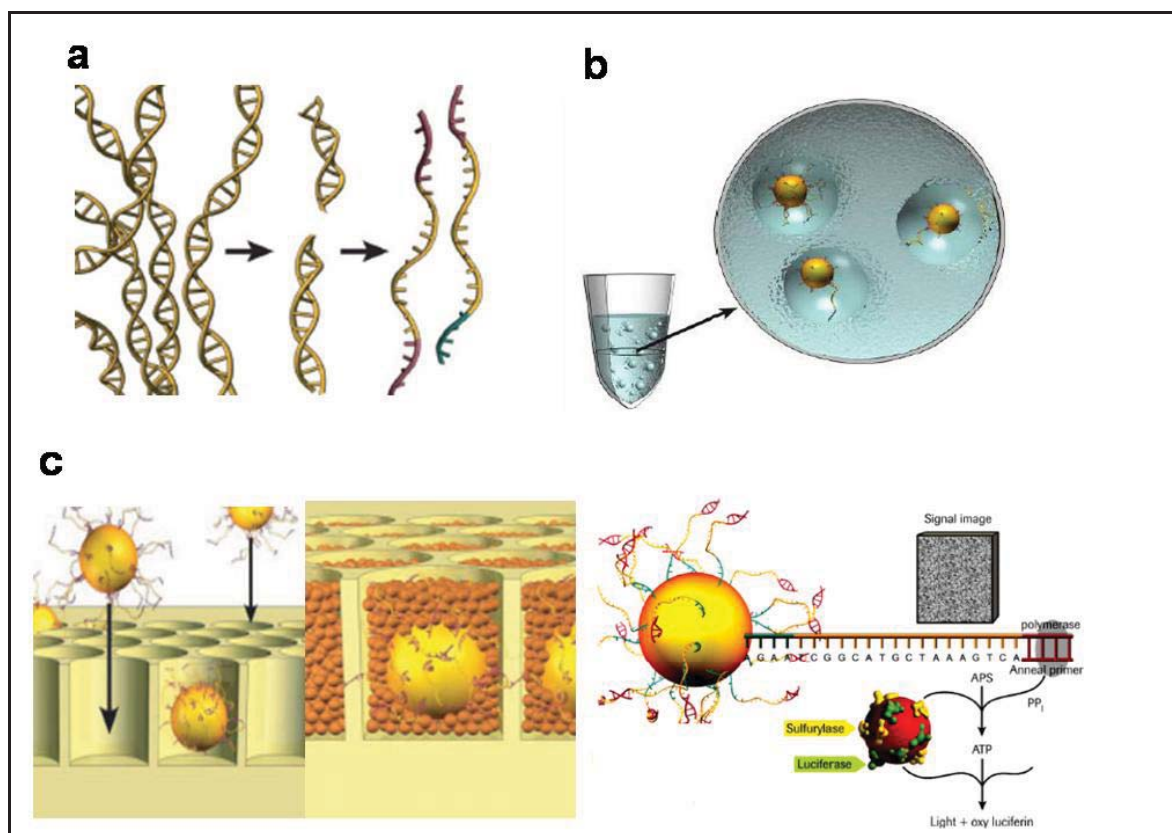


Figura 4 - Resumo esquemático do sequenciamento na plataforma 454. (a) O DNA genômico é isolado, fragmentado e ligado a adaptadores; (b) Um único tipo de fragmento é ligado a uma micro-esfera que é capturada pelas micelas onde ocorre a PCR de emulsão; (c) As microesferas com as sequências ligadas são colocadas no suporte de sequenciamento, cada uma em um poço. O pirosequenciamento é baseado na detecção de luz emitida a cada base incorporada, em cada poço.

4.6. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS USANDO O PROGRAMA MEGAN

As sequências foram analisadas pelo programa MEGAN (*Metagenome Analyser*) versão 4.62.5 (Huson *et al.*, 2011), baseado na comparação das

sequências de nucleotídeo contra o banco de proteínas não redundantes do NCBI utilizando a ferramenta Blast (Tatusova & Madden, 1999) com o algoritmo blastx. O programa Megan foi desenvolvido para análise de sequências metagenômicas e possui recursos para classificação taxonômica dos *reads*, análise funcional dos genes na amostra e metagenômica comparativa. Segundo Huson e colaboradores (2007), para o processamento do MEGAN primeiro são obtidos os dados de um sequenciamento *shotgun*, depois são comparadas as sequências de todos os *reads* contra um ou mais banco de dados, como o NCBI-NR (sequências de proteínas não redundantes), o NCBI-NT (sequências de nucleotídeos), o NCBI-ENV-NR (sequências de proteínas não redundantes de amostras ambientais de organismos de origem desconhecida), o NCBI-ENV-NT (sequências de nucleotídeos de amostras ambientais de organismos de origem desconhecida), ou com um genoma específico, usando a ferramenta BLAST. O MEGAN então processa o resultado da comparação de Blast para coletar todos os *hits* e atribui um táxon para cada sequência com base na taxonomia do NCBI, através do algoritmo *Lowest Common Ancestor* (LCA) produzindo um arquivo com toda a informação necessária para a análise de classificação, funcional, comparativa e estatística.

O Megan gera uma árvore com o conteúdo microbiano de cada metagenoma, porém não se pode afirmar com certeza que os microrganismos presentes nessa árvore realmente existam na amostra, pois o algoritmo LCA atribui às sequências um táxon através da comparação contra um banco de dados. Entretanto, para ser atribuída a um táxon, uma sequência deve encontrar alinhamento de boa qualidade e com um número mínimo de sequências depositadas no banco de dados, evitando assim o acaso. Como a incerteza não exclui a grande possibilidade, pode-se chamar uma sequência pelo seu respectivo microrganismo. Os parâmetros usados no programa foram *min-support*: 5; *min-score*: 60; *top-percent*: 10. Os dados foram normalizados e comparados pelo próprio programa. A Fig. 5 apresenta o fluxograma de análise de dados usando o Megan.

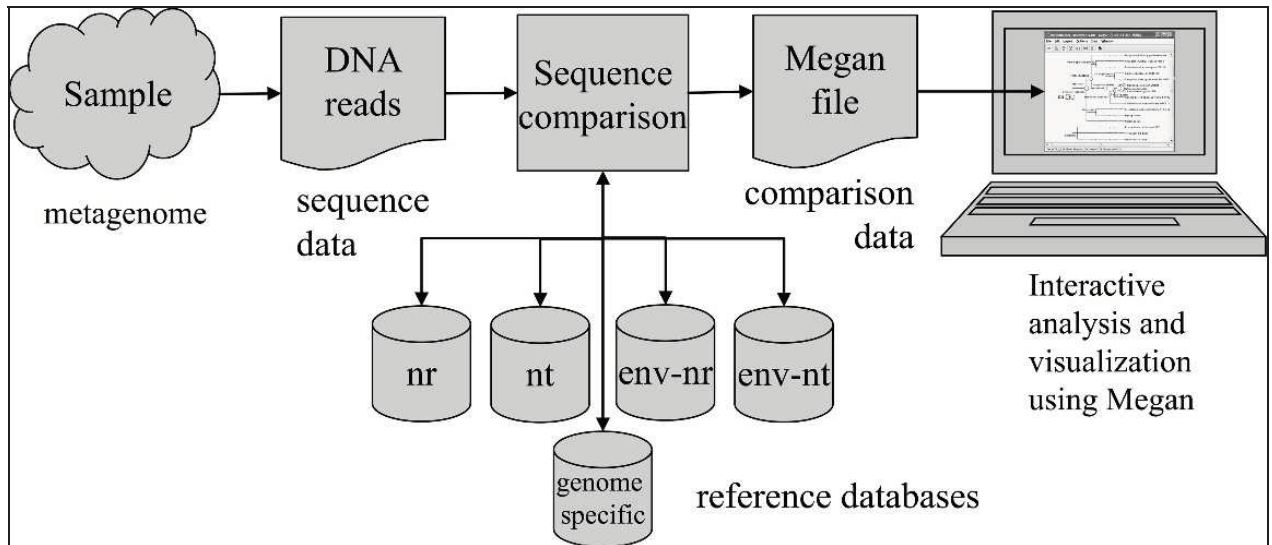


Figura 5 - Fluxo de processamento MEGAN (Huson *et al.*, 2007)

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados metagenômicos foi realizada utilizando o programa STAMP (*Statistical Analysis of Metagenomic Profiles*) (Parks & Beiko, 2010) para identificar ordens, onde a proporção de sequências atribuídas aos solos submetidos aos manejos do solo e de culturas tiveram resultados diferentes estatisticamente. A significância estatística foi calculada com o Teste exato de Fisher para obtenção de valor de p menor que 0,05, utilizando o método de correção Storey's FDR para comparação dois a dois dos metagenomas. O intervalo de confiança foi calculado usando o método de Newcombe-Wilson.

5. RESULTADOS

5.1. DADOS GERAIS DOS METAGENOMAS OBTIDOS

5.1.1. Sequências Obtidas

A corrida do sequenciamento na plataforma 454 gerou cerca de 1 milhão de sequências para cada tratamento. Para o solo em plantio convencional com rotação de culturas foram gerados 1.050.712 sequências com tamanho médio de 304 pb; para o solo sob plantio convencional com sucessão de culturas foram obtidas 1.080.923 sequências com tamanho médio de 307 pb; no solo sob plantio direto com rotação de culturas, foram obtidas 913.435 sequências com tamanho médio de 306 pb; e 1.034.153 sequências com tamanho médio de 311 pb foram obtidas das amostras de solo sob plantio direto com sucessão de culturas. Na montagem, realizada pelo programa Newbler, o número de contigs gerados em solo sob plantio convencional com rotação de culturas foi de 51, onde o maior contig apresentou 1323 pb; em solo sob plantio convencional com sucessão de culturas o número de contigs foi 83, com 1287 pb no maior; para o solo sob plantio direto com rotação de culturas foram obtidos 31 contigs, com 1055 pb no maior; e 58 contigs em solo sob plantio direto com sucessão de culturas com o maior contig contendo 1505 pb. Esses resultados indicam uma grande diversidade nos tratamentos, principalmente em solo sob plantio direto com rotação de culturas.

Como os números de sequências obtidas para cada tratamento foram próximos, os dados foram normalizados para permitir uma melhor comparação. A normalização foi realizada reduzindo o conjunto para que todos apresentassem a mesma proporção de 100.000 sequências. Deve-se destacar que a grande maioria dos estudos metagenômicos do solo realizados até agora têm usado genes específicos, principalmente os rRNA 16S ou bibliotecas de clones, enquanto que nesse estudo foi realizado a abordagem ESS (environmental shotgun sequence), que capta uma ampla diversidade.

5.1.2. Curvas de Rarefação

Para a estimativa da diversidade microbiana das amostras em relação à quantidade de sequências amostradas, foram geradas curvas de rarefação pelo programa MEGAN para o nível taxonômico de espécie (Fig. 6). As curvas não se estabilizaram em 100% das sequências amostradas nos sistemas de manejo do solo

e das culturas. Elas ainda apresentaram leve tendência de incremento, indicando que o total de sequências, ainda que muito elevado, não foi suficiente para a saturação. Cabe destacar que, em comparação com outros estudos de genômica, 1 milhão de leituras representa um patamar bastante superior. Como exemplo, Harvelsrud et al. (2011) obtiveram 459.262 mil leituras estudando o metagenoma de sedimentos marinhos em ponto de petróleo na Califórnia, menos que metade do total de leituras obtidas nesse trabalho.

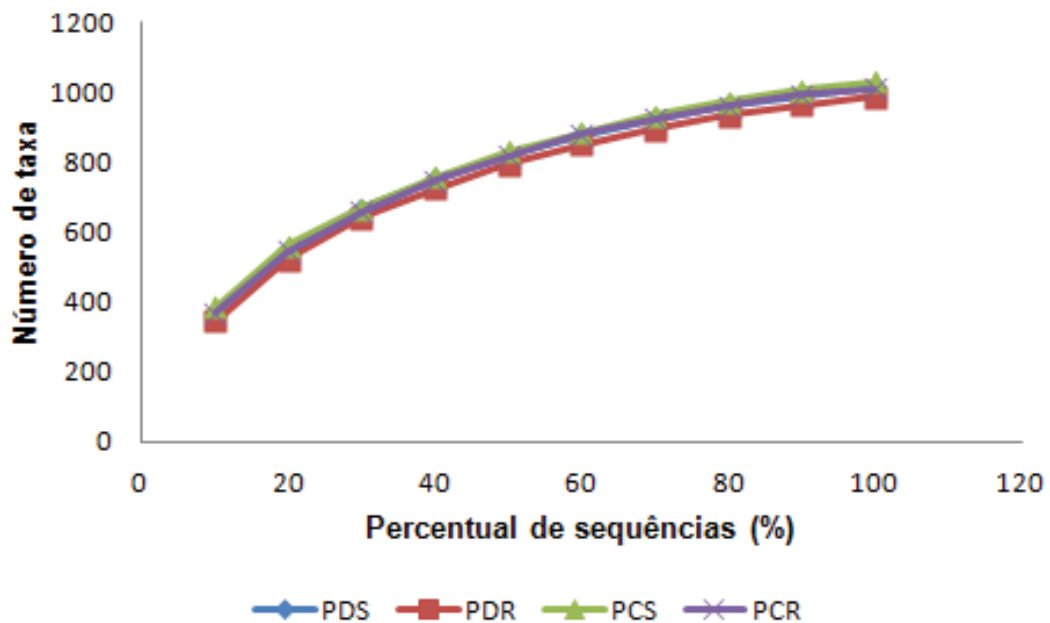


Figura 6 - Curvas de rarefação para o nível taxonômico de espécie das amostras metagenômicas de solo sob plantio direto e convencional em rotação e sucessão de culturas, geradas pelo programa MEGAN. Plantio direto com sucessão de culturas (PDS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-verde); plantio convencional com rotação de culturas (PCR-roxo).

5.2. DIVERSIDADE MICROBIANA NOS DIFERENTES MANEJOS

5.2.1. Diversidade Microbiana pela Análise de Dados Normalizados

Para a análise das sequências totais de cada amostra, o programa MEGAN resultou na formação de uma árvore, na qual cada sequência é atribuída um táxon a partir da comparação das sequências ao banco de dados NCBI-NR usando o Blastx (Fig. 7). Na árvore comparativa dos quatro metagenomas, entre os três domínios, a maioria das sequências classificadas (53,5%) foi agrupada no domínio Bacteria,

enquanto que menor quantidade de sequências (0,3% e 0,2%) foi dividida entre os domínios Archaea e Eucarya, respectivamente, enquanto que os vírus apresentaram quantidade ainda menor de apenas 0,0001%. No entanto, grande parte das sequências dos quatro metagenomas (46,1%) não apresentou classificação em nenhum dos domínios e foi agrupada em *no hits* (sequências sem similaridade com as sequências depositadas no banco de dados do NCBI).

Proporções semelhantes de microrganismos em três áreas foram relatados em outro estudo metagenômico de um solo de pastagem natural na Estação Experimental de Rothamsted, no Reino Unido (Delmont *et al.*, 2012). Foram obtidos mais de 12,5 milhões de reads e com base na classificação funcional do MG-RAST (Meyer *et al.*, 2008), somente 34,5% das sequências foram anotadas, das quais 88,64%, 0,91% e 1,41% foram classificadas para os Domínios Bacteria, Archaea e Eucarya, respectivamente (Delmont *et al.*, 2012).

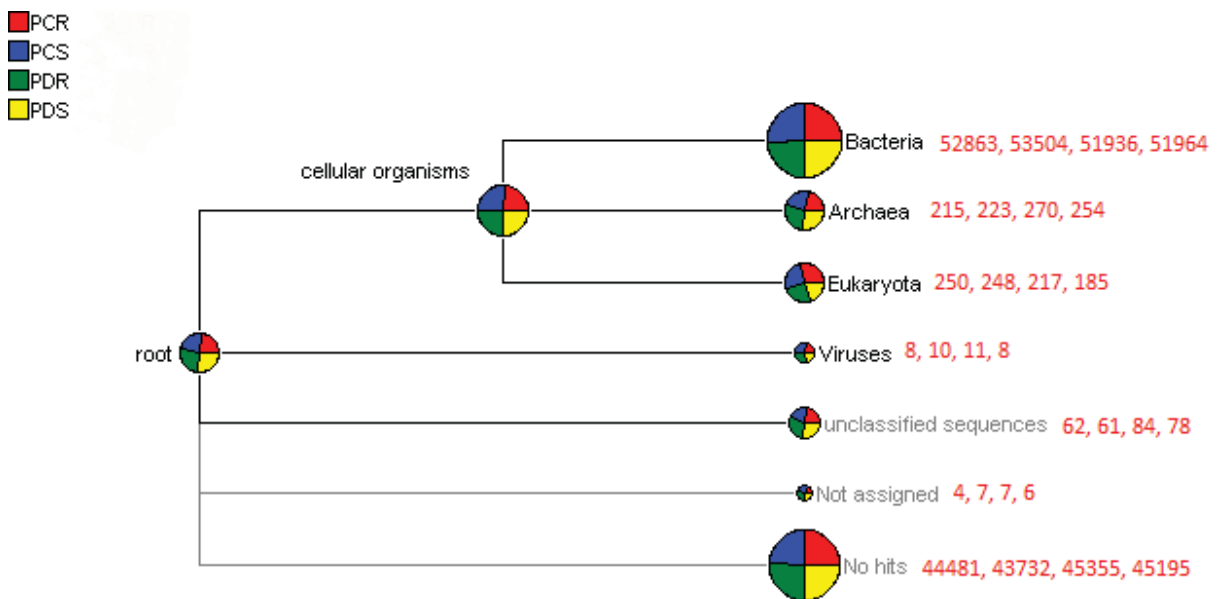


Figura 7 - Árvore comparativa de quatro amostras metagenômicas do solo, gerada com o programa MEGAN. Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo). O diâmetro do círculo é proporcional à quantidade de sequências.

5.2.2. Composição Microbiana e Funcionalidades nos Diferentes Domínios

5.2.2.1. Domínio Bacteria

A maioria das bactérias que vivem no solo se encontra na rizosfera de plantas ou associadas a outros organismos, participando tanto de processos infecciosos que causam doenças, como de processos mutualísticos.

Considerando o domínio Bacteria, entre os quatro sistemas de manejo do solo segundo a classificação do programa MEGAN, o filo presente em maior quantidade (41,53%) foi o de Proteobacteria (Fig. 8).

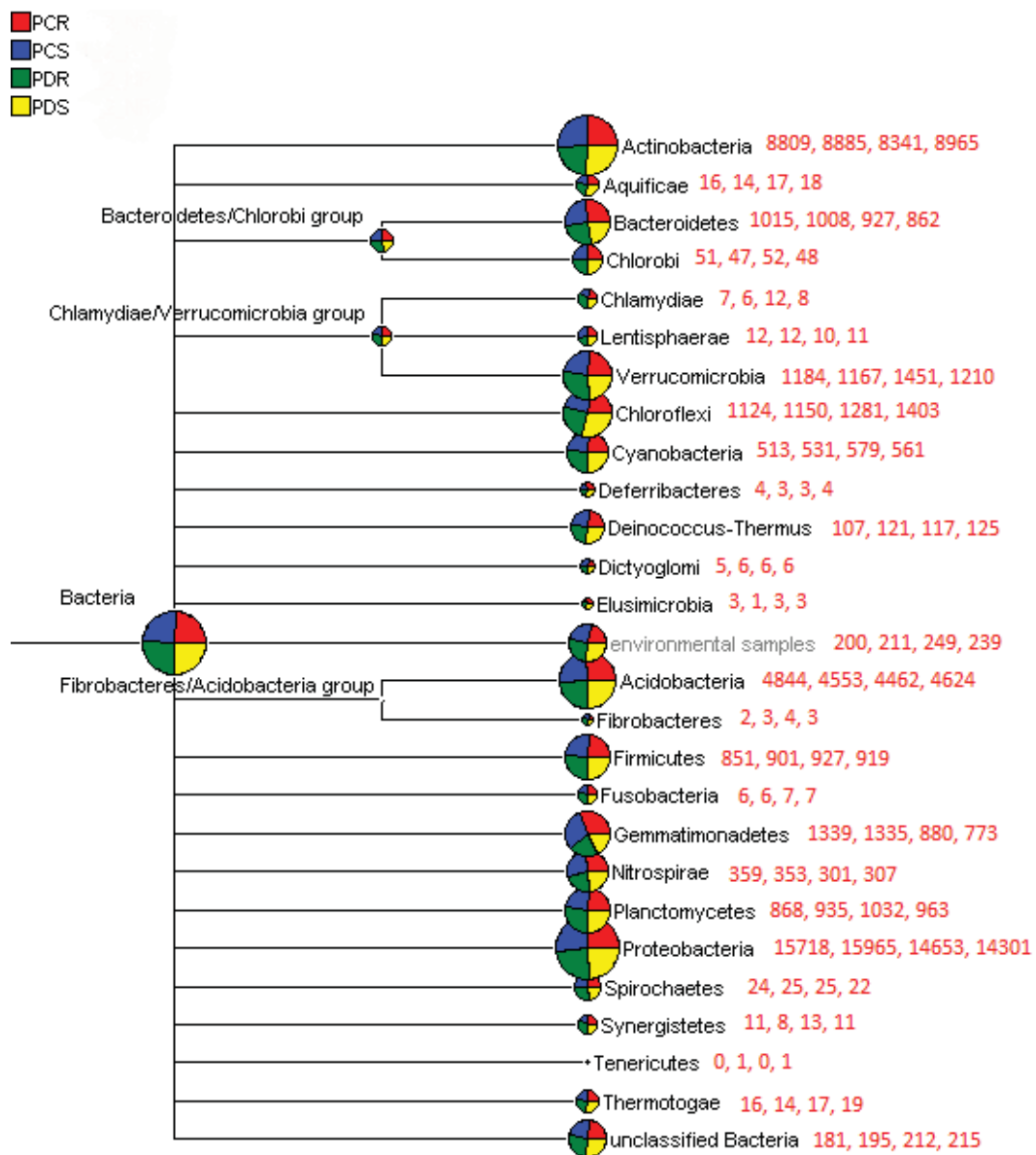


Figura 8 – Árvore comparativa do Domínio Bacteria gerada pelo programa MEGAN, indicando a classificação em nível de Filo. Plantio convencional com rotação de

culturas (PCR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo). O diâmetro do círculo é proporcional à quantidade de sequências.

As classes do filo Proteobacteria presentes nos metagenomas foram as de Alfaproteobacteria (51,05%), Betaproteobacteria (20,77%), Deltaproteobacteria (19,57%) e Gammaproteobacteria (8,55%) (Fig. 9).

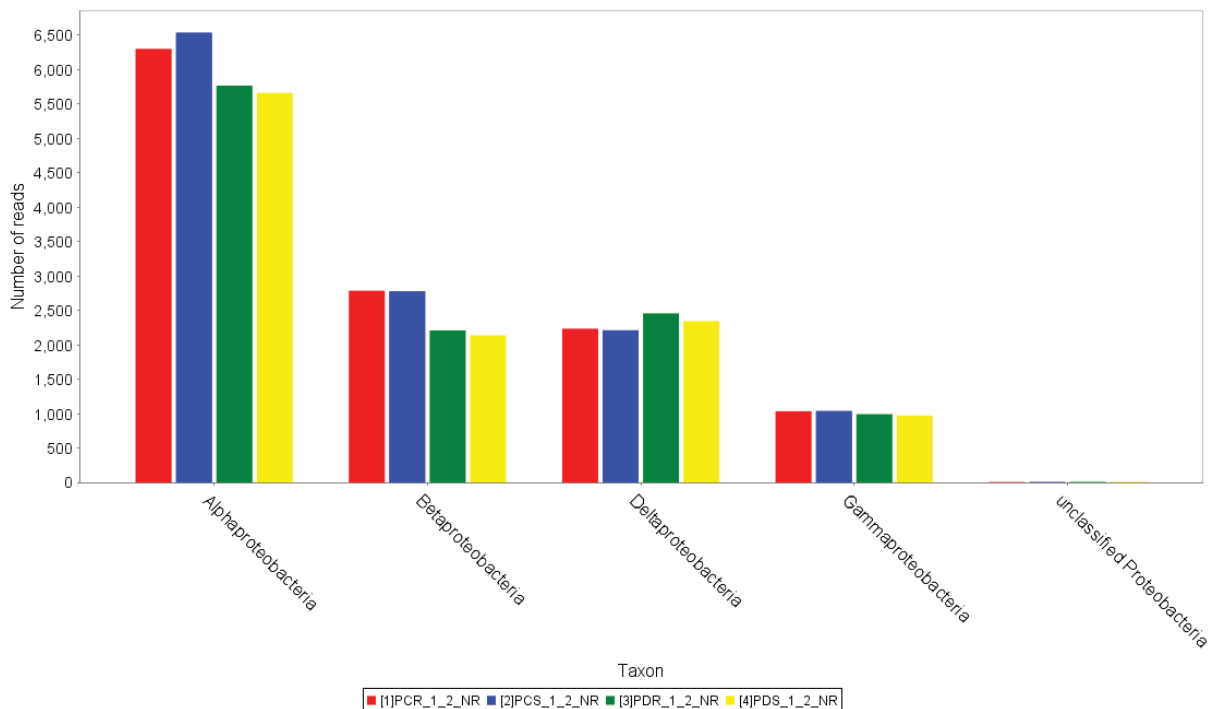


Figura 9 - Abundância das classes do Filo Proteobacteria nos quatro sistemas de manejo, segundo análise gerada pelo programa MEGAN. Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo).

A classe Alfaproteobacteria foi a mais abundante nos quatro sistemas de manejo, sendo constituída principalmente pelas ordens Caulobacterales, Rhodospirillales, Sphingomonadales e Rhizobiales (Fig. 10). A ordem Rhizobiales apresentou-se em maior número entre as ordens da classe Alfaproteobacteria, com abundância dos principais gêneros que participam da fixação biológica do nitrogênio em associação com raízes de leguminosas como, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium*. A classe Alfaproteobacteria também inclui outros gêneros importantes para o ciclo do nitrogênio, como *Nitrobacter*. No gênero *Rhodopseudomonas*, há espécies de interesse, como *R. palustris*, fototrófica e que

tem sido utilizada como modelo em diversos estudos de degradação anaeróbia de diversos compostos aromáticos (Perrotta & Harwood, 1994). Na ordem Sphingomonadales, o gênero *Sphingomonas* apresentou abundância nos quatro sistemas de plantio; dentre outras funções, espécies deste gênero são importantes por serem capazes de fazer a mineralização de herbicidas no solo (Sorensen *et al.*, 2001). A ordem Caulobacterales foi a terceira mais abundante e inclui o gênero *Caulobacter*, o qual foi mais representativo nas amostras. Acredita-se que os constituintes desse gênero desempenhem um importante papel no ciclo do carbono dentro de seus habitats. Recentemente foi isolada uma nova bactéria desse gênero que possui capacidade de formar nódulos em raízes de plantas promovendo a fixação biológica do nitrogênio (Edulamudi *et al.*, 2011).

Já a ordem Rhodospirillales foi a terceira mais abundante da classe Alfaproteobacteria e, o gênero *Azospirillum* apresentou-se em grande número. Os representantes deste gênero realizam associações com raízes de plantas contribuindo na fixação biológica do nitrogênio e biossíntese de hormônios de crescimento de plantas (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

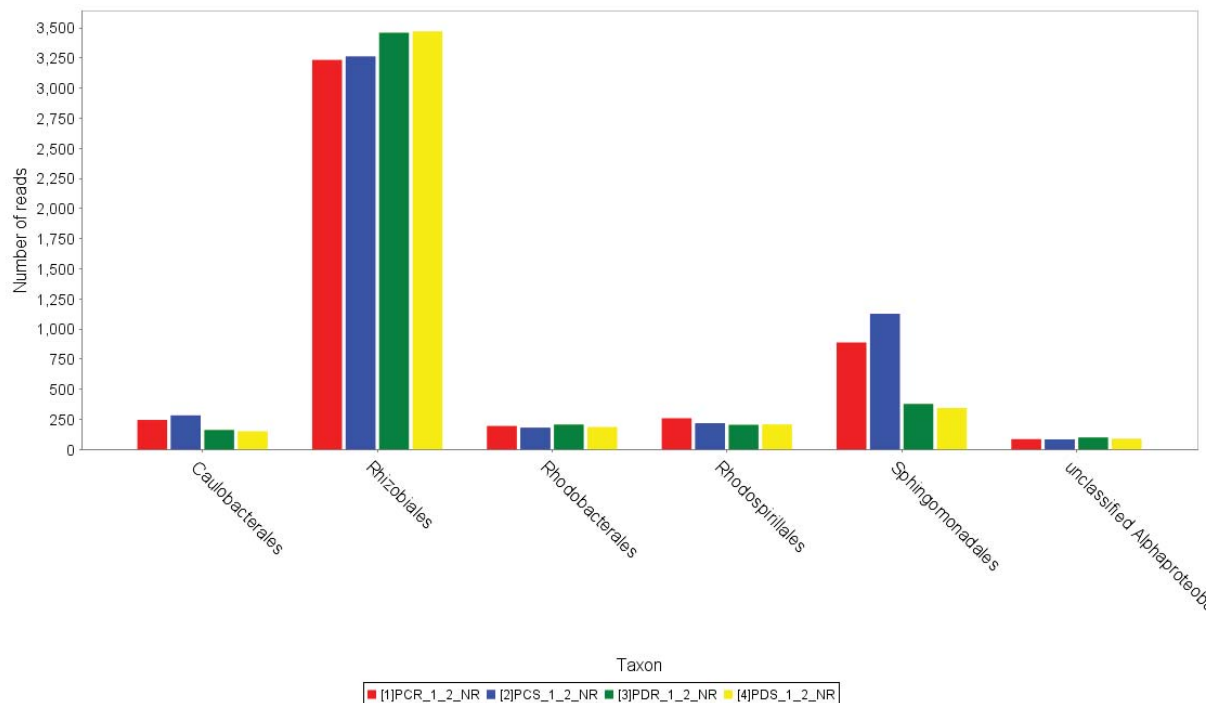


Figura 10 - Abundância das ordens da classe Alfaproteobacteria presentes nos quatro sistemas de manejo gerada pelo programa MEGAN. Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo).

A classe Betaproteobacteria foi a segunda mais abundante e apresentou grande quantidade de microrganismos da ordem Burkholderiales, além de alguns das ordens Nitrosomonadales e Rhodocyclales (Fig. 11). No solo, bactérias do gênero *Burkholderia* possuem diversas funções, incluindo controle biológico de patógenos de plantas, biorremediação de xenobióticos recalcitrantes (Coenye & Vandamme, 2003), promoção do crescimento em plantas (Estrada-De Los Santos *et al.*, 2001), e fixação biológica do nitrogênio (Gyaneshwar *et al.*, 2011). A ordem Nitrosomonadales inclui bactérias dos gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrospira*, também envolvidas no ciclo do nitrogênio através da oxidação da amônia (Schmidt & Bock, 1997; Shaw *et al.*, 2006). A ordem Rhodocyclales é composta por bactérias capazes de utilizar uma ampla variedade de compostos orgânicos para o crescimento, atuando principalmente na biorremediação de petróleo ou hidrocarbonetos em solo e/ou água contaminada e na fixação biológica do nitrogênio (Hurek *et al.*, 1997; Chakraborty *et al.*, 2005; Mao *et al.*, 2010).

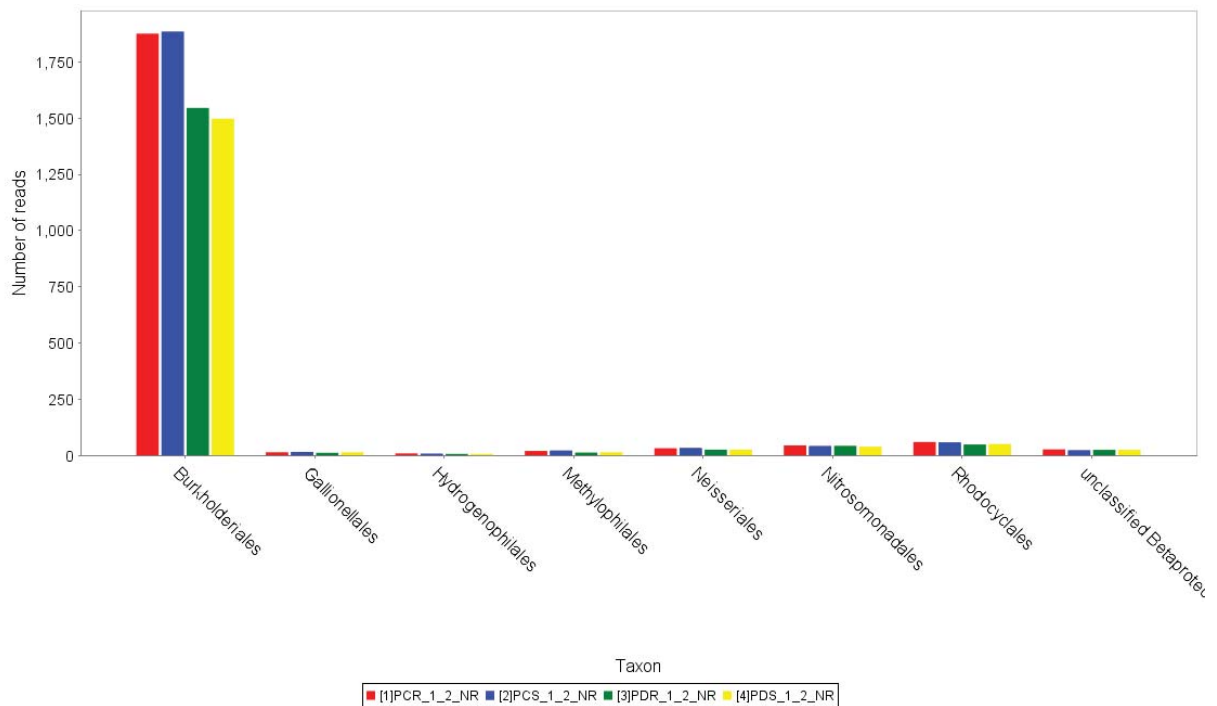


Figura 11 - Abundância das ordens da classe Betaproteobacteria presentes nos quatro sistemas de manejo gerada pelo programa MEGAN. Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo).

Deltaproteobacteria foi a terceira classe mais numerosa do filo Proteobacteria, com maior abundância das ordens Myxococcales, Desulfuromonadales, Desulfovibrionales, Desulfobacterales e Syntrophobacterales (Fig. 12). Bactérias pertencentes a essas ordens são redutoras de sulfato e ferro (Foti *et al.*, 2007; Hori *et al.*, 2010), desempenhando um papel importante na disponibilidade desses nutrientes para as plantas e para os outros microrganismos do solo.

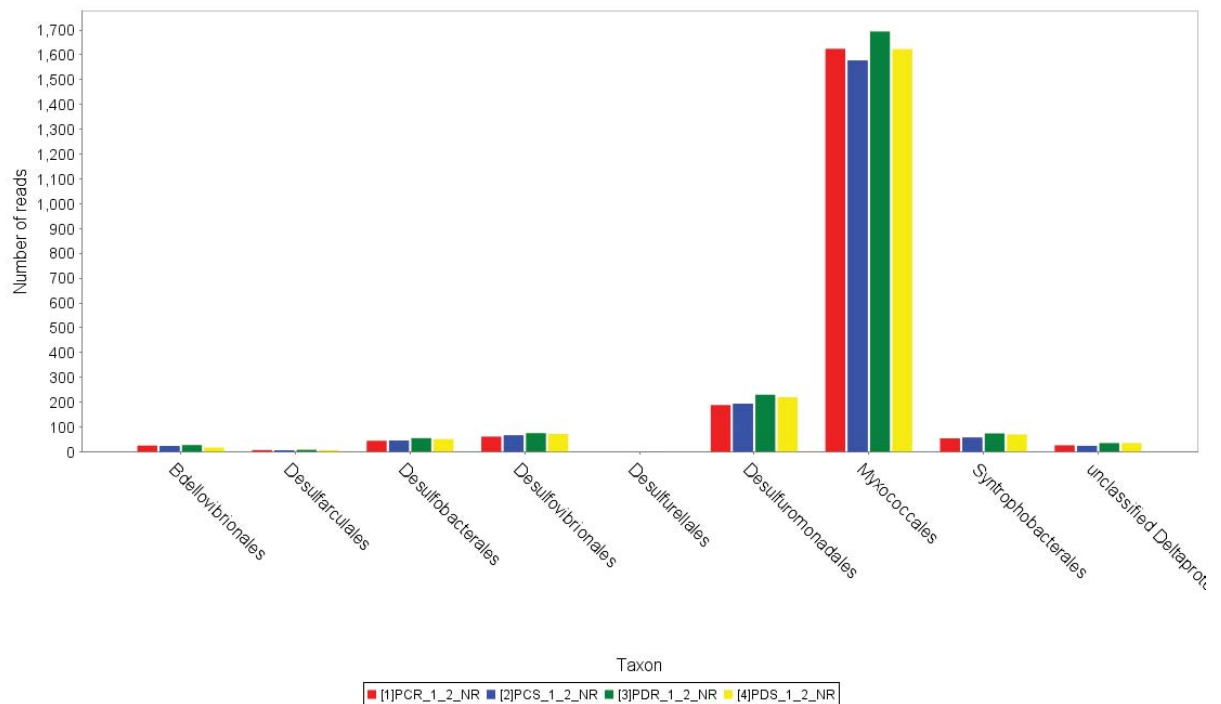


Figura 12 - Abundância das ordens da classe Deltaproteobacteria presentes nos quatro sistemas de manejo gerada pelo programa MEGAN. Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo).

As ordens mais abundantes da classe Gammaproteobacteria foram relacionados a Pseudomonadales, Xanthomonadales e Chromatiales (Fig. 13). Na ordem Pseudomonadales, o gênero *Pseudomonas* foi o dominante e destaca-se pela grande versatilidade nutricional e habilidade de crescimento rápido em ampla variedade de ambientes e substratos. São abundantes no solo e, embora algumas espécies estejam relacionadas a doenças, principalmente em plantas, outras participam de processos importantes no solo, como no ciclo do nitrogênio (nitrificação e desnitrificação); degradação de compostos aromáticos (Palleroni,

2009) e promoção de crescimento em plantas que pode ocorrer por meio de diversos mecanismos (Saharan & Nehra, 2011). A maioria dos microrganismos pertencentes a ordem Xanthomonadales são fitopatógenos e conseguem sobreviver em condições limitadas de nutrientes, sendo fortes competidores no solo (Habte & Alexander, 1975). Enquanto a ordem Chromatiales inclui o gênero *Nitrosococcus* que compreende bactérias importantes no ciclo do nitrogênio, sendo que algumas conseguem oxidar também o metano, incorporando-o nos seus componentes celulares, na presença ou ausência de fontes de nitrogênio (Jones & Morita, 1983).

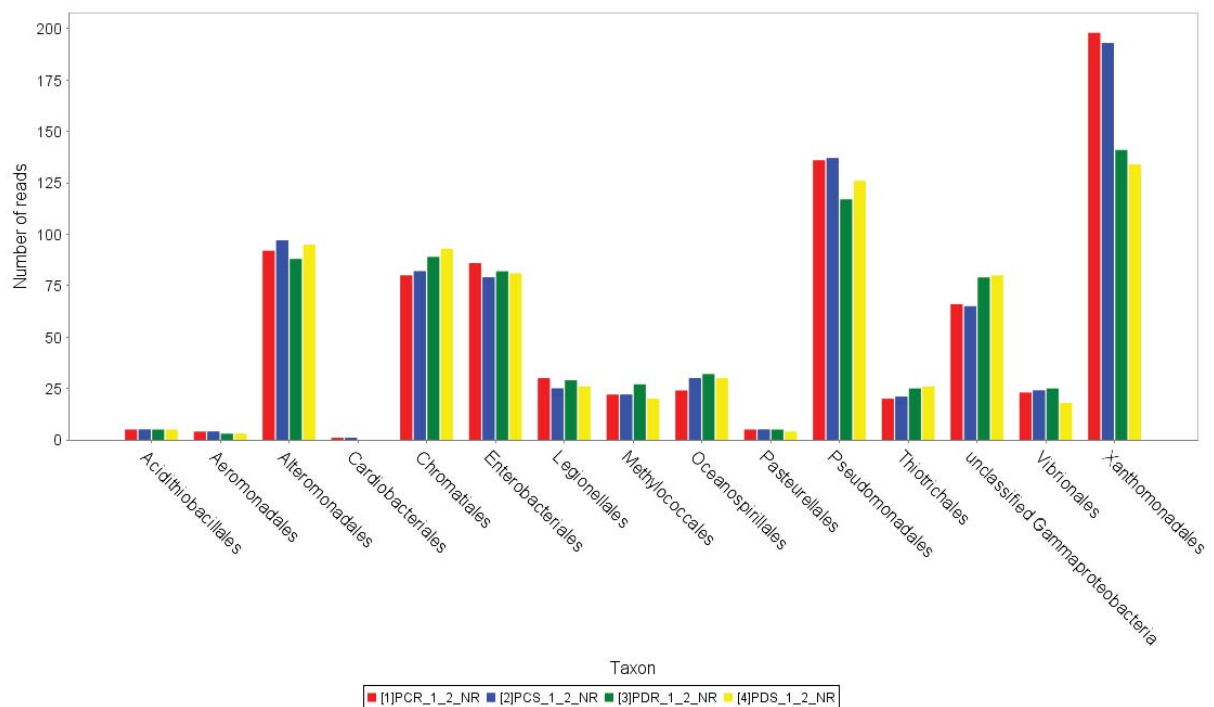


Figura 13 - Abundância das ordens da classe Gammaproteobacteria presentes nos quatro sistemas de manejo gerada pelo programa MEGAN. Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo).

O filo Actinobacteria também apresentou grande quantidade de sequências nos quatro tratamentos estudados (PCR: 8.809; PCS: 8.885; PDR: 8.341; PDS: 8.965), sendo o segundo mais abundante (23,98%). As ordens mais representativas foram Actinomycetales, Solirubrobacteriales e Rubrobacteriales (Fig. 14). Entre os Actinomycetales estão produtores de antibióticos explorados na indústria farmacêutica, como os do gênero *Streptomyces* (Schlatter *et al.*, 2009). O filo

também inclui o gênero *Frankia* com simbioses fixadores de nitrogênio em associação com plantas actinorrízicas, como *Alnus* e *Casuarina* (Chaia *et al.*, 2010).

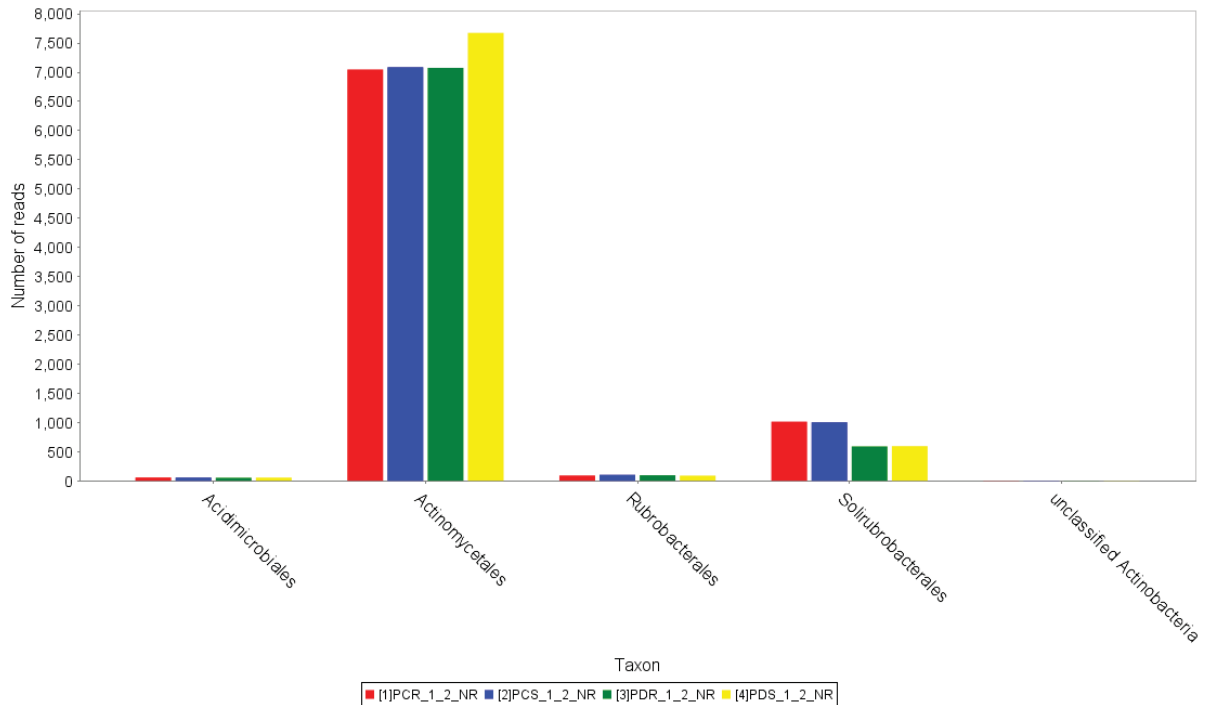


Figura 14 - Abundância das ordens do filo Actinobacteria presentes nos quatro sistemas de manejo gerada pelo programa MEGAN. Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo).

A ordem Solirubrobacterales foi representada predominantemente por microrganismos da espécie *Conexibacter woesei*, inicialmente isolada do solo de floresta temperada e filogeneticamente intrigante, representando uma linha evolucionária distante na classe Actinobacteria (Monciardini *et al.*, 2003). Já a ordem Rubrobacterales apresentou bactérias apenas da espécie *Rubrobacter xylanophilus*, que são consideradas termofílicas; com representantes isolados de fontes termais (Chen *et al.*, 2004), e outros envolvidos em processos de biodeteriorização de construções antigas (Laiz *et al.*, 2009).

O filo Acidobacteria foi o terceiro mais abundante (12,68%), representado principalmente pelas ordens Solibacterales e Acidobacteriales (Fig. 15). Esse filo é geralmente muito abundante em diversos tipos de solos, porém, ainda pouco se

sabe sobre a diversidade e funcionalidade desses microrganismos, pois a maioria permanece incultivável.

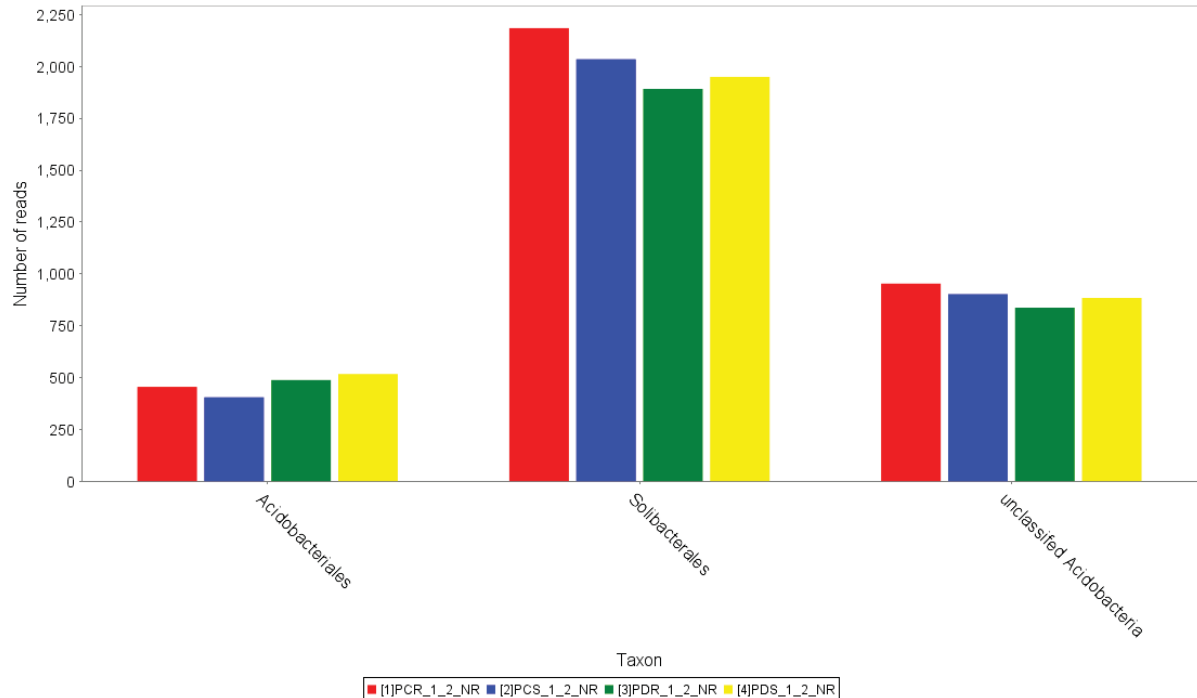


Figura 15 - Abundância das ordens do filo Acidobacteria presentes nos quatro sistemas de manejo gerada pelo programa MEGAN. Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo).

Os constituintes do filo Verrucomicrobia (3,45) são importantes membros da comunidade rizosférica de plantas. Há relatos de isolamentos desses microrganismos na rizosfera de *Pinus contorta* (Chow *et al.*, 2002) e de espécies Proteacea endêmicas da flora Cape na África do Sul, como *L.-eucospermum truncatulum* e *L.-eucadendron xanthoconus* (Stafford *et al.*, 2005). O papel desses microrganismos na rizosfera ainda não está bem definido, porém já foi constatado que alguns participam da oxidação do metano no solo (Dunfield *et al.*, 2007; Pol *et al.*, 2007) (Fig. 16).

No filo Gemmatimonadetes (2,98%) houve a presença apenas da espécie *Gemmatimonas aurantiaca*. O primeiro membro desse filo foi relatado em 2003, em lodos ativados de um sistema de tratamento de esgoto (Zhang *et al.*, 2003) (Fig. 16).

Entre os outros filios classificados, destacaram-se Bacteroidetes (2,6%), em que alguns representantes realizam promoção de crescimento em plantas (Soltani *et*

al., 2010) e decomposição de celulose (Verkhovtseva *et al.*, 2007) e Chloflexi (3,4%), importantes no processo de degradação da matéria orgânica (Yamada *et al.*, 2005). O filo Cyanobacteria (1,5%) compreende bactérias fotossintetizantes, algumas capazes de fixar nitrogênio atmosférico e outras capazes de aumentar a estabilidade dos agregados do solo (Issa *et al.*, 2007); além disso, algumas possuem efeito supressor de patógenos (Domracheva *et al.*, 2010) e usados na biorremediação de pesticidas ou metabolitos tóxicos (Cáceres *et al.*, 2008). O filo Firmicutes (2,48%) inclui bactérias que realizam biodegradação de hidrocarbonetos (Das & Mukherjee, 2007) e promoção de crescimento em plantas pelo sinergismo com outras espécies (Lima *et al.*, 2011). Bactérias desse filo, como por exemplo, *Bacillus* e *Clostridium*, possuem células ou esporos que dificultam a lise celular para a obtenção de DNA, dificultando sua detecção no solo. O filo Nitrospirae (0,9%) inclui bactérias importantes na oxidação de nitrito (Attard *et al.*, 2009; Lucker *et al.*, 2010), enquanto que membros do filo Planctomycetes (2,6%) participam do ciclo do nitrogênio com a oxidação da amônia (Fuerst & Sagulenko, 2011) (Fig. 16).

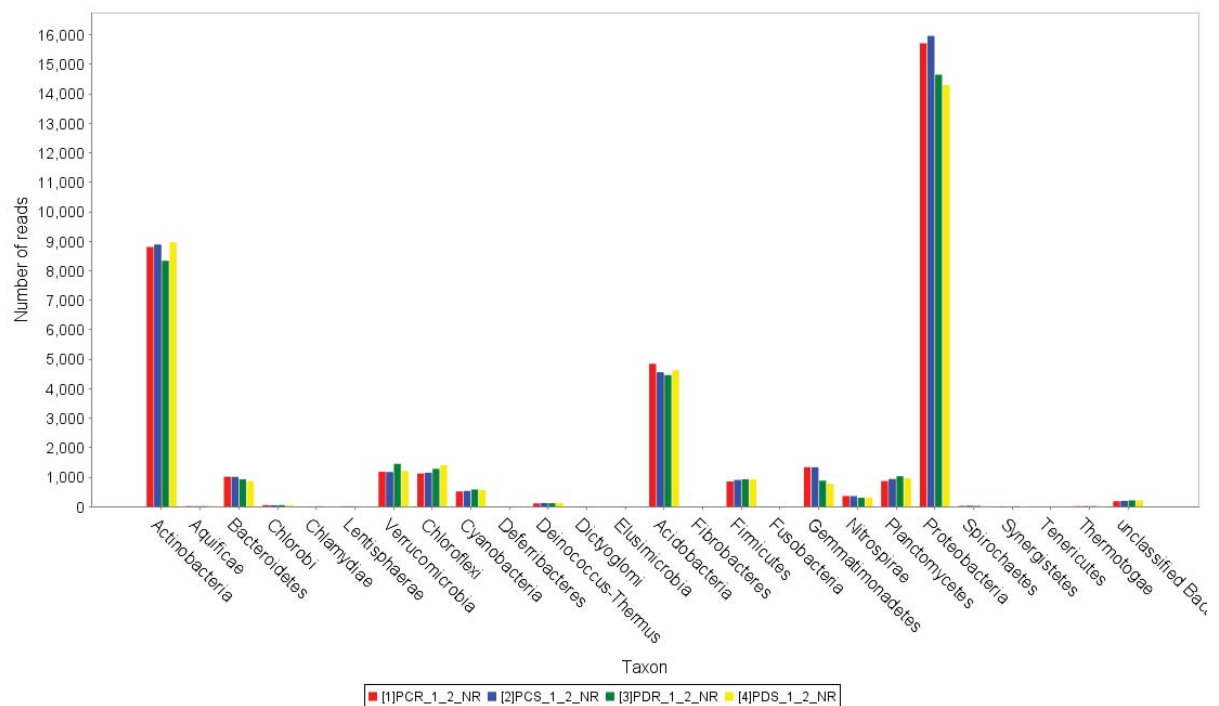


Figura 16 – Abundância dos principais filios do Domínio Bacteria presentes nos quatro sistemas de manejo gerada pelo programa MEGAN. Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo).

5.2.2.2. Domínio Archaea

O domínio Archaea apresentou menos sequências classificadas provenientes dos quatro metagenomas estudados, com os representantes em ordem decrescente de abundância, dos filos Euryarchaeota, Thaumarchaeota, Crenarchaeota e Korarchaeota (Fig. 17).

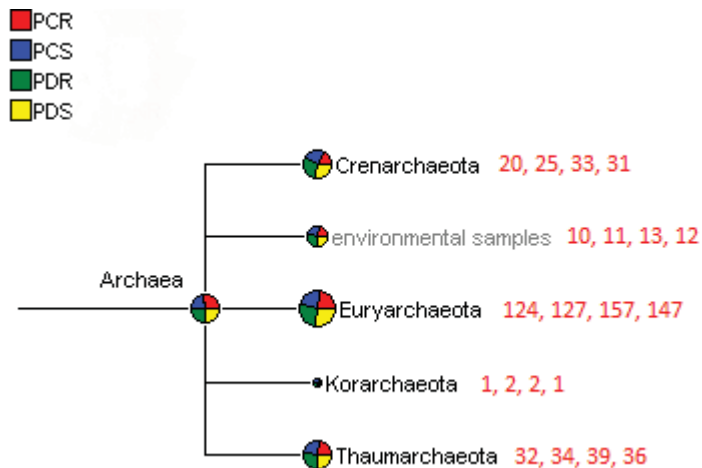


Figura 17 - Árvore comparativa do Domínio Archaea com nível de classificação de filos nos quatro sistemas de manejo, gerada pelo programa MEGAN. Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo). O diâmetro do círculo é proporcional à quantidade de sequências.

O filo mais abundante foi o Euryarchaeota, em que predominaram as classes Methanomicrobia, Halobacteria e Thermococci (Fig. 18). A classe Methanomicrobia inclui as arqueias metanogênicas, geralmente presentes em ambientes ricos em matéria orgânica (Pazinato *et al.*, 2010). Os filos Thaumarchaeota e Crenarchaeota ocorreram em menor prevalência. Os microrganismos representantes do filo Thaumarchaeota são importantes no ciclo do nitrogênio no solo pelo processo de nitrificação e no ciclo do carbono no solo pela fixação de CO₂ na biomassa (Pester *et al.*, 2011). Já os Crenarchaeota não termofílicos habitam ambientes ricos em matéria orgânica e algumas colonizam raízes de plantas terrestres, porém o seu possível papel nas raízes permanece desconhecido (Simon *et al.*, 2000).

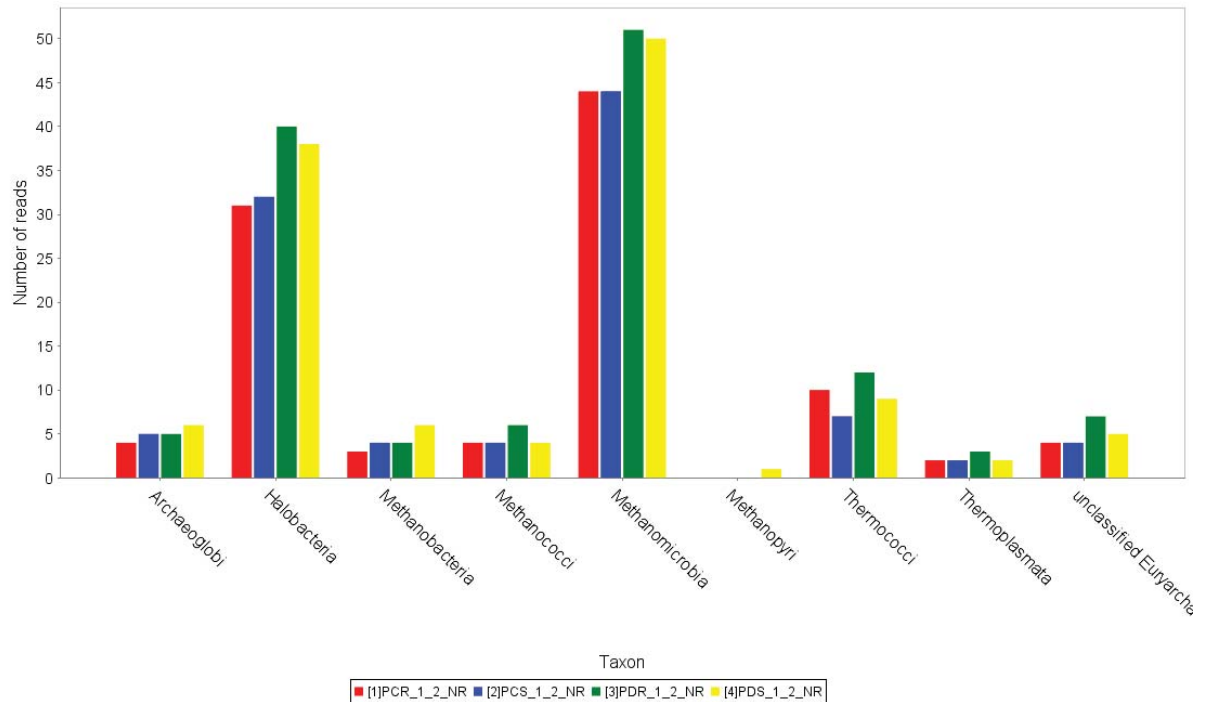


Figura 18 - Abundância das classes do filo Euryarchaeota presentes nos quatro sistemas de manejo gerada pelo programa MEGAN. Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo).

5.2.2.3. Domínio Eucarya

O domínio Eucarya apresentou pequena quantidade de sequências comparativamente ao domínio Bacteria. Os representantes do domínio Eucarya incluíram principalmente sequências de fungos (Fungi), metazoários (Metazoa) e um grande grupo denominado de plantas verdes (Viridiplantae) (Fig. 19).

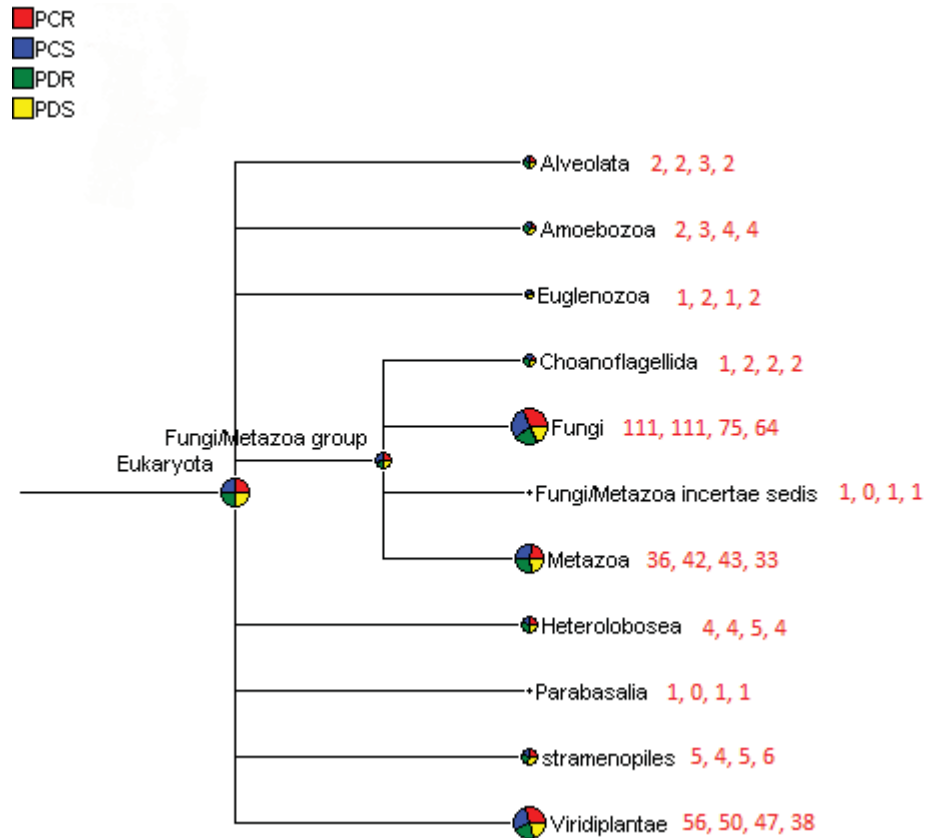


Figura 19 - Árvore comparativa do Domínio Eucarya com nível de classificação de filios gerada pelo programa MEGAN. Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo). O diâmetro do círculo é proporcional à quantidade de sequências.

Entre o reino Fungi, o filo mais abundante foi o Ascomycota (PCR: 155; PCS: 162; PDR: 126; PDS: 106) que compreende uma ampla variedade de saprófitas e endofíticos associados a raízes de plantas. Os representantes mais abundantes desse filo nos quatro metagenomas incluem as espécies de *Phaeosphaeria nodorum* (classe Dothideomycetes), patogênica de plantas de trigo que causa perda de rendimento por diminuir a área foliar verde (Bennett *et al.*, 2005) e *Nectria haematococca* (classe Sordariomycetes), causadora de doenças em plantas (Etebu & Osborn, 2010). Também foram encontradas sequências de espécies do gênero *Sordariales*, incluindo *Chaetomium globosum* (classe Sordariomycetes), que realiza supressão de patógenos pela produção de antibióticos (Di Pietro *et al.*, 1992); *Podospora anserina*, envolvida na degradação fontes de carbono, como lignina e celulose (Espagne *et al.*, 2008) e *Sordaria macrospora*, que é um organismo modelo de fungos, sendo de interesse

biotecnológico (Nowrousian *et al.*, 2010). Outro gênero foi *Aspergillus* (classe Eurotiomycetes), que inclui microrganismos decompositores de matéria orgânica (Omemu *et al.*, 2005) e solubilizadores de fosfato no solo (Asea *et al.*, 1988) (Fig. 20).

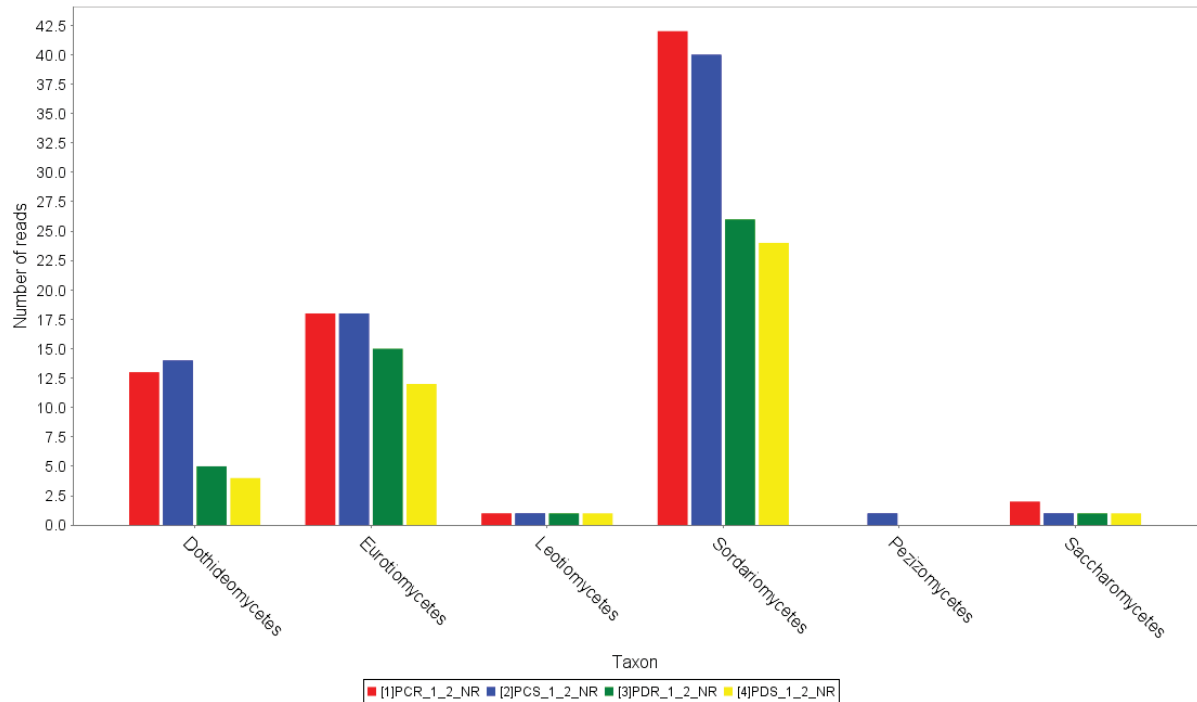


Figura 20 - Abundância das classes do filo Ascomycota presentes nos quatro sistemas de manejo gerada pelo programa MEGAN. Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo).

5.2.2.4. Vírus

As sequências virais apresentaram a menor quantidade nas amostras extraídas dos quatro sistemas de manejo do solo e das culturas, tendo sido representadas pela ordem Caudovirales (Fig.21). Estes são fagos de DNA dupla fita que infectam bactérias e algumas arqueias. Estão envolvidos no controle da abundância e composição das comunidades bacterianas pela lise e alterações na diversidade genética por transdução e conversão lisogênica (Swanson *et al.*, 2009).

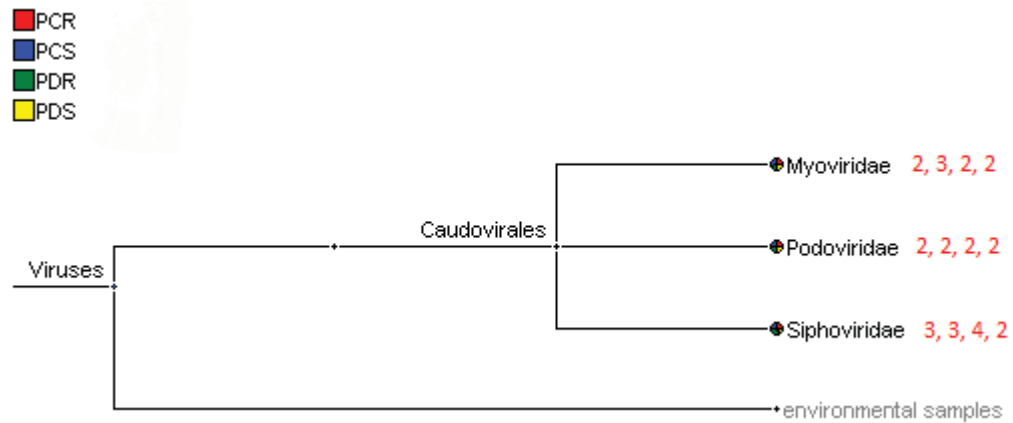


Figura 21 - Árvore comparativa da composição viral, com nível de classificação de família gerada pelo programa MEGAN. Plantio convencional com rotação de culturas (PCR-vermelho); plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul); plantio direto com rotação de culturas (PDR-verde); plantio direto com sucessão de culturas (PDS-amarelo). O diâmetro do círculo é proporcional à quantidade de sequências.

5.2.3. Diversidade Avaliada pela Distância Euclidiana

O número de sequências atribuídas a cada táxon foi comparado entre os solos submetidos aos diferentes manejos estudados através da construção de uma matriz de distância euclidiana, representada em forma de árvore por meio do método de clusterização hierárquica UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Através da matriz de distância euclidiana foi determinada a distância entre os solos submetidos aos diferentes manejos, por similaridade genética, apresentada na figura 22. Dois grupos principais foram observados para os sistemas de manejo do solo, plantio direto e plantio convencional, indicando claramente diferenças na estrutura da comunidade microbiana resultantes da ausência ou presença de práticas de aração ou gradagem. Dentro de cada sistema de manejo do solo, dois subgrupos foram formados, relacionados com a rotação e sucessão de culturas. Portanto, também foi confirmado efeito de manejo da cultura sobre a diversidade, porém menos intenso do que o efeito do manejo do solo.

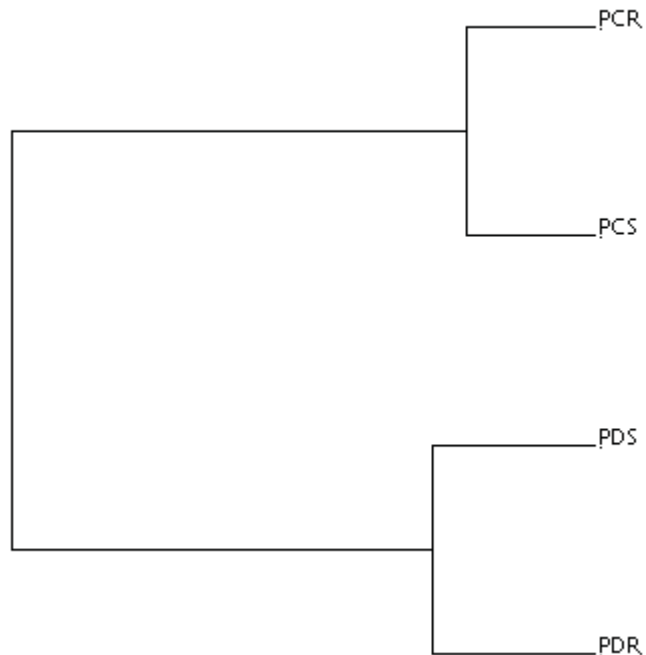


Figura 22 - Agrupamento com base na matriz de distância euclidiana gerada pelo programa MEGAN pelo método de clusterização hierárquica UPGMA, a partir das sequências de DNA de amostras de solo submetido aos sistemas de manejo. Plantio convencional em rotação de culturas (PCR), plantio convencional em sucessão de culturas (PCS), plantio direto em sucessão de culturas (PDS) e plantio direto em rotação de culturas (PDR).

5.3. COMPARAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS DE MANEJO DO SOLO E DAS CULTURAS

5.3.1. Análise Estatística entre os Sistemas de Manejo

As análises estatísticas no programa STAMP mostraram que houve diferenças significativas entre as ordens microbianas nos quatro sistemas de manejo, na comparação dos tratamentos em pares. Comparando os solos sob os manejos de culturas em rotação e sucessão em plantio direto foram constatados valores significativamente superiores nas ordens Actinomycetales, Ktedonobacterales e Methanosarcinales no plantio direto em sucessão de culturas. Já as ordens Verrucomicrobiales, Flavobacterales, Planctomycetales, Puniceococcales, Nitrospirales, Cytophagales, Methyacidiphilales e Sphingomonadales foram superiores em solos sob plantio direto com rotação de culturas (Fig. 23).

Na comparação entre os sistemas de manejo em solo sob plantio direto e plantio convencional em rotação de culturas, o plantio direto em rotação foi

significativamente superior na proporção de Verrucomicrobiales, Planctomycetales, Desulfuromonadales, Rhizobiales, Ktedonobacterales, Nostocales, Myxococcales, Syntrophobacterales, Chroococcales, Oscillatoriales, Methanomicrobiales, Desulfobacterales, Thermoanaerobacterales, Nitrospirales, Methanosarcinales, Methylacidiphilales, Thiotrichales, Chloroflexales, Desulfovibrionales, Elusimicrobiales, Legionellales, Eucoccidiorida, Bacillales e Thermales. Já em solo sob plantio convencional em rotação de culturas as ordens significativas com maior frequência foram Sphingomonadales, Solirubrobacterales, Burkholderiales, Caulobacterales, Xanthomonadales, Rhodocyclales, Methylophilales, Pleosporales, Bacteroidales, Gallionellales, Sphingobacterales, Nitrosomonadales, Deinococcales e Neisseriales (Fig. 24).

Comparando os solos sob os manejos plantio convencional e plantio direto em sucessão de culturas, 28 ordens foram mais frequentes no plantio direto: foram encontrados as ordens Actinomycetales, Ktedonobacterales, Rhizobiales, Acidobacterales, Verrucomicrobiales, Methanosarcinales, Desulfuromonadales, Myxococcales, Oscillatoriales, Methanococcales, Desulfovibrionales, Thermomicrobiales, Sphaerobacterales, Syntrophobacterales, Planctomycetales, Nostocales, Chroococcales, Thermococcales, Thermoanaerobacterales, Solibacterales e Bacillales. Já o plantio convencional resultou em maior proporção das ordens Sphingomonadales, Solirubrobacterales, Caulobacterales, Burkholderiales, Xanthomonadales, Bacteroidales, Neisseriales, Methylophilales, Sphingobacterales, Pleosporales, Nitrosomonadales, Pseudomonadales, Malpighiales, Rubrobacterales, Cytophagales, Rhodocyclales, Flavobacterales, Rhodospirillales, Alteromonadales, Gallionellales, Dictyoglomales e Chlorobiales (Fig. 25).

Na comparação entre os solos sob manejos de culturas com sucessão e rotação em plantio convencional foi constatado que as ordens Sphingomonadales, Thermoanaerobacterales, Dictyoglomales, Schizosacchamomycetales, Oceanospirillales e Chloroflexales foram significativamente superiores em sucessão de culturas. Já Acidobacterales e Solibacterales estiveram em maior frequência em solos sob rotação de culturas (Fig. 26).

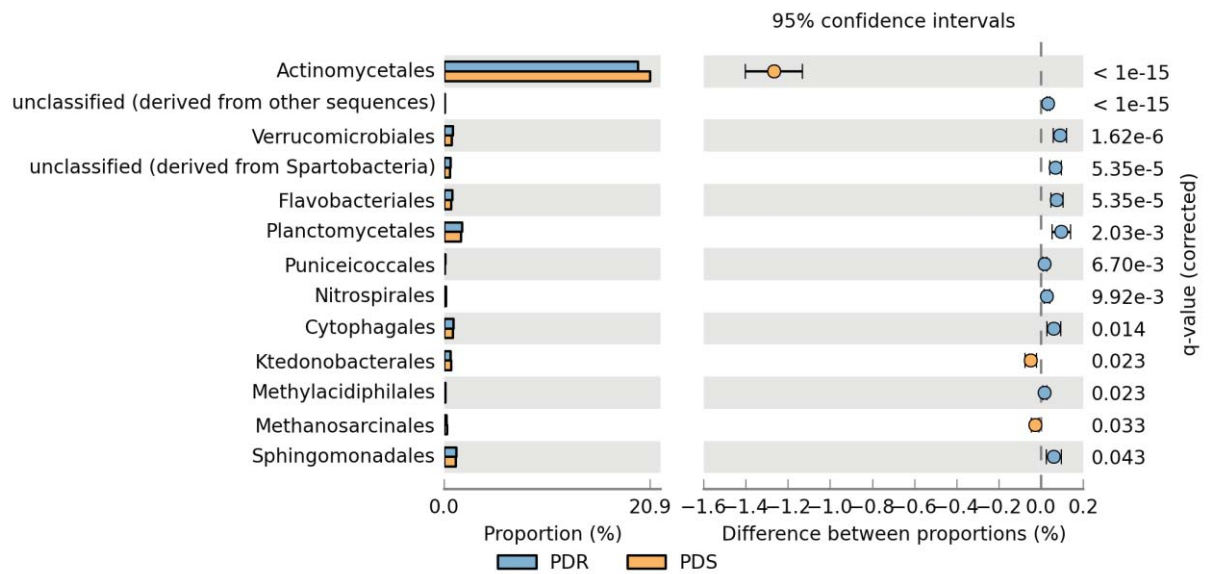


Figura 23 - Diferenças significativas entre as ordens de microrganismos presentes nos solos sob os manejos de cultura rotação e sucessão em plantio direto. O gráfico da esquerda mostra a proporção de sequências atribuídas, enquanto que o gráfico da direita mostra a significância da diferença entre as proporções com intervalo de confiança de 95% gerado pelo programa STAMP. Plantio direto com rotação de culturas (PDR-azul) e plantio direto com sucessão de culturas (PDS-laranja).

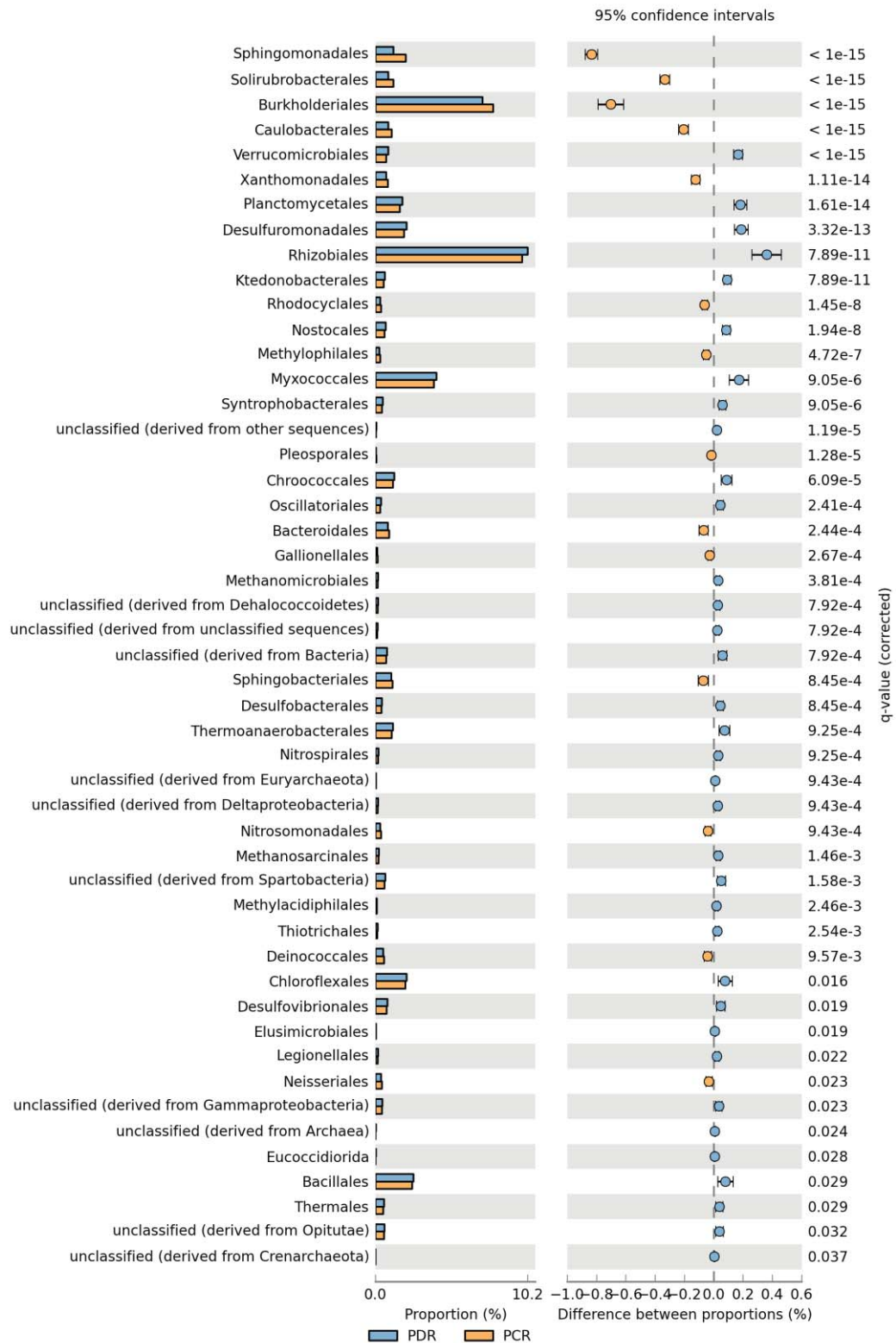


Figura 24 - Diferenças significativas entre as ordens de microrganismos presentes nos solos sob os manejos de plantio direto em rotação de culturas com plantio convencional em rotação de culturas. O gráfico da esquerda mostra a proporção de sequências atribuídas, enquanto que o gráfico da direita mostra a significância da diferença entre as proporções com intervalo de confiança de 95% gerado pelo programa STAMP. Plantio direto com rotação de culturas (PDR-azul) e plantio convencional com rotação de culturas (PCR-laranja).

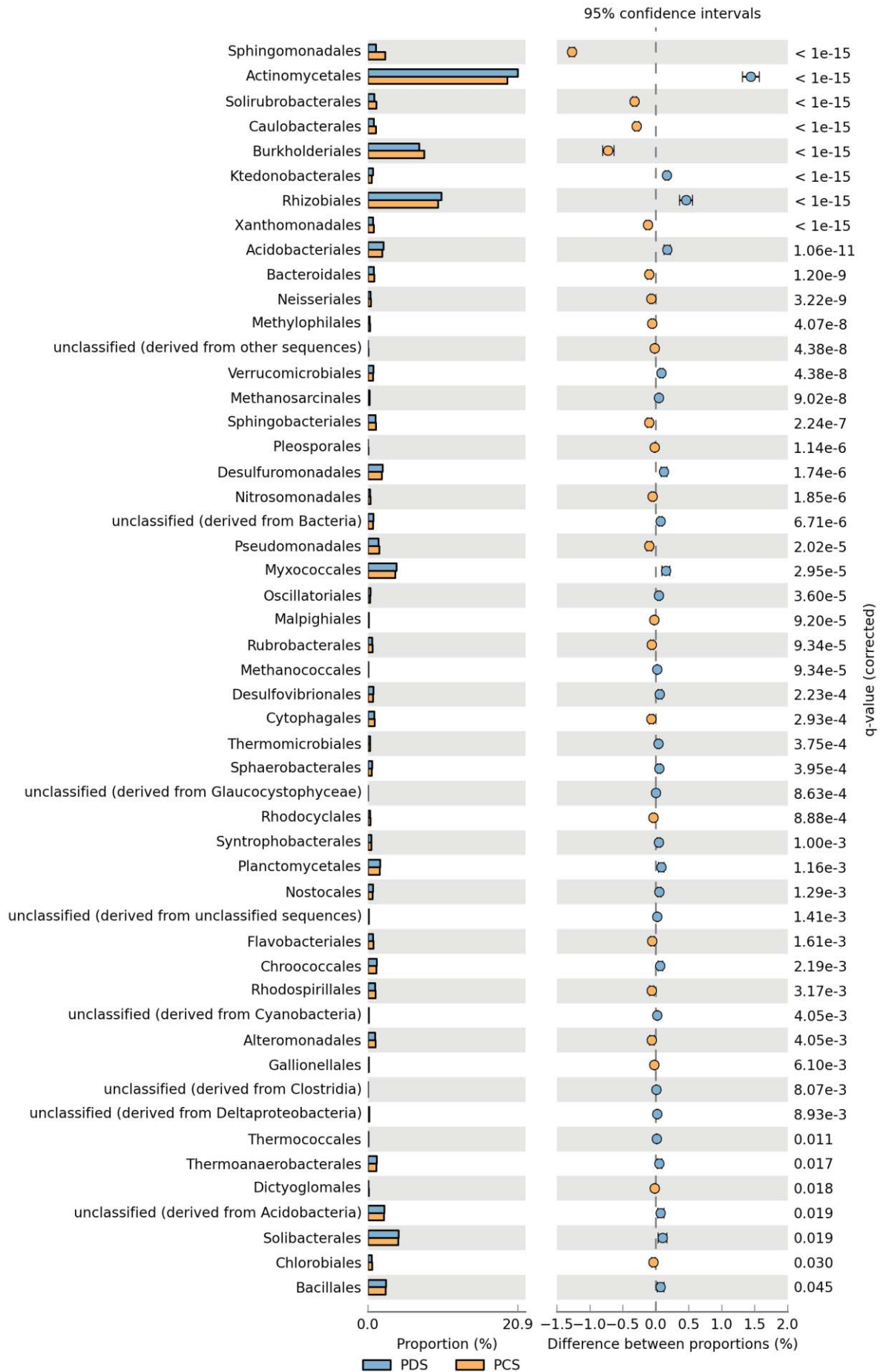


Figura 25 - Diferenças significativas entre as ordens de microrganismos presentes nos solos sob os manejos de plantio convencional em sucessão de culturas com plantio direto em sucessão de culturas. O gráfico da esquerda mostra a proporção de sequências atribuídas, enquanto que o gráfico da direita mostra a significância da diferença entre as proporções com intervalo de confiança de 95% gerado pelo programa STAMP. Plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul) e plantio direto com sucessão de culturas (PDS-laranja).

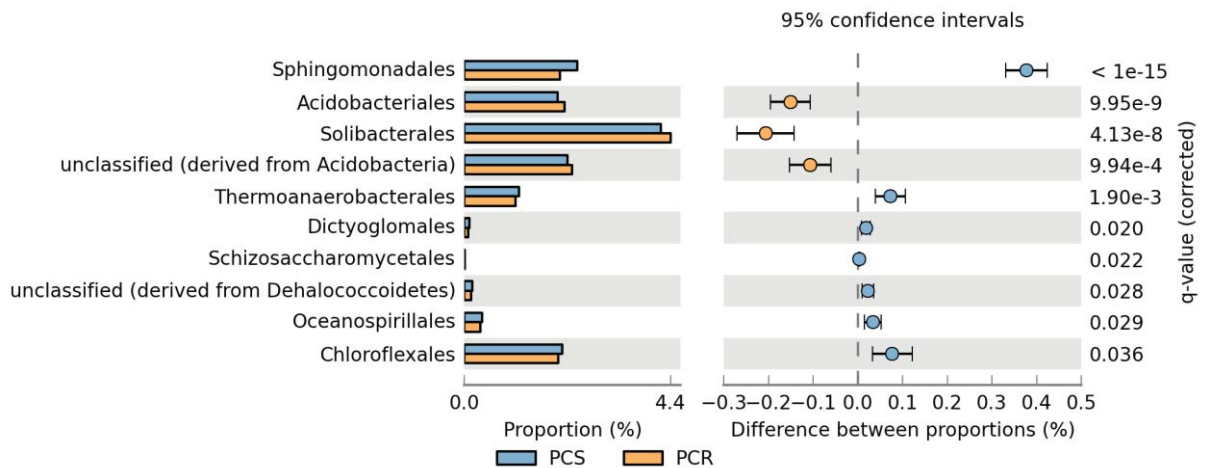


Figura 26 - Diferenças significativas entre as ordens de microrganismos presentes nos solos sob os manejos de cultura sucessão e rotação em plantio convencional. O gráfico da esquerda mostra a proporção de sequências atribuídas, enquanto que o gráfico da direita mostra a significância da diferença entre as proporções com intervalo de confiança de 95% gerado pelo programa STAMP. Plantio convencional com sucessão de culturas (PCS-azul) e plantio convencional com rotação de culturas (PCR-laranja).

6. DISCUSSÃO

Os solos submetidos aos sistemas de manejo do solo e de culturas apresentaram grande diversidade de sequências de microrganismos. Embora em termos gerais a distribuição taxonômica das comunidades tenha sido semelhante nos quatro tratamentos estudados nesse trabalho, diferenças significativas entre ordens dessas comunidades foram obtidas estatisticamente pelo programa STAMP.

Independente dos métodos de análise, tem sido observado que alguns microrganismos predominam naturalmente nos solos, como os constituintes dos filos Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Bacteroidetes, Chloroflexi, Planctomycetes, Gemmatimonadetes e Firmicutes do domínio Bacteria, sendo que o filo Proteobacteria sempre se destaca por ser o mais numeroso (Janssen, 2006). Os resultados obtidos nesse trabalho também revelaram o filo Proteobacteria como o dominante nos quatro metagenomas, com mais de 60 mil sequências atribuídas, sendo mais abundantes no solo sob plantio convencional tanto com rotação como com sucessão de culturas. Esse filo também foi dominante em solos do Kansas, EUA (Yin *et al.*, 2010) com 20.180 sequências, onde não foram influenciadas pelo efeito do manejo do solo e de culturas.

As ordens de Proteobacteria que apresentaram maior abundância em solos sob plantio convencional com rotação e sucessão de culturas foram Caulobacterales (Alfa), Sphingomonadales (Alfa), Rhodospirillales (Alfa), Burkholderales (Beta), Neisseriales (Beta), Nitrosomonadales (Beta), Rhodocyclales (Beta), Pseudomonadales (Gamma) e Xanthomonadales (Gamma) (Fig. 10-13). Houve diferença estatística entre a ocorrência dessas ordens nos solos sob plantio convencional em rotação e sucessão de culturas quando comparados com os outros sistemas de manejo (Fig. 24 e 25). A maior abundância dessas ordens pode estar relacionada à funcionalidade no solo. Dentre as funções, pode-se citar que os solos sob plantio convencional apresentam menores teores de nitrogênio e carbono e, a maioria dessas bactérias pode ter sofrido maior pressão de seleção para desempenhar funções associadas ao ciclo do carbono e nitrogênio e, por isso, presentes em maior quantidade. Os solos sob plantio convencional possuem menor conteúdo de carbono (Wright *et al.*, 2008), já que os restos culturais são rapidamente metabolizados no solo, pois a decomposição da matéria orgânica é facilitada.

As diferenças constatadas pelo manejo das culturas foi inferior às observadas entre os manejos de solo. Contudo, algumas ordens foram mais

favorecidas pelo manejo de culturas, como Xanthomonadales (Gamma) em solos com rotação de culturas e Pseudomonadales (Gamma) em solos com sucessão de culturas. Por sua vez, as ordens Chromatiales (Gamma) e Rhizobiales (Alfa) predominaram nos solos sob plantio direto em rotação e sucessão de culturas (Fig. 10 e 13), o que é interessante observar, já que o processo de fixação biológica do nitrogênio é de grande relevância para a agricultura, particularmente no caso da soja no Brasil, no qual a ordem Rhizobiales está envolvida. Também predominou nos solos sob plantio direto em rotação e sucessão de culturas todas as ordens da classe Deltaproteobacteria- Myxococcales, Desulfuromonadales, Desulfovibrionales, Desulfobacterales e Syntrophobacterales (Fig. 12). Essas ordens também diferiram estatisticamente em solos sob plantio direto em rotação e sucessão de culturas quando comparados com os outros solos manejados (Fig. 24 e 25). A ordem Myxococcales foi a mais numerosa da classe Deltaproteobacteria e mostrou ser influenciada no solo pelo manejo das culturas, sendo favorecida em solos com rotação de culturas mesmo sob plantio convencional (Fig. 12). Solos sob plantio direto, principalmente em rotação de culturas apresentam maior disponibilidade de matéria orgânica, o que pode ter favorecido os constituintes da ordem Myxococcales, já que microrganismos dessa ordem estão envolvidos na mineralização e sequestro de carbono em solos através da incorporação de carbono na biomassa microbiana (Lueders *et al.*, 2006). Yin *et al.* (2010) também observaram a predominância da ordem Myxococcales em solos submetidos ao plantio direto e convencional em rotação de culturas.

O filo Actinobacteria foi muito numeroso nos quatro metagenomas, mas presente em maior número em solo sob plantio direto com sucessão de culturas (Fig. 14), sendo estatisticamente significativo neste manejo quando comparado com os outros sistemas de manejo (Fig. 23 e 25). A maioria dos microrganismos encontrados desse filo foi pertencente à subclasse Actinobacteridae, que inclui microrganismos com morfofisiologia e propriedades metabólicas diversas (Ventura *et al.*, 2007), com algumas espécies envolvidas no processo de fixação biológica de nitrogênio em plantas, além da capacidade de formação de variados metabólitos secundários para metabolização de vários biopolímeros como a celulose, quitina e pectina que são importantes fontes de carbono orgânico no solo. Assim, em solos sob plantio direto, que são mais ricos em matéria orgânica em comparação com os solos sob plantio convencional, a ação desses microrganismos tem papel importante

no auxílio da decomposição da matéria orgânica e no desenvolvimento das plantas, além de representarem uma fonte valiosa de substâncias para fins biotecnológicos.

O filo Acidobacteria também foi abundante no solo nos quatro sistemas de manejo, principalmente em plantio convencional com rotação e sucessão de culturas (Fig. 8). A ordem Solibacterales foi a mais numerosa do filo em solos sob plantio convencional em sucessão de culturas, principalmente em rotação de culturas (Fig. 15). Foi observada diferença estatística dessa ordem em solo sob plantio convencional com rotação de culturas quando comparado com solo sob plantio convencional em sucessão de culturas (Fig. 26) e com plantio direto em sucessão de culturas (anexo 2). Contudo, não houve diferenças significativas em solos sob plantio convencional em sucessão de culturas quando comparados com solos sob plantio direto em sucessão de culturas (Fig. 25) e rotação de culturas (anexo 1). Já a ordem Acidobacterales foi mais abundante em solos sob plantio direto com rotação e, principalmente com sucessão de culturas (Fig. 15). Houve diferenças significativas em solo sob plantio direto em sucessão de culturas quando comparado com solo sob plantio convencional em sucessão de culturas (Fig. 25). Também houve diferença estatística em solo sob plantio direto em rotação de culturas quando comparado com solo sob plantio convencional em sucessão de culturas (anexo 1). Contudo, foi estatisticamente maior no solo sob plantio convencional com rotação de culturas quando comparado com o solo sob plantio convencional com sucessão de culturas (Fig. 26).

Em solos sob plantio convencional há menor disponibilidade de fontes de energia e nutrientes e água disponível, em comparação ao plantio direto (Valpassos *et al.*, 2001). Os constituintes do filo Acidobacteria, apesar de ainda não existirem muitos estudos, são capazes de se adaptarem em ambientes pobres em nutrientes e com frequentes flutuações hídricas, como é o caso dos solos sob plantio convencional. Além disso, esses microrganismos são capazes de utilizar substratos variados como fonte de energia e carbono, além de serem tolerantes a mudanças hídricas do solo (Ward *et al.*, 2009). Sugere-se que microrganismos desse filo sejam metabolicamente ativos no solo, estando envolvidos nos ciclos biogeoquímicos na rizosfera (Lee *et al.*, 2008). Assim, pode-se dizer que esses microrganismos são muito importantes como componentes da microbiota do solo e existe a real necessidade de surgirem novos estudos para melhor compreensão no ambiente em que eles são encontrados. Em 2009, Ward e colaboradores sequenciaram o genoma

de três acidobactérias e foram encontrados genes para redução de nitrato e nitrito, genes associados à capacidade de sequestrar Fe^{2+} no solo, além de genes para produção de novos compostos antimicrobianos e proteínas. Portanto, o manejo de solo sob plantio convencional não influenciou negativamente a presença da maioria dos microrganismos constituintes do filo Acidobacteria, o que pode ser devido à ampla gama de substratos utilizados pelas acidobactérias.

Outros filios foram menos abundantes nos solos sob os sistemas de manejo, porém não menos importantes. Entre eles, Gemmatimonadetes, Bacteroidetes e Nitrospirae apresentaram maior abundância em solos sob plantio convencional em rotação e sucessão de culturas. Já os filios Verrucomicrobia, Chloroflexi, Cyanobacteria, Firmicutes e Planctomycetes apresentaram maior abundância no solo sob plantio direto em rotação e em sucessão de culturas. Neste último caso, como muitas dessas bactérias auxiliam na conversão do nitrogênio atmosférico a formas que possam ser utilizadas pelas plantas, elas podem ser mais sensíveis a impactos agrícolas, como os distúrbios mecânicos causados nas operações de aração e gradagem e o decréscimo da sua abundância no plantio convencional pode resultar em impactos relevantes na sustentabilidade agrícola.

O domínio Archaea ainda é pouco conhecido nos solos. Constituintes deste domínio foram isolados inicialmente em ambientes extremos e, por isso, grande parte das pesquisas ainda se concentra nesses ambientes. Talvez, por esse motivo, pequena quantidade de sequências tenha sido atribuída ao domínio Archaea nesse trabalho a partir da comparação com o banco de dados. Todos os constituintes de Archaea apresentaram maior número de sequências no solo sob plantio direto com rotação de culturas (Fig. 17). Além disso, também houve sequências não classificadas provenientes de Archaea estatisticamente significativas em solos sob plantio direto com rotação de culturas quando comparados com solos sob plantio convencional com sucessão (anexo 1) e com rotação de culturas (Fig. 24). O filo dominante de Archaea nos metagenomas foi o Euryarchaeota, cujos representantes compreendem as arqueias metanogênicas, que habitam ambientes com maiores teores de matéria orgânica como é o caso do solo sob plantio direto com rotação de culturas, mas principalmente com rotação de culturas. A classe Thermococci foi visivelmente favorecida pelo manejo de culturas, em solos com rotação de culturas, mesmo sob plantio convencional (Fig. 18). A degradação da matéria orgânica pelas comunidades de Archaea leva a altas emissões de metano para a atmosfera na

ausência de oxigênio e, pouco se conhece sobre as interações entre essas comunidades e a matéria orgânica do solo sob diferentes tipos de manejo.

Os filos Thaumarchaeota e Crenarchaeota apresentaram-se em reduzida quantidade nos quatro sistemas de manejo e, assim como Euryarchaeota, eles também são constituídos por arqueias que vivem em ambientes ricos em matéria orgânica. Em trabalhos avaliando a diversidade de Archaea em diversos tipos de solo, o filo Crenarchaeota costuma ser predominante (Bates *et al.*, 2010), o que não foi observado neste trabalho, pois Crenarchaeota foi o segundo filo mais numeroso. Pazinato *et al.* (2010), pesquisando a diversidade de Archaea em solos da Amazônia, também encontraram que em todas as profundidades de solo, a maioria das sequências de Archaea foram classificadas como Crenarchaeota. Espécies de Crenarchaeota foram detectadas em abundância em rizosfera de tomate (Simon *et al.*, 2000) e milho (Chelius & Triplett, 2001), mantendo associações benéficas entre as plantas. Por sua vez, os constituintes do filo Thaumarchaeota, encontrados em menor quantidade, são conhecidos por estarem associados à nitrificação. Stopnisek *et al.* (2010) relataram representantes desse filo realizando oxidação da amônia no solo de pântano, mesmo a amônia estando em baixas concentrações no solo, o que dificulta o processo de oxidação. Desse modo, os representantes do domínio Archaea podem ter sido favorecidos em solos sob plantio direto pela maior disponibilidade de matéria orgânica no solo e pelo menor distúrbio causado pelas práticas agrícolas. Além disso, podem ser mais sensíveis aos impactos agrícolas, consequentemente poderiam ser utilizados como bioindicadores de qualidade do solo, para o monitoramento do impacto de práticas agrícolas, pois permitiram a detecção de diferenças entre os manejos de solo e das culturas.

O Reino Fungi, domínio Eucarya, possui um número estimado de 1,5 milhão de espécies existentes no planeta, do qual 1,43 milhão ainda permanece desconhecido (Hawksworth, 1991; Hawksworth, 2001). Esses microrganismos apresentam atividades essenciais ao desenvolvimento dos ecossistemas, além de serem economicamente muito importantes devido à ampla diversidade de espécies, morfologias, ecologias e estratégias de sobrevivência. No solo, a composição das comunidades fúngicas pode ser afetada por fatores, como por exemplo, tipo do solo e espécies de plantas presentes (Broeckling *et al.*, 2008). Nesse estudo, os fungos apresentaram maior quantidade de sequências classificadas no domínio Eucarya, sendo a maioria para classe Sordariomycetes do filo Ascomycota, que inclui

patógenos e endofíticos de plantas, patógenos de animais e micoparasitas (Zhang *et al.*, 2006). Resultados semelhantes também foram obtidos por Castro *et al.* (2008) em solos agrícolas do Cerrado, onde estudaram diversidade de comunidades fúngicas. Mesmo que o Reino Fungi tenha apresentado maior quantidade de sequências, o número de sequências totais do domínio Eucarya foi muito pequeno, o que não é muito comum de acontecer em ecossistemas terrestres, já que nesses ambientes os fungos são responsáveis por quantidade significativa de biomassa microbiana. Essa pequena quantidade pode ser devido à existência de um número reduzido de organismos sequenciados desse grupo nesse ambiente, ou até mesmo na dificuldade de extração do DNA devido à formação de esporos. Assim, é possível que este grupo esteja sub-representado nas análises metagenômicas dos solos sob os diferentes sistemas de manejo.

Outro resultado inesperado foi que os solos sob o manejo de plantio convencional favoreceram a presença dos constituintes do domínio Eucarya, onde as sequências atribuídas ao reino Fungi apresentaram-se em maior abundância no plantio convencional com rotação e sucessão de culturas. O manejo das culturas também apresentou efeito para os fungos, pois apresentaram maior número em solos com rotação de culturas sob plantio direto e plantio convencional (Fig. 20). Acreditava-se que os fungos seriam favorecidos pelo plantio direto, pela menor perturbação do solo, permitindo a preservação de hifas fúngicas. Castro *et al.* (2008) constataram que solos convertidos a massivas práticas agrícolas causam a diminuição da diversidade fúngica, quando comparados aos solos nativos. Também foi levantada a hipótese de que o maior sequestro de carbono em solo sob plantio direto deveria estar associado à comunidade fúngica, o que também não foi confirmado em nosso estudo. Por outro lado, a maior quantidade de fungos no plantio convencional pode estar relacionada à maior tolerância a estresses ambientais, incluindo a produção de esporos.

As partículas virais são muito abundantes no planeta, com valor estimado de 10^{30} na biosfera (Brussow & Hendrix, 2002) e desempenham importantes funções nos ambientes. Os fagos contribuem no controle e evolução das comunidades bacterianas e de arqueias. No entanto, poucos estudos são direcionados à diversidade e impacto desses fagos nos solos. Neste estudo, os vírus apresentaram quantidade muito pequena de sequências, sendo que nos quatro metagenomas, a maioria delas foi classificada para a ordem Caudovirales, que compreende os

bacteriófagos. Resultados semelhantes também foram encontrados por Williamson et al. (2005), estudando a diversidade de vírus em solos agrícolas e florestais. Nesse estudo, nos solos submetidos aos diferentes sistemas de manejo (do solo e de culturas), foi observada certa homogeneidade quanto ao número de sequências atribuídas aos vírus, embora em pequena quantidade. Pouco se conhece sobre a abundância e a distribuição dos vírus no solo, no entanto já foi constatado que são diretamente influenciados pelo manejo (Williamson *et al.*, 2005), o que pode causar alterações nas condições químicas e físicas do solo, podendo ser benéfica ou não à adsorção viral no solo. Dessa forma, populações de fagos no solo também são de interesse agrônômico. Estudos de fagos que infectam bactérias não resistentes de *Rhizobium* spp. e *Bradyrhizobium* spp. mostraram que pode haver alteração direta na formação de nódulos e no rendimento de leguminosas (Abebe *et al.*, 1992; Appunu & Dhar, 2008). No entanto, também pode ser uma forma de auxílio na seleção as linhagens mais eficientes no processo de fixação biológica do nitrogênio (Jaiswal & Dhar, 2011). Por outro lado, fagos que infectam bactérias patogênicas podem atuar no biocontrole de doenças em plantas.

Grande parte das sequências não foi classificada em nenhum domínio. Essas sequências não foram semelhantes a outras sequências já depositadas no banco de dados do GenBank, ou seja, representam uma porcentagem de microrganismos que ainda permanece desconhecida, incluindo aqueles que não foram identificados por serem limitados ao crescimento em meios de cultivo em laboratório. Esse resultado é comum em estudos de metagenômica, por exemplo Venter et al. (2004), que estudando o metagenoma do oceano de Sargasso encontrou milhões de sequências de microrganismos desconhecidos. Neste estudo, o solo submetido ao plantio direto em rotação de culturas apresentou maior número dessas sequências desconhecidas, o que indica a presença de uma enorme diversidade de microrganismos com muitas espécies e genes ainda não descobertos que podem ser melhor explorados em solos sob esse manejo.

7. OBSERVAÇÕES FINAIS

Por meio da metagenômica foi possível obter algumas informações sobre a diversidade e abundância de microrganismos de solos submetidos a diferentes manejos do solo e das culturas.

Os diferentes solos estudados submetidos aos sistemas de manejo apresentaram diferenças na composição das comunidades microbianas. Em geral, o manejo do solo (plantio direto e plantio convencional) apresentou maiores diferenças na abundância microbiana entre os domínios nos solos do que o manejo das culturas (rotação e sucessão de culturas). O manejo das culturas favoreceu alguns microrganismos como na classe Thermococci do filo Euryarchaeota de Archaea, onde foi observado maior abundância em solos com rotação de culturas, tanto sob plantio direto como em plantio convencional.

As principais diferenças foram atribuídas ao manejo do solo. Os domínios Eucarya e Bacteria apresentaram, em geral, maior abundância em solos sob plantio convencional, enquanto que o domínio Archaea foi mais abundante em solos sob plantio direto. As semelhanças observadas dentro de cada manejo do solo aos sistemas de rotação e sucessão de culturas podem indicar que o manejo do solo tem uma ação muito mais forte e predominante do que a cobertura.

Os solos submetidos ao plantio convencional em rotação e sucessão de culturas apresentaram grande quantidade de bactérias principalmente das classes Alfa, Beta e Gammaproteobacteria. Além disso, apresentaram maior número de fungos, o que pode estar relacionado à maior resistência a ambientes sob estresse devido a formação de esporos. Por sua vez, os solos sob plantio direto em rotação e sucessão de culturas também apresentaram grande diversidade de comunidades bacterianas, mas em maior quantidade para a classe Deltaproteobacteria e para a ordem Rhizobiales (Alfa), que inclui microrganismos de grande importância agrícola, relacionados à fixação biológica do nitrogênio. Além disso, apresentaram maior número de arqueias, indicando que esses microrganismos podem ser mais sensíveis aos impactos agrícolas gerados no plantio convencional e, inclusive, poderiam ser utilizados como bioindicadores de impacto do manejo dos solos.

Também foi observado um grande número de sequências de microrganismos ainda não conhecidos, representando 46,1% das sequências totais encontradas, sendo em maior número no solo sob plantio direto em rotação de

culturas. Isso indica a grande quantidade de comunidades microbianas presentes nesses solos, com a possível existência de muitos filos desconhecidos que ainda podem ser explorados.

Não se pode afirmar que a diversidade de microrganismos esteja relacionada com a produtividade agrícola. Porém sabe-se que os microrganismos, cada qual com sua especificidade, contribuem para a manutenção e equilíbrio do solo, auxiliando nos processos essenciais ao desenvolvimento das plantas. Dessa forma, conhecer quem está presente no solo ajuda a entender melhor os processos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEBE, H. M.; SADOWSKY, M. J.; KINKLE, B. K.; SCHMIDT, E. L. Lysogeny in *Bradyrhizobium japonicum* and its effect on soybean nodulation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.10, p.3360-3366, 1992.
- ALLEN, H. K.; MOE, L. A.; RODBUMRER, J.; GAARDER, A.; HANDELSMAN, J. Functional metagenomics reveals diverse β -lactamases in a remote Alaskan soil. **The International Society for Microbial Ecology Journal**, v.3, p.243-251, 2009.
- ALVARENGA, M. I. N.; SIQUEIRA, J. O.; DAVIDE, A. C. Teor de carbono, biomassa microbiana, agregação e micorriza em solos de cerrado com diferentes usos. **Ciência e Agrotecnologia**, v.23, n.3, p.617-625, 1999.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v.59, n.01, p.143-169, 1995.
- APPUNU, C.; DHAR, B. Isolation and symbiotic characteristics of two Tn5-derived phage-resistant *Bradyrhizobium japonicum* strains that nodulate soybean. **Current Microbiology**, v.57, p.212-217, 2008.
- ARRIGO, K. R. Marine microorganisms and global nutrient cycles. **Nature**, v.437, p.349-355, 2005.
- ARUMUGAM, M.; HARRINGTON, E. D.; FOERSTNER, K. U.; RAES, J.; BORK, P. SmashCommunity: A metagenomic annotation and analysis tool. **Bioinformatics**, p.1-2, 2010.
- ASEA, P. E. A.; KUCEY, R. M. N.; STEWART, J. W. B. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.20, n.4, p.459-464, 1988.
- ATTARD, E.; POLY, F.; COMMEAUX, C.; LAURENT, F.; TERADA, A.; SMETS, B. F.; RECOUS, S.; LE ROUX, X. Shifts between *Nitrospira*- and *Nitrobacter*-like nitrite oxidizers underlie the response of soil potential nitrite oxidation to changes in tillage practices. **Environmental Microbiology**, v.12, n.2, p.315-326, 2010.
- BALOTA, E. L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D. S.; HUNGRIA, M. Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.22, p.641-649, 1998.
- BAREA, J.-M.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.81, p.343-351, 2002.
- BATES, S. T.; BERG-LYONS, D.; CAPORASO, J. G.; WALTERS, W. A.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. **The International Society for Microbial Ecology Journal**, p.1-10, 2010.

- BEARE, M. H.; COLEMAN, D. C.; CROSSLEY JR, D. A.; HENDRIX, P. F.; ODUM, E. P. A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. **Plant and Soil**, v.170, p.5-22, 1995.
- BENNETT, R. S.; MILGROOM, M. G.; BERGSTROM, G. C. Population structure of seedborne *Phaeosphaeria nodorum* on New York wheat. **Phytopathology**, v.95, n.3, p.300-305, 2005.
- BETTIOL, W.; GHINI, R.; GALVÃO, J. A. H.; LIGO, M. A. V.; MINEIRO, J. L. C. Soil organisms in organic and conventional cropping systems. **Scientia Agricola**, v.59, n.3, p.565-572, 2002.
- BOEHM, M. J.; MADDEN, L. V.; HOITINK, H. A. J. Effect of organic matter decomposition level on bacterial species diversity and composition in relationship to pythium damping-off severity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.12, p.4171-4179, 1993.
- BONKOWSKI, M. Protozoa and plant growth: the microbial loop in soil revisited. **New Phytologist**, v. 162, p.617-631, 2004.
- BRADY, A.; SALZBERG, S. L. Phymm and phymmBL: metagenomic phylogenetic classification with interpolated Markov models. **Nature Methods**, v.6, n.9, p.673-676, 2009.
- BROECKLING, C. D.; BROZ, A. K.; BERGELSON, J.; MANTER, D. K.; VIVANCO, J. M. Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.3, p.738-744, 2008.
- BROWN, G. G.; HUNGRIA, M.; OLIVEIRA, I. J.; BUNNING, S.; MONTANEZ, A. **International technical workshop on biological management of soil ecosystems for sustainable agriculture: program, abstracts and related documents**. Londrina: Embrapa/FAO, 2002.
- BRUSSOW, H.; HENDRIX, R. W. Phage genomics: small is beautiful. **Cell**, v.108, p.13-16, 2002.
- BUCKLEY, D. H.; SCHMIDT, T. M. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. **Environmental Microbiology**, v.5, n.6, p.441-452, 2003.
- CÁCERES, T. P.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. Biodegradation of the pesticide fenamiphos by ten different species of green algae and cyanobacteria. **Current Microbiology**, v.57, p.643-646, 2008.
- CARTER, M. R. Microbial biomass as an index for tillage-induced changes in soil biological properties. **Soil and Tillage Research**, v.7, p.29-40, 1986.
- CASTRO, A. P.; QUIRINO, B. F.; PAPPAS-JR, G.; KUROKAWA, A. S.; LEONARDECZ-NETO, E.; KRUGER, R. H. Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture fields. **Archives of Microbiology**, v.190, p.129-139, 2008.

- CATTELAN, A. J.; GAUDÊNCIO, C. A.; SILVA, T. A. Sistemas de rotação de culturas em plantio direto e os microrganismos do solo, na cultura da soja, em Londrina. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.21, p.293-301, 1997.
- CHAIA, E. E.; WALL, L. G.; HUSS-DANEL, K. Life in soil by the actinorhizal root nodule endophyte *Frankia*. **Symbiosis**, v.51, p.201-226, 2010.
- CHAKRABORTY, R.; O'CONNOR, S. M.; CHAN, E.; COATES, J. D. Anaerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene compounds by *Dechloromonas* strain RCB. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.12, p.8649-8655, 2005.
- CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. The diversity of Archaea and Bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, v.41, p.252-263, 2001.
- CHEN, M. Y.; WU, S. H.; LIN, G. H.; LU, C. P.; LIN, Y. T.; CHANG, W. C.; TSAY, S. S. *Rubrobacter taiwanensis* sp. nov., a novel thermophilic, radiation-resistant species isolated from hot springs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.1849-1855, 2004.
- CHOU, H. H.; HOLMES, M. H. DNA sequence quality trimming and vector removal. **Bioinformatics**, v.17, n.12, p.1093-1104, 2001.
- CHOW, M. L.; RADOMSKI, C. C.; MCDERMOTT, J. M.; DAVIES, J.; AXELROOD, P. E. Molecular characterization of bacterial diversity in Lodgepole pine (*Pinus contorta*) rhizosphere soils from British Columbia forest soils differing in disturbance and geographic source. **FEMS Microbiology Ecology**, v.42, p.347-357, 2002.
- COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, v.5, p.719-729, 2003.
- COMPANT, S.; BRION, D.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.9, p.4951-4959, 2005.
- COTTRELL, M. T.; WALDNER, L. A.; YU, L.; KIRCHMAN, D. L. Bacterial diversity of metagenomic and PCR libraries from the Delaware River. **Environmental Microbiology**, v.7, n.12, p.1883-1895, 2005.
- COUTO, G. H.; GLOGAUER, A.; FAORO, H.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Isolation of a novel lipase from a metagenomic library derived from mangrove sediment from the south Brazilian coast. **Genetics and Molecular Research**, v.9, n.1, p.514-523, 2010.
- CURTIS, T. P.; SLOAN, W. T.; SCANNELL, J. W. Estimating prokaryotic diversity and its limits. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, n.16, p.10494-10499, 2002.
- DANIEL, R. The soil metagenome – a rich resource for the discovery of novel natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, v.15, p.199–204, 2004.

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

DAS, K.; MUKHERJEE, A. K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from north-east India. **Bioresource Technology**, v.98, p.1339-1345, 2007.

DELMONT, T. O.; PRESTAT, E.; KEEGAN, K. P.; FAUBLADIER, M.; ROBE, P.; CLARK, I. M.; PELLETIER, E.; HIRSCH, P. R.; MEYER, F.; GILBERT, J. A.; LE PASLIER, D.; SIMONET, P.; VOGEL, T. M. Structure, fluctuation and magnitude of a natural grassland soil metagenome. **The ISME Journal**, p.1-11, 2012.

DI PIETRO, A.; GUT-RELLA, M.; PACHLATKO, J. P.; SCHWINN, F. J. Role of antibiotics produced by *Chaetomium globosum* in biocontrol of *Pythium ultimum*, a casual agent of damping-off. **Physiology and Biochemistry**, v.82, n.2, p.131-135, 1992.

DOMRACHEVA, L. I.; SHIROKIKH, I. G.; FOKINA, A. I. Anti-*Fusarium* activity of Cyanobacteria and Actinomycetes in soil and rhizosphere. **Microbiology**, v.79, n.6, p.871-876, 2010.

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

EDULAMUDI, P.; MASILAMANI, A. J. A.; DIVI, V. R. S. G.; KONADA, V. M. Novel root nodule bacteria belonging to the genus *Caulobacter*. **Applied Microbiology**, p.1-5, 2011.

ESPAGNE, E.; LESPINET, O.; MALAGNAC, F.; DA SILVA, C.; JAILLON, O.; PORCEL, B. M.; COULOUX, A.; AURY, J.-M.; SEGURENS, B.; POULAIN, J.; ANTHOUARD, V.; GROSSETETE, S.; KHALILI, H.; COPPIN, E.; DEQUARD-CHABLAT, M.; PICARD, M. CONTAMINE, V.; ARNAISE, S.; BOURDAIS, A.; BERTEAUX-LECELLIER, V.; GAUTHERET, D.; DE VRIES, R. P.; BATTAGLIA, E.; COUTINHO, P. M.; DANCHIN, E. G. J.; HENRISSAT, B.; KHOURY, R. E. L.; SAINSARD-CHANET, A.; BOIVIN, A.; PINAN-LUCARRE, B.; SELLEM, C. H.; DEBUCHY, R.; WINCKER, P.; WEISSENBACH, J.; SILAR, P. The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospora anserine*, **Genome Biology**, v9, n.5, p.1-22, 2008.

ESTRADA-DE-LOS-SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied And Environmental Microbiology**, v.67, n.6, p.2790-2798, 2001.

ETEBU, E.; OSBORN, A. M. Molecular quantification of the pea footrot disease pathogen (*Nectria haematococca*) in agricultural soil. **Phytoparasitica**, v.38, p.447-454, 2010.

FAO (Food and Agriculture Organization). **Agriculture and consumer protection department:** Conservation agriculture. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/ca/6c.html>>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2012.

FEBRAPDP (Federação Brasileira de Plantio Direto na Palha). Evolução da área cultivada no sistema de plantio direto na palha. Disponível em: <<http://www.febrapdp.org.br>>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2012.

FINDLAY, B. J.; BLACK, H. I. J.; BROWN, S.; CLARKE, K. J.; ESTEBAN, G. F.; HINDLE, R. M.; OLMO, J. L.; ROLLETT, A.; VICKERMAN, K. Estimating the growth potential of the soil protozoan community. **Protist**, v.151, p.69-80, 2000.

FOTI, M.; SOROKIN, D. Y.; LOMANS, B.; MUSSMAN, M.; ZACHAROVA, E. E.; PIMENOV, N. V.; KUENEN, J. G.; MUYZER, G. Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.7, p.2093-2100, 2007.

FRANCHINI, J. C.; CRISPINO, C. C.; SOUZA, R. A.; TORRES, E.; HUNGRIA, M. Microbiological parameters as indicators of soil quality under various soil management and crop rotation systems in southern Brazil. **Soil & Tillage Research**, v.92, p.18-29, 2007.

FUERST, J. A.; SAGULENKO, E. Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. **Nature**, v.9, p.403-413, 2011.

GOLL, J.; RUSCH, D. B.; TANENBAUM, D. M.; THIAGARAJAN, M.; LI, K.; METHÉ, B. A.; YOOSEPH, S.; METAREP: JCVI metagenomics reports-an open source tool for high-performance comparative metagenomics. **Bioinformatics**, v.26, n.20, p.2631-2632, 2010.

GOMES-ALVAREZ, V.; TEAL, T. K.; SCHMIDT, T. M. Systematic artifacts in metagenomas from complex microbial communities. **The International Society for Microbial Ecology Journal**, v.3, n.11, p.1314-1317, 2009.

GREEN, B. D.; KELLER, M. Capturing the uncultivated majority. **Current Opinion in Biotechnology**, v.17, p.236-240, 2006.

GUAN, C.; JU, J.; BORLEE, B. R.; WILLIAMSON, L. L.; SHEN, B.; RAFFA, K. F.; HANDELSMAN, J. Signal mimics derived from a metagenomic analysis of the gypsy moth gut microbiota. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.11, p.3669-3676, 2007.

GYANESHWAR, P.; HIRSCH, A. M.; MOULIN, L.; CHEN, W.-M.; ELLIOTT, G. N.; BONTEMPS, C.; ESTRADA-DE-LOS-SANTOS, P.; GROSS, E.; REIS-JUNIOR, F. B.; SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P. W.; JAMES, E. K. Legume-nodulating Betaproteobacteria: Diversity, host range, and future prospects. **The American Phytopathological Society**, v.24, n.11, p.1276-1288, 2011.

HABTE, M.; ALEXANDER, M. Protozoa as agent responsible for the decline of *Xanthomonas campestris* in soil. **Applied Microbiology**, v.29, n.2, p.159-164, 1975.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.68, n.4, p.669-685, 2004.

HANDELSMAN, J. Sorting out metagenomes. **Nature Biotechnology**, v.23, n.01, p.38-39, 2005.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v.5, n.10, p.245-249, 1998.

HARKINS, T.; JARVIE, T. Metagenomics analysis using the Genome Sequencer™ FLX system. **Nature Methods**, v.4, p.3-5, 2007.

HAVELSRUD, O. E.; HAVERKAMP, T. H. A.; KRISTENSEN, T.; JAKOBSEN, K. S.; RIKE, A. G. A metagenomic study of methanotrophic microorganisms in Coal Oil Point seep sediments. **BioMedCentral Microbiology**, v.11, n.221, p.1471-2180, 2011.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, v.95, n.6, p.641-655, 1991.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v.105, n.12, p.1422-1432, 2001.

HOFF, K. J.; LINGNER, T.; MEINICKE, P.; TECH, M. Orphelia: predicting genes in metagenomic sequencing reads. **Nucleic Acids Research**, v.37, p.101-105, 2009.

HOLBEN, W. E.; JANSSON, J. K.; CHELM, B. K.; TIEDJE, J. M. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.3, p.703-711, 1988.

HORI, T.; MULLER, A.; IGARASHI, Y.; CONRAD, R.; FRIEDRICH, M. W. Identification of iron-reducing microorganisms in anoxic rice paddy soil by C-acetate probing. **The International Society for Microbial Ecology Journal**, v.4, p.267-278, 2010.

HUNGRIA, M. Características biológicas em solos manejados sob plantio direto. In: REUNIÃO DE LA RED LATINOAMERICANA DE AGRICULTURA CONSERVACIONISTA, 5., 1999, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, EPAGRI, 2000, (CD ROM).

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; BRANDÃO-JUNIOR, O.; KASCHUK, G.; SOUZA, R. A. Soil microbial activity and crop sustainability in a long-term experiment with three soil-tillage and two crop-rotation systems. **Applied Soil Ecology**, v.42, n.3, p.288-296, 2009.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v.65, p.151-164, 2000.

- HUREK, T.; EGNER, T.; REINHOLD-HUREK, B. Divergence in nitrogenases of *Azoarcus* spp., Proteobacteria of the β subclass. **Journal of Bacteriology**, v.179, n.13, p.4172-4178, 1997.
- HUSON, H. D.; AUCH, A. F.; QI, J.; SCHUSTER, S. C. MEGAN analysis of metagenomic data. **Genome Research**, v.17, p.377-386, 2007.
- HUSON, D. H.; MITRA, S.; RUSCHEWEYH, H.-J.; WEBER, N.; SCHUSTER, S. C. Iterative analysis of environmental sequences using MEGAN4. **Genome Research**, V.21, P.1552-1560, 2011.
- IMELFORT, M.; EDWARDS, D. De novo sequencing of plant genomes using second-generation technologies. **Briefings In Bioinformatics**, v.10, n.6, p.609-618, 2009.
- INOUE, G. H. Sistemas de preparo do solo e o plantio direto no Brasil. **Agropecuária Técnica**, v.24, n.1, p.1-11, 2003.
- ISSA, O. M.; DEFARGE, C.; BISSONNAIS, Y. L.; MARIN, B.; DUVAL, O.; BRUAND, A.; D'ACQUI, L. P.; NORDENBERG, S.; ANNERMAN, M. Effects of the inoculation of cyanobacteria on the microstructure and the structural stability of a tropical soil. **Plant and Soil**, v.290, p.209-219, 2007.
- JAISWAL, S. K.; DHAR, B. Identification and assessment of symbiotic effectiveness of phage-typed *Rhizobium leguminosarum* strains on Lentil (*Lens culinaris* Medik) cultivars. **Current Microbiology**, v.62, p.1503-1509, 2011.
- JANSSEN, P. H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.3, p.1719-1728, 2006.
- JONES, R. D.; MORITA, R. Y. Methane oxidation by *Nitrosococcus oceanus* and *Nitrosomonas europaea*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.45, n.2, p.401-410, 1983.
- JONES, W. J. High-throughput sequencing and metagenomics. **Estuaries and Coasts**, v.33, p.944-952, 2010.
- KAKIRDE, K. S.; PARSLEY, L. C.; LILES, M. R. Size does matter: application-driven approaches for soil metagenomics. **Soil Biology Biochemistry**, v.42, n.11, p.1911-1923, 2010.
- KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: Lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. **Soil Biology & Biochemistry**, v.42, p.1-13, 2010.
- KEEL, C.; SCHNIDER, U.; MAURHOFER, M.; VOISARD, C.; LAVILLE, J.; BURGER, U.; WIRTHNER, P.; HAAS, D.; DÉFAGO, G. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.5, n.1, p.4-13, 1992.

KELLEY, D. R.; LIU, B.; DELCHER, A. L.; POP, M.; SALZBERG, S. L. Gene prediction with glimmer for metagenomic sequences augmented by classification and clustering. **Nucleic Acids Research**, v.40, n.1, p.1-12, 2011.

KRAUSE, L.; DIAZ, N. N.; GOESMANN, A.; KELLEY, S.; NATTKEMPER, T. W.; ROHWER, F.; EDWARDS, R. A.; STOYE, J. Phylogenetic classification of short environmental DNA fragments. **Nucleic Acids Research**, v.36, n.7, p.2230-2239, 2008.

KRSEK, M.; WELLINGTON, E. M. H. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. **Journal of Microbiological Methods**, v.39, p.1-16, 1999.

LAIZ, L.; MILLER, A. Z.; JURADO, V.; AKATOVA, E.; SANCHEZ-MORAL, S.; GONZALEZ, J. M.; DIONÍSIO, A.; MACEDO, M. F.; SAIZ-JIMENEZ, C. Isolation of five *Rubrobacter* strains from biodeteriorated monuments. **Naturwissenschaften**, v.96, p.71-79, 2009.

LASERSON, J.; JOJIC, V.; KOLLER, D. Genovo: *De novo* assembly for metagenomas. **Journal of Computational Biology**, v.18, n.3, p.429-443, 2011.

LEE, S-H.; KA, J-O.; CHO, J-C. Members of the phylum *Acidobacteria* are dominant and metabolically active in rhizosphere soil. **Federation of European Microbiological Societies**, v.285, p.263-269, 2008.

LEVEAU, J. H. J. The magic and menace of metagenomics: prospects for the study of plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v.119, p.279-300, 2007.

LI, W. Analysis and comparison of very large metagenomes with fast clustering and functional annotation. **BMC Bioinformatics**, v.10, n.359, p.1-9, 2009.

LI, W.; GODZIK, A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. **Bioinformatics**, v.22, n.13, p.1658-1659, 2006.

LIMA, A. S. T.; BARRETO, M. C. S.; ARAÚJO, J. M.; SELDIN, L.; BURITY, H. A.; FIGUEIREDO, M. V. B. Sinergismo *Bacillus*, *Brevibacillus* e, ou, *Paenibacillus* na simbiose *Bradyrhizobium-caupi*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, p.713-732, 2011.

LORENZ, P.; SCHLEPER, C. Metagenome—a challenging source of enzyme discovery. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.19-20, p.13-19, 2002.

LUCKER, S.; WAGNER, M.; MAIXNER, F.; PELLETIER, E.; KOCH, H.; VACHERIE, B.; RATTEI, T.; DAMSTE, J. S. S.; SPIECK, E.; LE PASLIER, D.; DAIMS, H. A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.107, n.30, p.13479-13484, 2010.

LUEDERS, T.; KINDLER, R.; MILTNER, A.; FRIEDRICH, M. W.; KAESTNER, M. Identification of bacterial micropredators distinctively active in a soil microbial food web. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.8, p.5342-5348, 2006.

MAO, Y.; ZHANG, X.; XIA, X.; ZHONG, H.; ZHAO, L. Versatile aromatic compound-degrading capacity and microdiversity of *Thauera* strains isolated from a coking wastewater treatment bioreactor. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.37, p.927-934, 2010.

MARCHIORI-JUNIOR, M.; MELO, W. J. Carbono da biomassa microbiana e atividade enzimática em um solo sob mata natural, pastagem e cultura do algodoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.23, n.2, p.257-263, 1999.

MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E.; ATTIYA, S.; BADER, J. S.; BEMBEN, L. A.; BERKA, J.; BRAVERMAN, M. S.; CHEN, Y.-J.; CHEN, Z.; DEWELL, S. B.; DU, L.; FIERRO, J. M.; GOMES, X. V.; GODWIN, B. C.; HE, W.; HELGESEN, S.; HO, C. H.; IRZYK, G. P.; JANDO, S. C.; ALENQUER, M. L. I.; JARVIE, T. P.; JIRAGE, K. B.; KIM, J.-B.; KNIGHT, J. R.; LANZA, J. R.; LEAMON, J. H.; LEFKOWITZ, S. M.; LEI, M.; LI, J.; LOHMAN, K. L.; LU, H.; MAKHIJANI, V. B.; MCDADE, K. E.; MCKENNA, M. P.; MYERS, E. W.; NICKERSON, E.; NOBILE, J. R.; PLANT, R.; PUC, B. P.; RONAN, M. T.; ROTH, G. T.; SARKIS, G. J.; SIMONS, J. F.; SIMPSON, J. W.; SRINIVASAN, M.; TARTARO, K. R.; TOMASZ, A.; VOGT, K. A.; VOLKMER, G. A.; WANG, S. H.; WANG, Y.; WEINER, M. P.; YU, P.; BEGLEY, R. F.; ROTHBERG, J. M. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, p.1-5, 2005.

MEYER, F.; PAARMANN, 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, n.386, p. 1-8, 2008.

MONCIARDINI, P.; CAVALETTI, L.; SCHUMANN, P.; ROHDE, M.; DONADIO, S. *Conexibacter woesei* gen. nov., sp. nov., a novel representative of a deep evolutionary line of descent within the class *Actinobacteria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.53, p.569-576, 2003.

MORGAN, J. L.; DARLING, A. E.; EISEN, J. A. Metagenomic sequencing of an *in vitro*-simulated microbial community. **Plos One**, v.5, n.4, p.1-10, 2010.

NIU, B.; FU, L.; SUN, S.; LI, W. Artificial and natural duplicates in pyrosequencing reads of metagenomic data. **BMC Bioinformatics**, v.11, n.187, p.1-11, 2010.

NOGUCHI, H.; TANIGUCHI, T.; ITOH, T. MetaGeneAnnotator: Detecting species-specific patterns of ribosomal binding site for precise gene prediction in anonymous prokaryotic and phage genomes. **DNA Research**, v.15, p.387-396, 2008.

NOWROUSIAN, M. STAJICH, J. E.; CHU, M.; ENGH, I.; ESPAGNE, E.; HALLIDAY, K.; KAMEREWERD, J.; KEMPKEN, F.; KNAB, B.; KUO, H.-C.; OSIEWACZ, H. D.; POGGELER, S.; READ, N. D.; SEILER, S.; SMITH, K. M.; ZICKLER, D.; KUCK, U.; FREITAG, M. *De novo* assembly of a 40 Mb eukaryotic genome from short sequence reads: *Sordaria macrospora*, a model organism for fungal morphogenesis. **Plos Genetics**, v.6, n.4, p.1-22, 2010.

OGRAM, A.; SAYLER, G. S.; BARKAY, T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. **Jounal Microbiology Methods**, v.7, p.57-66, 1987.

OMEMU, A. M.; AKPAN, I.; BANKOLE, M. O.; TENIOLA, O. D. Hydrolysis of raw tuber starches by amylase of *Aspergillus niger* AM07 isolated from the soil. **African Journal of Biotechnology**, v.4, n.1, p.19-25, 2005.

PALLERONI, N. J. The genus *Pseudomonas*. In: GOLDMAN, E; GREEN, L. H. **Pratical handbook of microbiology**. 2.ed. New York: CRC Press, 2009. p.231-242.

PARKS, D. H.; BEIKO, R. G. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. **Bioinformatics**, v.26, n.6, p.715-721, 2010.

PASZKIEWICZ, K.; STUDHOLME, D. J. De novo assembly of short sequence reads. **Briefings In Bioinformatics**, v.11, n.5, p.457-472, 2010.

PAZINATO, J. M.; PAULO, E. N.; MENDES, L. W.; VAZOLLER, R. F.; TSAI, S. M. Molecular characterization of the archaeal community in an Amazonian wetland soil and culture-dependent isolation of methanogenic archaea. **Diversity**, v.2, p.1026-1047, 2010.

PEREIRA, A. A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; KASCHUK, G.; CHUEIRE, L. M. O.; CAMPO, R. J.; TORRES, E. Variações qualitativas e quantitativas na microbiota do solo e na fixação biológica do nitrogênio sob diferentes manejos com soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, n.6, p.1397-1412, 2007

PEREIRA, C. J.; NEVES, M. C. P.; DROZDOWICZ, A. Dinâmica das populações bacterianas em solos de cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.34, n.5, p.808-811, 1999.

PEREIRA, C. J.; NEVES, M. C. P.; GAVA, C. A. T. Efeito do cultivo da soja na dinâmica da população bacteriana, em solos de cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.6, p.1183-1190, 2000.

PERROTTA, J. A.; HARWOOD, C. S. Anaerobic metabolism of cyclohex-1-ene-1-carboxylate, a proposed intermediate of benzoate degradation, by *Rhodopseudomonas palustris*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.6, p.1775-1782, 1994.

PESTER, M.; SCHLEPER, C.; WAGNER, M. The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. **Current Opinion in Microbiology**, v.14, p.300-306, 2011.

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

QIN, J.; LI, R.; RAES, J.; ARUMUGAM, M.; BURGDORF, K. S.; MANICHANH, C.; NIELSEN, T.; PONS, N.; LEVENEZ, F.; YAMADA, T.; MENDE, D. R.; LI, J.; XU, J.; LI, S.; LI, D.; CAO, J.; WANG, B.; LIANG, H.; ZHENG, H.; XIE, Y.; TAP, J.; LEPAGE, P.; BERTALAN, M.; BATTO, J-M.; HANSEN, T.; PASLIER, D. L.; LINNEBERG, A.; NIELSEN, H. B.; PELLETIER, E.; RENAULT, P.; SICHERITZ-PONTEN, T.;

TURNER, K.; ZHU, H.; YU, C.; LI, S.; JIAN, M.; ZHOU, Y.; LI, Y.; ZHANG, X.; LI, S.; QIN, N.; YANG, H.; WANG, J.; BRUNAK, S.; DORÉ, J.; GUARNER, F.; KRISTIANSEN, K.; PEDERSEN, O.; PARKHILL, J.; WEISSENBACH, J.; METAHIT CONSORTIUM.; BORK, P.; EHRLICH, S. D.; WANG, J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v.464, p.59-65, 2010.

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

RIESENFELD, C. S.; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. **Environmental Microbiology**, v.6, n.9, p.981-989, 2004.

ROBE, P.; NALIN, R.; CAPELLANO, C.; VOGEL, T. M.; SIMONET, P. Extraction of DNA from soil. **European Journal of Soil Biology**, v.39, p.183-190, 2003.

RODRÍGUEZ-VALERA, F. Approaches to prokaryotic biodiversity: a population genetics perspective. **Environmental Microbiology**, v.4, n.11, p. 628–633, 2002.

ROMBEL, I. T.; SYKES, K. F.; RAYNER, S.; JOHNSTON, S. A. Orf-finder: a vector for high-throughput gene identification. **Gene**, v.282, p.33-41, 2002.

RONAGHI, M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. **Genome Research**, v.11, p.3-11, 2001.

SAHARAN, B. S.; NEHRA, V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medicine Research*, 2011.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.74, n.12, p.5463-5467, 1977.

SCHLATTER, D.; FUBUH, A.; XIAO, K.; HERNANDEZ, D.; HOBBI, S.; KINKEL, L. Resource amendments influence density and competitive phenotypes of *Streptomyces* in soil. **Microbial Ecology**, v.57, p.413-420, 2009.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, v.14, p.303–310, 2003.

SCHMEISSER, C.; STOCKIGT, C.; RAASCH, C.; WINGENDER, J.; TIMMIS, K. N.; WENDEROTH, D. F.; FLEMMING, H.-C.; LIESEGANG, H.; SCHMITZ, R. A.; JAEGER, K.-E.; STREIT, W. R. Metagenome survey of biofilms in drinking-water networks. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.12, p.7298-7309, 2003.

SCHMIDT, I.; BOCK, E. Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. **Archives of Microbiology**, v.167, p.106-111, 1997.

SESHADRI, R.; KRAVITZ, S. A.; SMARR, L.; GILNA, P.; FRAZIER, M. CAMERA: A community resource for metagenomics. **Plos Biology**, v.5, n.3, p.394-397, 2007.

SHAW, L. J.; NICOL, G. W.; SMITH, Z.; FEAR, J.; PROSSER, J. I.; BAGGS, E. M. *Nitrosospira* spp. can produce nitrous oxide via a nitrifier denitrification pathway. **Environmental Microbiology**, v.8, n.2, p.214-222, 2006.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, v.26, n.10, p.1135-1145, 2008.

SIMON, H. M.; DODSWORTH, J. A.; GOODMAN, R. M. Crenarchaeota colonize terrestrial plant roots. **Environmental Microbiology**, v.2, n.5, p.495-505, 2000.

SOLTANI, A.-A.; KHAVAZI, K.; ASADI-RAHMANI, H.; OMIDVARI, M.; DAHAJI, P. A.; MIRHOSEYNI, H. Plant growth promoting characteristics in some *Flavobacterium* spp. isolated from soils of Iran. **Journal of Agricultural Science**, v.2, n.4, p.106-115, 2010.

SORENSEN, S. R.; RONEN, Z.; AAMAND, J. Isolation from agricultural soil and characterization of a *Sphingomonas* sp. able to mineralize the phenylurea herbicide isoproturon. **Applied And Environmental Microbiology**, v.67, n.12, p.5403-5409, 2001.

SOUZA, R. A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CHUEIRE, L. M. O.; BARCELLOS, F. G.; CAMPO, R. J. Avaliação qualitativa e quantitativa da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.1, p.71-82, 2008.

STAFFORD, W. H. L.; BAKER, G. C.; BROWN, S. A.; BURTON, S. G.; COWAN, D. A. Bacterial diversity in the rhizosphere of Proteaceae species. **Environmental Microbiology**, v.7, n.11, p.1755-1768, 2005.

STARKS, T. L.; SHUBERT, L. E.; TRAINOR, F. R. Ecology of soil algae: a review. **Phycologia**, v.20, n.1, p.65-80, 1981.

STEELE, H.; STREIT, W. R.; Metagenomics: Advances in ecology and biotechnology. **FEMS Microbiology Letters**, v.247, p.105-111, 2005.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology**, v.24, p.487-506, 2000.

STOPNISEK, N.; GUBRY-RANGIN, C.; HOFFERLE, S.; NICOL, G. W.; MANDIC-MULEC, I.; PROSSER, J. I. Thaumarchaeal ammonia oxidation in an acidic forest Peat soil is not influenced by ammonium amendment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.22, p.7626-7634, 2010.

SUZUKI, S.; ONO, N.; FURUSAWA, C.; YING, B.-W.; YOMO, T. Comparison of sequence reads obtained from three next-generation sequencing platforms. **Plos One**, v.6, n.5, p.1-6, 2011.

SWANSON, M. M.; FRASER, G.; DANIELL, T. J.; TORRANCE, L.; GREGORY, P. J.; TALIANSKY, M. Viruses in soils: morphological diversity and abundance in the rhizosphere. **Annals of Applied Biology**, v.155, p.51-60, 2009.

TATUSOVA, T. A.; MADDEN, T. L. Blast 2 sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. **FEMS Microbiology**, v.174, p.247-250, 1999.

TEBBE, C. C.;VAHJEN, W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.8, p.2657-2665, 1993.

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

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

UCHIYAMA, T.; ABE, T.; IKEMURA, T.; WATANABE, K. Substrate-induced gene expression of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic gene. **Nature Biotechnology**, v.23, p.88-93, 2005.

VALPASSOS, M. A. R.; CAVALCANTE, E. G. S.; CASSIOLATO, A. M. R.; ALVES, M. C. Effects of soil management systems on soil microbial activity, bulk density and chemical properties. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.12, p.1539-1545, 2001.

VENTER, J. C.; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J. F.; HALPERN, A. L.; RUSCH, D.; EISEN, J. A.; WU, D.; PAULSEN, L.; NELSON, K. E.; NELSON, W.; FOUTS, D. E.; LEVY, S.; KNAP, A. H.; LOMAS, M. W.; NEALSON, K.; WHITE, O.; PETERSON, J.; HOFFMAN, J.; PARSONS, R.; BADEN-TILLSON, H.; PFANNKOCHE, C.; ROGERS, Y.; SMITH, H. O. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso sea. **Science**, v. 304, p.66-74, 2004.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; TAUCH, A.; 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**, v.71, n.3, p.495-548, 2007.

VERKHOVTSEVA, N. V.; KUBAREV, E. N.; MINEEV, V. G. Agrochemical agents in maintaining the structure of the soil microbial community. **Agrochemistry Pedology**, v.33, n.2, p.100-102, 2007.

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

microorganisms in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.7, p.2046-2056, 2009.

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

WILLIAMSON, K. E.; RADOSEVICH, M.; WOMMACK, K. E. Abundance and diversity of viruses in six Delaware soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.6, p.3119-3125, 2005.

WRIGHT, A. L.; HONS, F. M.; LEMON, R. G.; MCFARLAND, M. L.; NICHOLS, R. L. Microbial activity and soil C sequestration for reduced and conventional tillage cotton. **Applied Soil Ecology**, v.38, p.168-173, 2008.

YAMADA, T.; SEKIGUCHI, Y.; IMACHI, H.; KAMAGATA, Y.; OHASHI, A.; HARADA, H. Diversity, localization, and physiological properties of filamentous microbes belonging to *Chloroflexi* subphylum I in mesophilic and thermophilic methanogenic sludge granules. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.11, p.7493-7503, 2005.

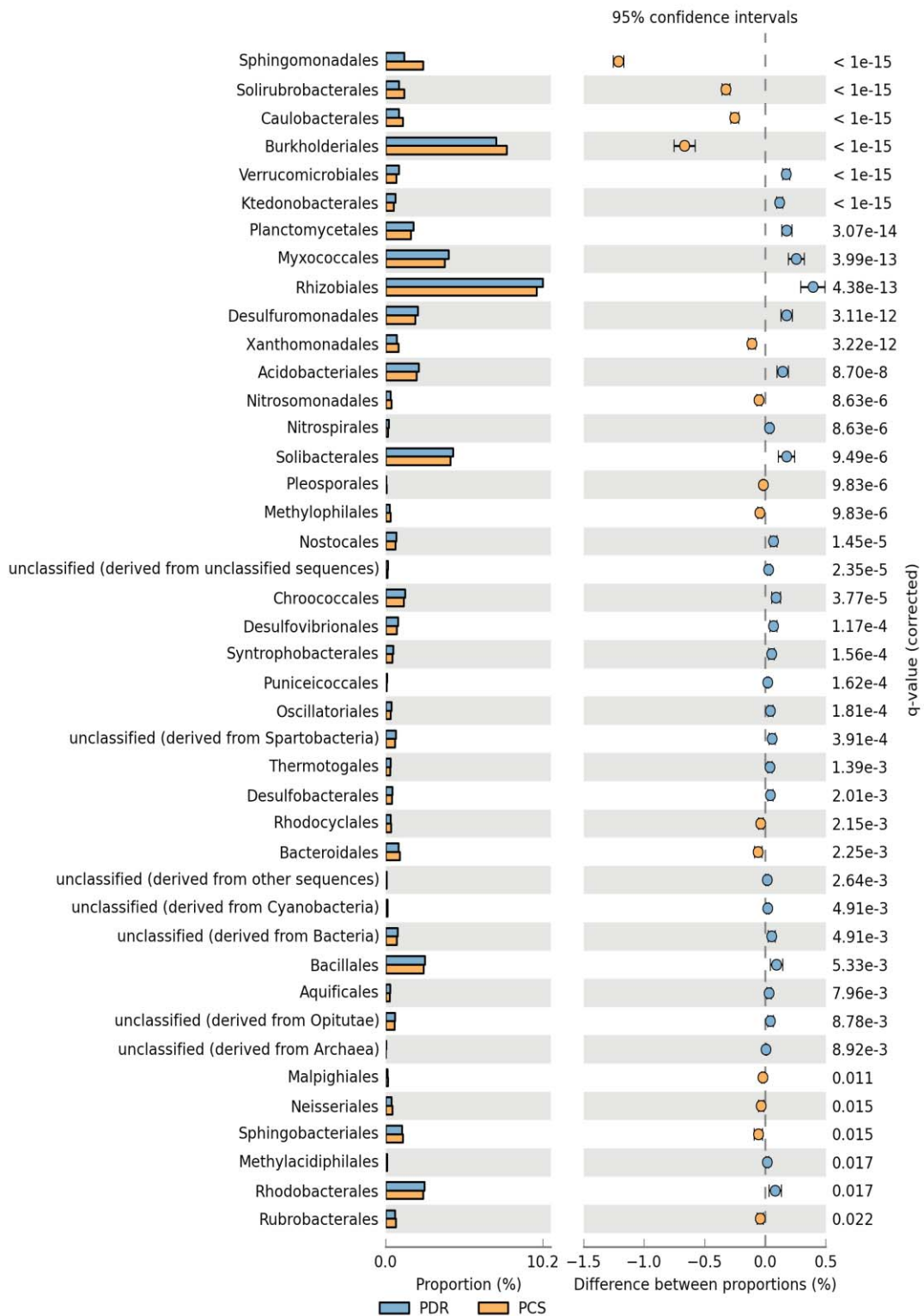
YIN, C.; JONES, K. L.; PETERSON, D. E.; GARRETT, K. A.; HULBERT, S. H.; PAULITZ, T. C. Members of soil bacterial communities sensitive to tillage and crop rotation. **Soil Biology & Biochemistry**, v.42, p.2111-2118, 2010.

YOUSSEF, N. H.; ELSHAHED, M. S. Diversity rankings among bacterial lineages in soil. **The International Society for Microbial Ecology Journal**, v.3, p.305-313, 2009.

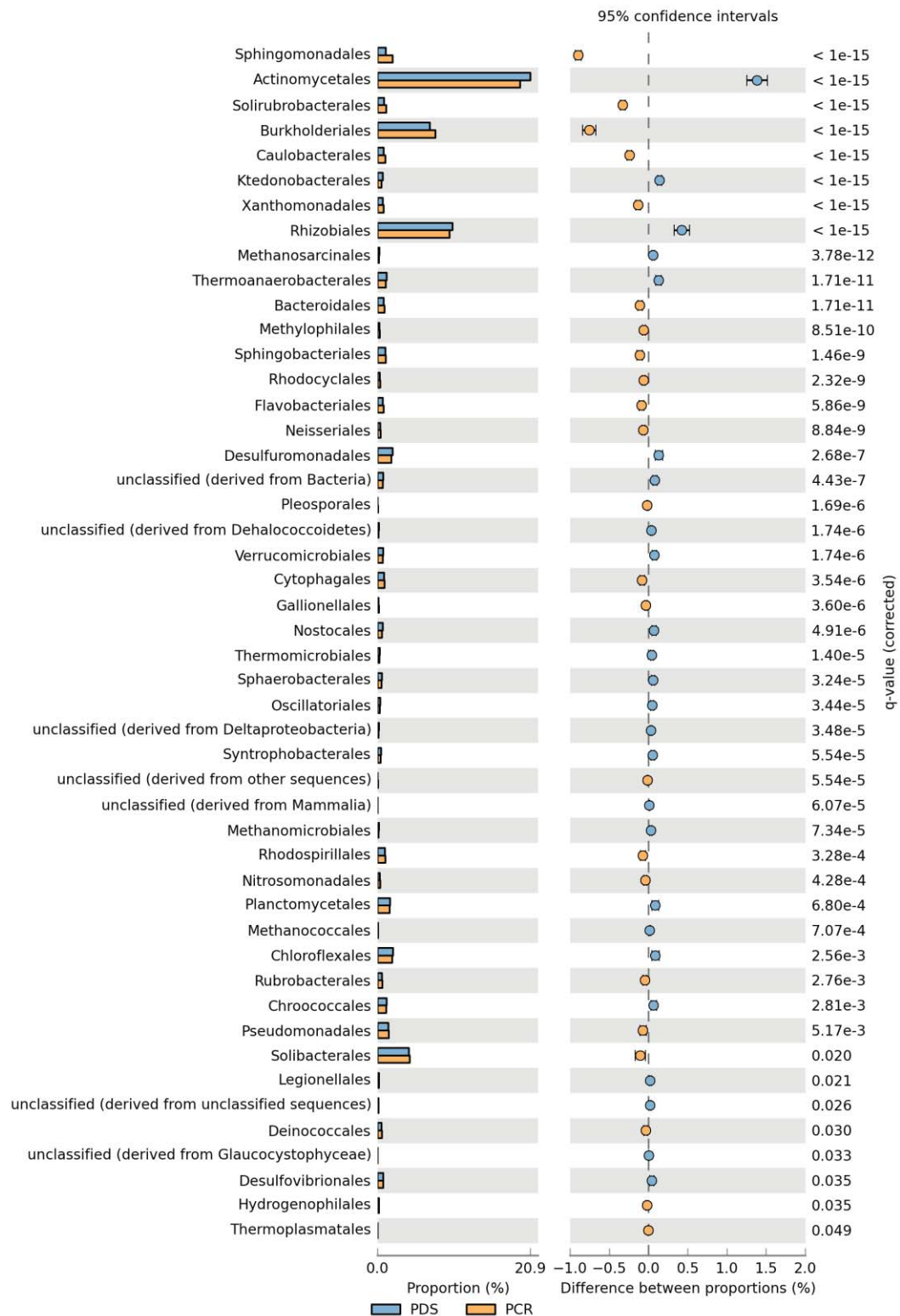
ZHANG, H.; SEKIGUCHI, Y.; HANADA, S.; HUGENHOLTZ, P.; KIM, H.; KAMAGATA, Y.; NAKAMURA, K. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.1155-1163, 2003.

ZHANG, N.; CASTLEBURY, L. A.; MILLER, A. N.; HUHNDORF, S. M.; SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; ROSSMAN, A. Y.; ROGERS, J. D.; KOHLMAYER, J.; VOLKMANN-KOHLMEYER, B.; SUNG, G.-H. An overview of the systematic of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny. **Mycologia**, v.98, n.6, p.1076-1087, 2006.

ANEXOS



ANEXO 1 - Diferenças significativas entre as ordens de microrganismos presentes nos solos sob os manejos de plantio direto em rotação de culturas com plantio convencional em rotação de culturas. O gráfico da esquerda mostra a proporção de sequências atribuídas, enquanto que o gráfico da direita mostra a significância da diferença entre as proporções com intervalo de confiança de 95% gerado pelo programa STAMP. Plantio direto com rotação de culturas (PDR-azul) e plantio convencional com rotação de culturas (PCS-laranja).



ANEXO 2 - Diferenças significativas entre as ordens de microrganismos presentes nos solos sob os manejos de plantio direto em rotação de culturas com plantio convencional em rotação de culturas. O gráfico da esquerda mostra a proporção de sequências atribuídas, enquanto que o gráfico da direita mostra a significância da diferença entre as proporções com intervalo de confiança de 95% gerado pelo programa STAMP. Plantio direto com rotação de culturas (PDS-azul) e plantio convencional com rotação de culturas (PCR-laranja).