



Universidade de Brasília

Instituto de Biologia

Departamento de Biologia Celular

Pós-graduação em Biologia Molecular

Efeito da disponibilidade de água na composição e função de comunidades microbianas presentes no solo do Cerrado revelado por análises metagenômicas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

Orientador: Dr. Ricardo Henrique Kruger

Aluna: Alinne Pereira de Castro

Brasília, agosto de 2013

No obstante dedico àquela que serás eternamente única para mim

Helenna de Castro Franco

Agradecimentos

A aquele que sempre me rege me guarda e me ilumina. Que nunca me deixou faltar conforto e paz quando necessário. E principalmente por nunca desistir de mim, mesmo nos momentos em que me esqueço de ti.

Aos meus pais, Odete Pereira de Castro e Ismar Gomes de Castro, que sempre me apoiaram e muitas vezes, abriram mão do próprio conforto para poder me dar uma vida melhor. Por terem cultivado em mim, valores como caráter, respeito ao próximo, honestidade e senso de justiça. O meu amor por vocês é sincero, forte e puro. Serei eternamente grata pelo amor incondicional.

À Universidade de Brasília (UnB), e especialmente ao programa de pós-graduação em Biologia Molecular, representados por todos os professores e funcionários, pela oportunidade de realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) pelo apoio financeiro que tornou possível a realização desse trabalho.

A Ricardo Henrique Krüger, não por apenas ter sido meu orientador durante a iniciação científica, mestrado e doutorado. Mas sim por durante 10 anos, ter sido para mim um exemplo de coragem, dignidade e sabedoria. Terás sempre minha admiração e respeito.

Aos professores: Gabriela Nardoto, Cynthia Kyaw e Robert Miller pela disponibilidade em aceitar participar e compartilhar seus conhecimentos essenciais para a melhoria e o estabelecimento do formato final desse estudo.

Em especial, ao professor Gabriel Fernandes pelas instruções valiosas durante a análise dos dados metagenômicos.

A Maria Regina Silveira Sartori, por sempre ter um sorriso sincero e fácil para mim. Durante todos esses anos pude aprender muito com sua competência e principalmente com sua fé. Disponha sempre da minha amizade sincera.

A Adriane Silva Kurokawa por manter viva nossa amizade por todos esses anos, mesmo pela distância boba que nos separa.

A Alessandra Reis por me presentear com a oportunidade de vivenciar a verdadeira amizade em sua plenitude.

A Ana Maria Assis Borges e Kelly Mulder por todo amor e carinho dedicados a mim. Ter vocês como amigas me faz muito feliz!

A Jéssica Bergmann, que sempre me deixou mais calma nos momentos de aflição. Mesmo me dando certeza que não iriam nos perguntar o motivo de estar fazendo o curso. rs..rs..

A Paula Tavares pelos mais de mil cafezinhos e esperanças compartilhadas.

Dizem que a gente não faz amigos, reconhece-os. Eu tive a oportunidade durante a minha trajetória de reconhecer dois incríveis: Lucas Carvalho e Samuel Araújo. A vocês os meus mais sinceros agradecimentos pelos bons momentos que passamos juntos.

Aos integrantes do grupo Metagenoma: Débora, Julianna, Elisa, Fabyano, Camila, Alinne, Renata e aos meus ICs que nunca permaneceram no grupo.

Ao meu melhor amigo e irmão herói: Luciano Pereira de Castro. Simplesmente Te amo!

À minha cunhada Kelly e as minhas sobrinhas Mylena e Clara, pelo carinho e amizade.

A Rogéria Franco, por ser a minha fiel conselheira e ter me ensinado que a vida é muito mais fácil quando se sabe rir dela.

A tia Sônia, Thiago e Rodrigo Franco por me acolherem como membro da família. Em especial, com muita saudade, ao meu sogro Octávio Franco (*i.m.*).

A Helenna de Castro Franco, minha estrela mais brilhante. Ao seu lado pude experimentar a forma mais pura e doce do verdadeiro sentido da vida. Te amo!

Finalmente ao grande merecedor de todo o meu amor: Octávio Luiz Franco. Obrigada pela sua força, por sua dedicação, pela espera paciente nos meus momentos de completo autismo, por toda a sua capacidade de compreensão, enfim, por mostrar que sonhos podem ser reais. Te amo eternamente!

Índice

Lista de Figuras.....	6
Lista de Tabelas.....	8
Resumo.....	9
Abstract.....	10
Introdução.....	11
Revisão bibliográfica.....	14
Justificativa.....	28
Objetivo Geral.....	29
Objetivos Específicos.....	29
Material e Métodos.....	30
Resultados.....	42
Discussão.....	94
Considerações finais.....	108
Perspectivas futuras.....	109
Referências.....	110

Lista de Figuras

Figura 1: Mapa indicando a distribuição dos 25 <i>hotspots</i> mundiais.....	17
Figura 2: Fitofisionomias do Cerrado na Reserva Ecológica do IBGE – Brasília, DF.....	32
Figura 3: Precipitação mensal (mm) registrada na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília-DF.....	34
Figura 4: Esquema realizado para a coleta de amostras de solo.....	34
Figura 5: Média da mensuração de umidade do solo para as quatro fitofisionomias.....	43
Figura 6: Análise de Componentes Principais (PCA) das propriedades físico-químicas do solo das fitofisionomias do Cerrado.....	43
Figura 7: Curvas de rarefação, estimado por Chao1, das sequências do gene rRNA do solo de fitofisionomias do Cerrado.....	48
Figura 8: Rank de abundância relativa do número de OTUs observados presente nas quatro diferentes fitofisionomias ao longo das contrastantes estações do ano.....	50
Figura 9: Abundância relativa dos filos bacterianos associados às quatro diferentes fitofisionomias do Cerrado nas estações seca e chuvosa.....	52
Figura 10: Proporção relativa de abundância referente ao domínio Bactéria distribuída em cerrado denso.....	53
Figura 11: Proporção relativa de abundância referente ao domínio Bactéria distribuída em campo sujo.....	54
Figura 12: Proporção relativa de abundância referente ao domínio Bactéria distribuída em cerrado <i>sensu stricto</i>	55
Figura 13: Proporção relativa de abundância referente ao domínio Bactéria distribuída em mata de galeria.....	55
Figura 14. Figura 14. Proporção relativa de famílias bacterianas detectadas em (a): cerrado denso; (b): campo sujo; (c): cerrado <i>sensu stricto</i> e (d): mata de galeria.....	57
Figura 15: Análise de Coordenadas Principais (PCoA) das sequências do gene do 16S rRNA das amostras de solo.....	60
Figura 16: Análises de coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis de abundância relativa de diferentes grupos bacterianos com a porcentagem de umidade do solo do bioma Cerrado.....	61
Figura 17: Figura 17: Análise de interações de sequências do gene do 16S rRNA agrupadas a 90% de similaridades para o domínio Bactéria.....	64
Figura 18. Diagrama de Venn representando o número de OTUs (90%) para domínio Bactéria.....	65

Figura 19: Abundância relativa dos filotaxos de Archaeas associados às quatro diferentes fitofisionomias do Cerrado.....	67
Figura 20: Proporção relativa de abundância referente ao domínio Archaea associados às quatro diferentes fitofisionomias do Cerrado.....	68
Figura 21. Comparação entre as proporções relativa de abundância de grupos taxonômicos de archaeas durante a estação seca e chuvosa.....	70
Figura 22: Análise de Coordenadas Principais (PCoA) das sequências do gene do 16S rRNA das amostras de solo das diferentes fitofisionomias do Cerrado ao longo das estações seca e chuvosa.....	72
Figura 23: Análises de coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis de abundância relativa de diferentes grupos de archaeas com a porcentagem de umidade do solo do bioma Cerrado.....	74
Figura 24: Abundância relativa dos filotaxos de Eucariotos associados às quatro diferentes fitofisionomias do Cerrado nas estações seca e chuvosa.....	75
Figura 25: Proporção relativa de abundância referente a comunidade de fungos associados às quatro diferentes fitofisionomias do Cerrado.....	76
Figura 26. Comparação entre as proporções relativa de abundância de filotaxos de fungos durante a estação seca e chuvosa.....	79
Figura 27: Análise de Coordenadas Principais (PCoA) das sequências do gene 18S rRNA das amostras de solo das diferentes fitofisionomias do Cerrado ao longo das estações seca e chuvosa.....	82
Figura 28: Análises de coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis de abundância relativa de diferentes grupos de archaeas com a porcentagem de umidade do solo do bioma Cerrado.....	83
Figura 29: Análise funcional dos 8 metagenomas de solo na estação seca e chuvosa.....	91
Figura 30: Comparação do perfil metabólico para os metagenomas das amostras combinadas da estação seca (vermelho) e chuvosa (azul).	93

Lista de Tabelas

Tabela 1: Propriedades físico-químicas das amostras de solo coletadas na Reserva Ecológica do IBGE (RECOR) durante a estação seca e chuvosa.....	33
Tabela 2: Visão geral do resultado final das corridas de pirosequenciamento obtidos a partir das amostras de solo das quatro fitofisionomia do bioma Cerrado.....	44
Tabela 3: Frequência de diversidade de Bactéria, Archaea e Fungos ao longo das estações seca e chuvosa no bioma Cerrado revelados por análise de gene rRNA.....	46
Tabela 4: Resultado para o teste ANOSIM para todas as distâncias de β -diversidade com um ponto de corte de 3% para agrupamento de OTUs.....	59
Tabela 5: Resultado para o teste de Mantel realizado par a par para todas as sete distâncias de β -diversidade, incluindo 999 permutações para cada teste.....	59
Tabela 6: Relação das famílias bacterianas associados às quatro diferentes fitofisionomias do Cerrado ao longo das estações de seca e chuvosa. Sequências dos genes do 16S rRNA foram agrupadas a 90% de similaridade e classificadas pelo RDP a 80% pelo QIIME.....	65
Tabela 7: Resultado para o teste ANOSIM para todas as distâncias de β -diversidade com um ponto de corte de 3% para agrupamento de OTUs.....	72
Tabela 8: Resultado para o teste de Mantel realizado par a par para todas as sete distâncias de β -diversidade, incluindo 999 permutações para cada teste.....	72
Tabela 9: Resultado para o teste ANOSIM para todas as distâncias de β -diversidade com um ponto de corte de 3% para agrupamento de OTUs.....	81
Tabela 10: Resultado para o teste de Mantel realizado par a par para todas as sete distâncias de β -diversidade, incluindo 999 permutações para cada teste.....	81
Tabela 11: Valores dos dados metagenômicos obtidos a partir pirosequenciamento das amostras de solo das quatro fitofisionomia do bioma Cerrado.....	85

Resumo

O Cerrado, bioma exclusivamente brasileiro, compreende alta heterogeneidade de vegetação e duas estações bem definidas durante o ano sendo estes invernos secos e verões chuvosos. Embora uma quantidade considerável de informação esteja disponível sobre a diversidade de fauna e flora presente no Cerrado, pouco se conhece sobre a composição, estrutura e funcionamento biológico das comunidades microbianas nas diferentes fitofisionomias nativas associados a este bioma. Nesse contexto, genes do rRNA (16S em procariotos e 18S em eucariotos) e posteriormente do DNA total (metagenoma) extraídos diretamente de solo a partir de quatro tipos de vegetação contrastantes (cerrado denso, campo sujo, cerrado *sensu stricto* e mata de Galeria) durante as estações secas e chuvosas foram analisados por meio de pirosequenciamento. As análises comparativas das quatro fitofisionomias revelaram uma distinta distribuição de filos de Bactérias, Archaea e Fungos. De acordo com a riqueza de OTU estimada pelo índice de Chao1, a estação chuvosa apresentou maior riqueza de OTUs para as comunidades de bactérias e fungos. Em contraste, a estação seca demonstrou possuir maior riqueza de OTUs para a comunidade de archaea. Aparentemente, houve forte influência da umidade do solo com a composição da comunidade microbiana sugerindo que o teor gravimétrico de água nas amostras de solo pode ser considerado como um dos preditores de variabilidade dentro da diversidade microbiana presente em amostras de solo do bioma Cerrado. Além disso, análises dos dados metagenômicos revelaram aumento significativamente estatístico na abundância relativa de genes associados com o metabolismo e aquisição de ferro, elementos transponíveis, dormência e esporulação durante a estação seca. Em adição, genes relacionados ao metabolismo de DNA e proteínas assim como genes ligados à respiração tiveram sua abundância relativa enriquecida durante a estação chuvosa. Essas categorias funcionais geralmente podem estar associadas aos mecanismos de adaptação da comunidade microbiana a estresse hídrico. Em suma, estes resultados podem ajudar a construir conclusões mais compreensivas sobre a capacidade funcional das comunidades microbianas de solos nas estações seca e chuvosa.

Palavras-chaves: Cerrado; Comunidade microbiana; Estresse Hídrico; DNA Metagenômico.

Abstract

The Cerrado occurs primarily in Brazil. Its vegetation varies considerably in physiognomy and there are two well-marked and seasonal climates, one wet summer and one drought winter. Although a considerable amount of information is available regarding the fauna and flora diversity present in the Cerrado, little is known about the composition, structure and biological function of microbial communities in different native physiognomies associated to this biome. Using barcode pyrosequencing of the rRNA (16S/18S rRNA) genes and shotgun metagenomics analysis with DNA directly extracted from four contrasting physiognomies (cerrado denso, campo sujo, cerrado *sensu stricto* and mata de galeria) in the two different time points (drought and rain) were performed. Comparative analysis of the four type vegetation soil samples revealed a distinct distribution of bacterial, archaea and fungal phyla. According to the OTU richness estimated by Chao 1, the rain season is more species rich than drought season for bacterial and fungal communities; by contrast, the archaeal community showed is more species rich in the drought when compared with rainy season. Apparently, there was a strong influence of soil moisture on the composition of the microbial community suggesting that the gravimetric water content of soil samples can be considered as one of the predictors of variability within the microbial diversity present in soil samples from the Cerrado biome. Furthermore, analysis of metagenomic data revealed statistically significantly increased in relative abundance of genes associated with metabolism and iron acquisition, transposable elements, dormancy and sporulation during the dry season. In addition, genes related to metabolism of DNA and proteins as well as genes linked to respiration had enriched their relative abundance during the rainy season. These functional categories can generally be associated with the mechanisms of adaptation of the microbial community to water stress. Indeed, these results can help build more comprehensive conclusions about the functional capacity of microbial communities in soils of dry and rainy seasons.

Keywords: Cerrado; Microbial communities; Water stress; Metagenomic DNA.

1.0. Introdução

O território brasileiro compreende diversos biomas incluindo Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pantanal, recifes de corais, manguezais, ambientes oceânicos e costeiros. Naturalmente, cada um deles resulta em quadros complexos de paisagens com diversidade biológica própria, caracterizando o Brasil como um país megabiodiverso. Fato que comprova essa alta diversidade é que aproximadamente 20 % do número total de espécies descritas no planeta estão no Brasil (MITTERMEIER *et al.*, 2004). Dentre esses relatos, o nosso conhecimento pode ser consideravelmente maior em relação à biodiversidade de plantas e animais quando comparado ao nosso conhecimento sobre a diversidade de micro-organismos. Atualmente esforços têm sido feitos para identificar a diversidade microbiana nos diferentes biomas do Brasil, mas esse tipo de estudo em nosso território ainda é muito recente, mesmo com a ampla biodiversidade que detém.

Uma excelente iniciativa de análise reuniu os principais estudos de diversidade microbiana realizados nos diferentes biomas do Brasil nos últimos cinco anos (BRUCE *et al.*, 2012). Uma das grandes limitações em se analisar as comunidades microbianas consistiam nos métodos tradicionais de cultivo, os quais não representavam a verdadeira diversidade de microrganismos, devido principalmente às limitações dos meios de cultura em laboratórios. Os métodos independentes de cultivo foram o grande passo para superar essa limitação de análise. No Brasil, o primeiro relato utilizando métodos independentes de cultivo foi datado na década de 90 (BORNEMAN *et al.*, 1997). Consequentemente esta abordagem foi amplamente aplicada para o estudo de diversidade microbiana nos diferentes biomas brasileiros.

Os estudos relacionados com a diversidade microbiana tiveram foco em amostras de solos do bioma Amazônia (JESUS *et al.*, 2009; GROSSMAN *et al.*, 2010; TAKETANI *et al.*, 2010), Mata Atlântica (BRUCE *et al.*, 2010; FAORO *et al.*, 2010; THOMPSON *et al.*, 2011; FAORO *et al.*, 2012), Cerrado (QUIRINO *et al.*, 2009; CASTRO *et al.*, 2011; ARAUJO *et al.*, 2012; MENDES *et al.*, 2012), Caatinga (MONTEIRO *et al.*, 2009), em locais de manguezais (COUTO *et al.*, 2010; ANDREOTE *et al.*, 2012; MENDES *et al.*, 2012) ou em áreas sob cultivo (BENEDUZI *et al.*, 2008; CASTRO *et al.*, 2008; ROESCH *et al.*, 2008). No ambiente marinho, os estudos avaliaram tanto a comunidade microbiana em amostra de água (FONTES *et al.*,

2010; THOMPSON *et al.*, 2010; CURY *et al.*, 2011) quanto associados a animais marinhos (MENEZES *et al.*, 2009; REIS *et al.*, 2009; CASTRO *et al.*, 2010).

Com esta informação reunida foi possível fazer uma análise *in silico* para observar o padrão de distribuição de diversidade microbiana nos diferentes biomas brasileiros. Essa análise foi feita com a informação contida no gene do 16S rRNA, o qual permitiu uma clara diferenciação entre os biomas terrestres e os aquáticos, demonstrando que há grupos específicos de micro-organismos que são únicos de acordo com o bioma (BRUCE *et al.*, 2012).

Desde então, vários estudos sobre a diversidade microbiana tem sido efetuados atualmente. Neste contexto, os solos vêm sendo um ambiente amplamente escolhido para semelhantes análises devido, sem dúvidas, suportar a mais alta e complexa diversidade genética, sendo considerado o maior reservatório de biodiversidade em comparação aos demais ambientes.

Períodos anuais de ciclos entre seca seguida por eventos de chuva são tidos como estresse fisiológico, os quais as comunidades microbianas do solo devem possuir mecanismos para adaptassem (HARRIS, 1981; KIEFT *et al.*, 1987). Entretanto, após os eventos de precipitação, a resposta referente à umidade do solo pode variar em diferentes ecossistemas, pois o estoque de água no solo é dependente das diversas características ambientais a que estão submetidas às amostras de solos como: cobertura vegetal, textura do solo. Há relatos em que períodos alternados de seca podem exercer efeitos indiretos no crescimento e fisiologia de plantas (NIKLAUS *et al.*, 2007; MARGESIN *et al.*, 2009) assim como exercer efeito direto de aumento de temperatura, diminuição de umidade no solo e descarga de carbono (C) e nitrogênio (N) nos solos (DEWAR *et al.*, 1992).

Recentes estudos realizados no bioma Cerrado demonstraram que a sazonalidade pode afetar as comunidades microbianas do solo (BRESOLIN *et al.*, 2010; MENDES *et al.*, 2012). A água pode ser considerada como indispensável para o desenvolvimento dos processos metabólicos no solo. O transporte de nutrientes solúveis pode ser mais eficaz quando há maior disponibilidade de água. Entretanto uma situação contrária pode dificultar os processos de trocas gasosas com a atmosfera externa e renovação do oxigênio.

Por sua vez, o alto teor de umidade nos solos tende a diminuir as taxas de decomposição da matéria orgânica, em resposta ao baixo suprimento de oxigênio. Em contrapartida quando há diminuição na umidade do solo, há conseqüentemente redução da atividade microbiana através da redução de difusão de substratos solúveis, mobilidade microbiana e potencial da água intracelular. Adicionalmente a umidade do solo pode também determinar a estrutura da comunidade microbiana, sugerindo que a água livre de ligação das partículas do solo podem influenciar os padrões de diversidade, por meio do controle de disponibilidade de nutrientes e movimentação das células (ZHOU *et al.*, 2002).

Estudos têm sido demandados no sentido demonstrar que a estrutura da comunidade bacteriana pode ser fortemente influenciada tanto por fatores bióticos quanto abióticos como pela temperatura do solo (SHEIK *et al.*, 2011), umidade (BELL *et al.*, 2009), pH (ROUSK *et al.*, 2010), concentração de CO₂ (HE *et al.*, 2012) ou pela combinação desses fatores (BELL *et al.*, 2008) (MANZONI *et al.*, 2012; SONG *et al.*, 2012). Adicionalmente, mudanças na composição da comunidade microbiana podem subsequentemente afetar a taxa de decomposição de matéria orgânica (BELNAP *et al.*, 2005) e a dinâmica de ciclagem de nutrientes no solo (GROFFMAN *et al.*, 1999).

Embora, bem estabelecido que as comunidades microbianas sejam as grandes responsáveis pela ciclagem de nutriente nos solos, pouco vem sendo explorado a cerca da resposta da comunidade microbiana em relação às mudanças sazonais relacionados aos níveis de precipitação, particularmente no bioma Cerrado. Pela notável heterogeneidade de tipos de vegetação, o Cerrado constitui um ecossistema muito diversificado para a colonização da comunidade microbiana. Dentre elas, a fitofisionomia campo sujo consiste em formação campestre caracterizada pela presença de gramíneas com pequenos e espaçados arbustos. O cerrado *sensu stricto* também compreende de formação savânica caracterizado pela presença de árvores pequenas (3 a 6 m) com troncos torcidos e cascas grossas misturados com arbustos e um estrato herbáceo. O cerrado denso pode ser considerado como um subtipo da fitofisionomia cerrado *sensu stricto*, o qual a principal diferença está na altura média das árvores (5 a 8m) (RIBEIRO *et al.*, 1998). Adicionalmente, mata de galeria compreende uma estreita faixa de floresta que ocorre ao longo das margens de pequenos rios e córregos com árvore com altura variando de 20 m a 30 m, e uma cobertura de árvore entre 70% e

95%. A composição do solo compreende 80 % em latossolos, no qual uma descrição detalhada dessas fitofisionomias do Cerrado é fornecida por (RIBEIRO *et al.*, 1998).

Com base no conhecimento que, após os eventos de precipitação, a resposta da comunidade microbiana referente à umidade do solo pode variar em diferentes ecossistemas, pois o estoque de água no solo é dependente das diversas características ambientais a que estão submetidas às amostras de solos como: cobertura vegetal, textura do solo.

Coloca-se a pergunta se a heterogeneidade de fitofisionomias e a disponibilidade de água em relação às mudanças sazonais relacionados aos níveis de precipitação no Cerrado podem afetar as comunidades microbianas de solo em termos de composição, estrutura e funcionalidade biológica.

Por essa razão este estudo está subdividido em duas partes, sendo a primeira etapa reservado para a análise do gene do rRNA (16S em procariotos e 18S em eucariotos) e posteriormente, a análise do DNA total extraído de amostras de solo do bioma Cerrado (metagenoma), ambas utilizando a técnica de pirosequenciamento como metodologia central.

2.0. Revisão de Literatura

2.1 Solos como *habitat* para microrganismos.

Os solos compreendem alta complexidade de propriedades físicas, químicas e mesmo biológicas, sendo considerada uma das amostras mais desafiadoras para análises na biologia molecular. No aspecto global os solos atuam, por exemplo, estocando grande parte do carbono do planeta (três vezes mais o que existe na atmosfera), tamponando e filtrando grande parte dos poluentes e também como os principais mediadores dos ciclos biogeoquímicos (MOREIRA *et al.*, 2006). A estrutura do solo depende da associação entre as partículas minerais (areia, silte e argila) e matéria orgânica, os quais consistem de micro e macro-agregados incorporados dentro de uma matriz sólida, líquida e gasosa os quais apresentam constante mudança em resposta a perturbações naturais ou induzidas pelo homem (GOEDERT, 1985).

A organização estrutural das partículas do solo produz um *habitat* espacialmente heterogêneo para os micro-organismos caracterizados por diferentes substratos, nutrientes, concentração de oxigênio, conteúdo de água e valores de pH (LADD *et al.*, 1996). O estado agregado do solo cria poros na matriz de diferentes tamanhos permitindo a existência de ar e água essenciais às suas funções biológicas. Embora, não seja surpreendente que diferentes organismos possam ocupar nichos de diferentes tamanhos, o primeiro estudo a demonstrar essa realidade, utilizando métodos independentes de cultivo, foi publicado por (RANJARD *et al.*, 2000). Posteriormente Sessitsch e colaboradores demonstraram que a diversidade microbiana pode aumentar em relação à diminuição do tamanho de partículas do solo, sendo que partículas maiores foram dominadas por Alpha-Proteobacteria enquanto o filo Acidobacteria fora mais comum em partículas de argila (SESSITSCH *et al.*, 2001).

Consequentemente os micro-organismos possuem alta habilidade de adaptarem-se aos mais distintos tipos de solos. Isso inclui desertos extremamente secos e frios, solos profundos em áreas vulcânicas á minas ácidas ou altamente alcalinas. Essa ampla versatilidade deve-se primeiramente pelo acúmulo de adaptações evolutivas e fisiológicas as quais lhes permitiram sobreviver e permanecerem ativos nos mais distintos solos (WARD, 1998).

Sabe-se que a população microbiana se adapta rapidamente às variações dessas condições ambientais. A ação microbiana do solo irá depender da temperatura, condições de umidade, reação e teor em elementos nutritivos, e da competição e antagonismos que se estabelecem entre os próprios grupos de micro-organismos (DANIEL, 2005).

Nesse contexto o bioma Cerrado vem sendo foco de investigação sobre principalmente as diferenças entre as comunidades microbianas de solo sob vegetação nativa e sob cultivo (PEIXOTO *et al.*, 2006; CASTRO *et al.*, 2008; QUIRINO *et al.*, 2009) (BRESOLIN *et al.*, 2010; PEIXOTO *et al.*, 2010). Em termos gerais a principal conclusão desses trabalhos sugere que a estrutura das comunidades microbianas pode ser afetada pela estrutura e pela composição da cobertura vegetal. Essa conclusão pode ser principalmente baseada no conhecimento da influência do pH e da relação C/N nas comunidades microbianas do solo (FIERER *et al.*, 2009), pois ambos são fortemente

alterados quando há correção da composição química do solo com o acréscimo de calcário e fertilizantes necessários nas áreas sob cultivo.

2.2 Bioma Cerrado

Dentre os biomas brasileiros a diversidade genética do bioma Cerrado tem sido foco de discussão, devido sua localização, extensão e posição central. O mesmo possui uma posição estratégica em relação aos demais biomas sendo localizada a sua maior porção no centro do país. Outro ponto a favor desse bioma é que nas suas áreas periféricas existem transições com os biomas Amazônia, Mata Atlântica e Caatinga, fazendo com que ocorra compartilhamento de espécies com os outros biomas e consequentemente favorecendo na sua diversificação.

O termo Cerrado tem como significado “vegetação densa”. Essa expressão traduz a característica geral da vegetação arbustivo-herbácea densa que ocorre na formação savânica deste bioma. Este bioma pode ser caracterizado por apresentar uma vegetação rasteira, formada principalmente por gramíneas, coexistindo com árvores e arbustos esparsos. Sua extensão abrange cerca de dois milhões de quilômetros quadrados, sendo o segundo maior bioma brasileiro. Essa grande extensão territorial consiste em um mosaico de diferentes tipos fisionômicos que compreendem desde a formação florestal, savânicas a campestres (RIBEIRO *et al.*, 1998). Dependendo do seu adensamento e condições edáficas, pode apresentar mudanças diferenciadas em aproximadamente 11 fitofisionomias (RIBEIRO *et al.*, 1998). Os tipos fisionômicos têm como principais fatores determinantes a fertilidade e os teores de alumínio disponíveis no solo, a profundidade do solo, o grau de saturação hídrica das camadas superficial e sub-superficial do solo bem como o clima da região (EITEN, 1994). Recentemente, os dados sobre o funcionamento biogeoquímico do Cerrado, avaliando-se os potenciais impactos das mudanças climáticas regionais foram revisados (BUSTAMANTE *et al.*, 2012).

Os fatores que afetam a distribuição de cerrado estão sujeitas a debate, no entanto, as variações sazonais na precipitação, fertilidade, drenagem do solo e por ultimo os eventos de fogo são considerados o mais importantes. Mais informações sobre o bioma Cerrado incluem dados sobre seu clima que tem a característica de ser

estacional, com duas estações bem definidas: seca e chuvosa. Nutricionalmente os solos são ácidos e de baixa fertilidade, com altos níveis de ferro e alumínio (VARGAS *et al.*, 1997).

A preocupação recente tem relação com a diversidade biológica do Cerrado, a qual esta cada vez mais ameaçada. Processo de urbanização e ocupação agrícola são os principais fatores que contribuem para a destruição do bioma. Pois o Cerrado é carente em áreas protegidas. Diferentemente dos biomas da Mata Atlântica e Amazônia, que possuem um código ambiental específico para proteção de suas áreas, o bioma Cerrado não se enquadra em nenhuma lei específica. O código florestal que é de 1965 diz que a reserva legal da região deve ser no mínimo de 20%.

No estudo realizado por Myers e colaboradores (2000) foi efetivada a identificação dos “*hotspots* de biodiversidade” espalhados pelo mundo. Em conclusão, a Figura 1 mostra que o bioma Cerrado foi considerado um dos “*hotspots*” mundiais, ou seja, está entre um dos 25 pontos do planeta que aliam as condições de possuir alta biodiversidade e alto grau de ameaça de degradação (MYERS *et al.*, 2000).

O contínuo processo de degradação do Cerrado faz com que haja um grande comprometimento ambiental e conseqüentemente sua fauna e flora estão sendo substituídas por diferentes paisagens antropogênicas, sendo as atividades de maior porte as pastagens plantadas e as monoculturas extensivas.

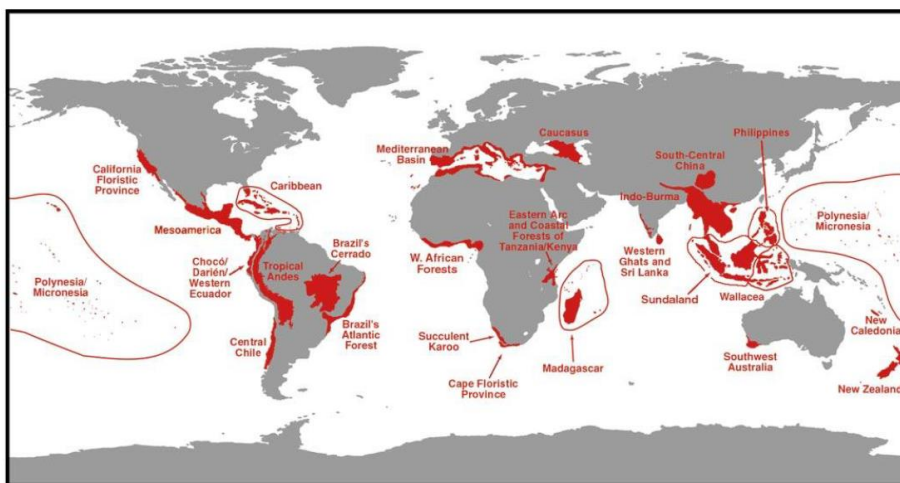


Figura 1: Mapa indicando a distribuição dos 25 *hotspots* mundiais. Figura originalmente publicada por (MYERS *et al.*, 2000).

Em 2010, o estudo sobre mapeamento de áreas realizado por Sano e colaboradores (2010) demonstrou que aproximadamente apenas 61% restam das áreas com vegetação natural no bioma Cerrado (SANO *et al.*, 2010). No entanto, a distribuição restante das áreas naturais pode ser altamente assimétrica. Por exemplo: a maior porcentagem (90 %) de área preservada se encontra na porção norte do bioma incluindo os estados do Piauí, Maranhão e Tocantins, enquanto na porção sul do bioma a proporção de área preservada é equivalente a 15 %. Os estados de São Paulo, Paraná, e Mato Grosso do Sul, foram os que apresentaram os menores índices de cobertura vegetação natural (SANO *et al.*, 2010).

Em 2012, após anos de debates, entrou em vigor o novo código florestal (lei 12.651/2012), suas modificações tendem a assegurar o melhor equilíbrio na relação entre o uso sustentável e a conservação da natureza. Apesar de a presidenta Dilma Vana Rousseff vetar alguns principais pontos, ambientalistas preveem perdas graves para a conservação ambiental incluídas nessa nova legislação florestal. Entre elas, a proteção às nascentes intermitentes, a qual não foi vetada. Consequentemente, o bioma Cerrado sofrerá grande impacto, onde a grande maioria de suas nascentes é intermitente. Adicionalmente, extensivas áreas de vegetação nativa do Cerrado, concentradas principalmente nos estados do Piauí e Bahia, poderão ser convertidas legalmente para a expansão da monocultura da soja devido às mudanças aprovadas no novo código florestal.

Com base no que foi exposto sobre a degradação desse bioma, se faz cada vez mais necessários estudos para o reconhecimento do verdadeiro potencial do bioma Cerrado.

A fim de entender as consequências destas mudanças na diversidade de comunidades microbianas presentes nos solos do bioma Cerrado é preciso primeiro avaliar a sua extensão. A comunidade de bactérias, archaeas e fungos estão bem representados nos ecossistemas terrestres, e particularmente, os solos podem conter a maior proporção de “taxa desconhecidos” (PACE, 1999).

Domínio *Bacteria*

Sem dúvidas as bactérias são o maior número de espécies de organismos presentes na Terra, principalmente em solos. Por este motivo, vem sendo o grupo mais exaustivamente estudado atualmente (TIEDJE *et al.*, 2001; TORSVIK *et al.*, 2002; TYSON *et al.*, 2004; LAUBER *et al.*, 2009; CHU *et al.*, 2010).

Em amostras de solo podem-se detectar bactérias que são tidas como generalistas, por conseguirem colonizar diferentes ambientes ou mesmo bactérias especialistas por serem encontradas unicamente em um ambiente. Um estudo recente examinou a distribuição global do gene do 16S rRNA a partir de uma grande variedade de ambientes. Os dados demonstraram que, as bactérias mais abundantes podem ser confinadas em ambientes específicos, e que uma fração significativa da variação encontrada na distribuição de bactérias pode ser relacionada com o tipo do ambiente analisado (NEMERGUT *et al.*, 2011).

Os estudos realizados no bioma Cerrado sobre a estrutura da comunidade bacteriana dos solos têm avançado consideravelmente nos últimos anos. Quirino e colaboradores demonstraram que áreas nativas de cerrado *sensu stricto* apresentam maior diversidade em relação à área de cerrado *sensu stricto* convertido para pastagem (QUIRINO *et al.*, 2009). Posteriormente, Bresolin e colaboradores, compararam a comunidade bacteriana do solo de uma área de Cerrado nativa com uma área de Cerrado convertida à plantação de soja, demonstrando que a comunidade microbiana do solo pode ser afetada devido à modificação na cobertura original do solo e/ou ao desenvolvimento da cultura de soja (BRESOLIN *et al.*, 2010). Outras áreas de lavoura também foram comparadas (PEIXOTO *et al.*, 2010). Devido seu alto poder de diversidade, os solos do Cerrado vêm sendo atualmente analisado por técnicas de sequenciamento mais refinadas como o pirosequenciamento (ARAUJO *et al.*, 2012; SILVA, 2012). A tecnologia do pirosequenciamento gera quantidades de dados sem precedentes, fornecendo novas oportunidades de abordagens para descrever, analisar e comparar a comunidade microbiana presentes nos solos do bioma Cerrado.

Domínio *Archaea*

A priori as *Archaea* foram consideradas como micro-organismos limitados apenas aos ambientes extremos. Entretanto, recentemente, esse domínio também se mostrou presentes nos demais ambientes, incluindo lagos de água doce e solo de florestas ou agrícolas (BINTRIM *et al.*, 1997; JURGENS *et al.*, 1997; NICOL *et al.*, 2003). Com base nestes e em outros estudos semelhantes, acredita-se que agora a diversidade de archaea em ambientes de clima temperado pode ser provavelmente maior do que em ambientes extremos (DAWSON *et al.*, 2006).

O levantamento mais completo sobre as *Archaea* foi realizado por (AUGUET *et al.*, 2009). A imagem que surgiu a partir destes e similares estudos é que os solos são tipicamente dominados por alguns grupos pertencentes ao filo *Crenarchaeota* (AUGUET *et al.*, 2009), contendo membros que possivelmente são os principais responsáveis pela nitrificação do solo (LEININGER *et al.*, 2006). Estima-se que 70 % das sequências de archaea depositadas no GenBank são não-cultivadas, isoladas a partir de uma incrível variedade de ambiente como: oceanos, rizosferas, cavernas e lagos. Embora o nosso conhecimento sobre as archaeas venha se expandindo com as análises do gene do 16S rRNA, ainda temos um conhecimento escasso sobre a diversidade desse domínio em ambientes terrestres, principalmente em amostras de solo do bioma Cerrado.

O primeiro relato sobre abundância de *Crenarchaeota* no Brasil, utilizando métodos independentes de cultivo, foi realizado com amostras de solo do bioma da Amazônia, onde apenas 2 clones de 100 analisados eram de origem de archaeas (BORNEMAN *et al.*, 1997). Posteriormente, representantes de archaeas foram detectadas em amostras de muco de coral (LINS-DE-BARROS *et al.*, 2010), associadas ao rúmen de caprinos (CUNHA *et al.*, 2011) no lago Tucuruí na Amazônia (SANTANA *et al.*, 2012) ou sobre o solo de Terra Preta na Amazônia, submetidos a diferentes atividades antropogênicas (TAKETANI *et al.*, 2010). Recentemente os membros pertencentes ao domínio *Archaea* foram analisados em solos de duas fitofisionomias do bioma Cerrado (cerrado denso e mata de galeria). O qual resultados demonstraram que 96% das sequências analisadas eram pertencentes ao filo *Crenarchaeota*, principalmente aos grupos I.1b e I.1c (CATAO *et al.*, 2013).

Os mais recentes progressos no estudo sobre as Archaeas incluem o reconhecimento de novas linhagens, novos marcadores funcionais, o cultivo de mais de 50 cepas diferentes e o sequenciamento de alguns pequenos genomas de Archaeas (BATES *et al.*, 2010; NUNOURA *et al.*, 2011). No entanto, a estrutura das comunidades de Archaeas em solo e os fatores que regulam a sua diversidade e abundância relativa continuam pouco investigados, sendo necessários maiores esforços nas tentativas de cultivo aliado ao sequenciamento de DNA para obter uma imagem mais realista da diversidade de Archaeas.

Reino Fungi

Outro principal integrante no processo de decomposição no ambiente solo são os fungos, cuja diversidade tem somente tornado recentemente apreciado. A importância dos fungos presentes nos solos está muito bem documentada e abrange um vasto leque de aspectos fundamentais para o funcionamento dos ecossistemas, como a decomposição, qualidade dos solos, processos de ciclagem de nutrientes, a estimulação de crescimento vegetal e patogenicidade (MUELLER *et al.*, 2007). Em termos de biomassa, os fungos são também muitas vezes dominantes nos solos (THORN, 1997). Entretanto, o conhecimento sobre a diversidade e funções sobre a comunidade de fungos nos solos ainda é bastante limitado.

As pesquisas referentes aos fungos têm sido prejudicadas em relação ao estudo feito com bactérias devido à falta de técnicas de isolamento exaustivo e também pelo fato que as ferramentas moleculares recentemente aplicadas para esse tipo de análises apresentarem baixa disponibilidade de dados confiáveis de sequências para genes marcadores de fungos (BRIDGE, 2003). Essa limitação deve-se, principalmente pelos diferentes níveis de variações que podem ocorrer na mesma região do DNA em taxa diferentes, tendo por resultado problemas em fazer comparações generalizadas entre taxa (BRIDGE, 2003).

Apesar das limitações em analisar a comunidade fúngica, avanços tem sido feito e alguns trabalhos conseguiram demonstrar que a comunidade fúngica pode sofrer alterações espacial e temporal, sendo afetadas por numerosos fatores bióticos e abióticos (KOIDE *et al.*, 2007; TEDERSOO *et al.*, 2008; NOLTE *et al.*, 2010; DUMBRELL *et*

al., 2011). Mais recentemente, estudos utilizando pirosequenciamento com o intuito de analisar a diversidade em seis diferentes solos de floresta presentes na França (BUEE *et al.*, 2009) ou sobre diferentes manejos do solo na Itália (LUMINI *et al.*, 2010) revelaram uma inesperada elevada diversidade de fungos, tornando claro que a diversidade de fungos por muito tempo tinha sido subestimada.

Estudos utilizando técnicas independentes de cultivo afim de analisar a comunidade fúngica no bioma Cerrado foram descritas para área nativa (cerrado *sensu stricto* e na mata de galeria) e também em áreas de Cerrado transformadas em pastagem e em plantação de soja (CASTRO *et al.*, 2008). Em outra análise, foi estabelecida uma comparação da comunidade fúngica entre solo de Cerrado nativo e outro convertido para monocultura de soja (BRESOLIN *et al.*, 2010). Neste contexto, o bioma Cerrado carece de informação sobre a diversidade, composição e estrutura da comunidade fúngica dos solos.

2.3 Técnicas Moleculares

As técnicas moleculares geralmente envolvem extração direta ou indireta de DNA de um determinado ambiente, eliminando a necessidade de cultivo e consequentemente permitindo a detecção de espécies até então não cultiváveis. Em 2006, com o auxílio de técnicas independentes de cultivo, foram identificados quais são os grupos mais predominantes em comunidades do solo. O estudo foi conduzido com 32 bibliotecas do gene do 16S rRNA a partir de uma variedade de amostras de solos. Os autores chegaram à conclusão da presença de nove filos de bactérias como sendo dominantes em amostras de solos, sendo eles: *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes*, e *Firmicutes* (JANSSEN, 2006). Esses dados foram contrários aos resultados encontrados em décadas anteriores utilizando métodos clássicos de cultivo em laboratórios.

Consequentemente nosso entendimento sobre os fatores que determinam a relação entre a heterogeneidade da comunidade microbiana e resposta funcional á dinâmica temporal e como essas respostas podem determinar a função do ecossistema permanecem incertos. Por essa razão, métodos semelhantes à análise do gene do rRNA (16S em procariotos e 18S em eucariotos) e metagenoma total se fazem estudos necessários e complementares. Desde então, estes procedimentos unidos ao rápido crescimento das tecnologias de sequenciamento têm sido reconhecidos como uma ferramenta eficaz para estimar abundância relativa, composição e função de comunidade microbiana nos mais diferentes ambientes favorecendo o nosso conhecimento sobre a ecologia microbiana (FIERER *et al.*, 2012).

O campo de desenvolvimento da tecnologia de sequenciamento de DNA apresenta uma rica história. Nos últimos 30 anos, o processo de sequenciamento por Sanger foi o método padrão para sequenciar moléculas de DNA. Apesar dos avanços contínuos como a introdução de sistemas de eletroforese capilar, bem como uma contínua diminuição dos custos, este método tem mostrado ser caro e demorado. A procura de um método mais rápido e acessível para sequenciamento de DNA levou ao desenvolvimento de novas plataformas denominadas de "próxima geração" de tecnologias sequenciamento. Essas novas plataformas oferecem novos caminhos para uma rápida caracterização genômica, metagenômica e também para definição de perfis de mRNAs e pequenos RNAs (GOYA *et al.*, 2012). Dentre essas metodologias encontram-se as plataformas: 454 Pirosequenciamento, *Illumina Genome Analyzer* (Solexa), AB SOLiD e HeliScope, cada uma com sua própria química, resolução e frequência de erros. Uma vantagem adicional das novas plataformas de sequenciamento em relação ao método de Sanger consiste na rapidez do processo de sequenciamento. Uma vez que procedimentos básicos como, por exemplo, a clonagem de insertos de DNA em vetores não é mais requerida. Importantes aplicações dessas plataformas incluem: resequenciamento de genomas completos para identificação de mutações ou polimorfismos; metagenoma; epigenética; ChIP-Seq; RNA-Seq; ncRNA dentre outras (GOYA *et al.*, 2012).

Nesse projeto, a plataforma para sequenciamento escolhida foi o 454 pirosequenciamento devido, exclusivamente, a sua capacidade de sequenciar fragmentos em média de 500 pares de base, mesmo esse tendo um custo por base maior em relação às outras plataformas de sequenciamento. Isto se deve ao fato da necessidade de fragmentos maiores, os quais são essenciais para as análises aqui demonstradas. Não há

dúvidas que a quantidade de sequências produzidas em uma corrida de pirosequenciamento fornece uma amostragem de dados sem precedentes. Entretanto, uma importante ressalva com o pirosequenciamento é a taxa de erro intrínseca a esse método, o qual foi comprovado que pode inflar artificialmente as estimativas de diversidade, gerando dessa maneira confusão no momento de interpretação de dados (KUNIN *et al.*, 2010).

2.4. Análise de dados

A) Dados de amplificação dos genes rRNA.

Atualmente, a comunidade microbiana pode ter sua estrutura, composição, função metabólica e papel ecológico caracterizado pelos métodos independentes de cultivo. Embora o uso do gene marcador filogenético 16S seja considerado como "padrão ouro" para a identificação bacteriana em amostras ambientais, o uso do mesmo em muitas vezes tem sido criticado. As discussões em torno da utilização do gene do 16S rRNA para elucidação da diversidade microbiana ocorrem devido primeiramente a sua alta heterogeneidade dentro do mesmo genoma (ACINAS *et al.*, 2004) o qual pode gerar uma superestimação da abundância relativa. Múltiplas cópias do *operon* rRNA por genoma são geralmente encontrados em organismos com alta taxa de crescimento, especialmente em bactérias do solo (KLAPPENBACH *et al.*, 2000). Em adição, a heterogeneidade do gene, outra desvantagem consiste na falta de resolução refinada de identificação para o nível de espécies (PONTES *et al.*, 2007).

Outro ponto questionado tem sido o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR), pois o mesmo pode conter diversas etapas de introdução de viés como, por exemplo: a utilização de oligonucleotídeos universais para amplificar o gene do 16S rRNA pode criar uma imagem distorcida da composição da comunidade microbiana analisada, devido a construção desses oligonucleotídeos serem baseados em genoma de micro-organismos já caracterizados ou mesmo devido à disposição desses oligonucleotídeos em amplificar preferencialmente alguns determinados filos. Formação de quimeras e posteriormente o número de repetições dos ciclos ou o sistema de enzima utilizado também são consideradas etapas de introdução de viés (SUZUKI *et al.*, 1996; QIU *et al.*, 2001; SERGEANT *et al.*, 2012).

Quando a finalidade de um estudo consiste em analisar genes rRNA, o retorno dos resultados será principalmente a informação sobre a classificação taxonômica dos micro-organismos. Para tal finalidade há muitos algoritmos disponíveis (LIU *et al.*, 2008), e conseqüentemente vários bancos de dados podem ser usados como referência para a análise. Por exemplo, o método *naïve Bayesian* desenvolvido para o *Ribosomal Data Project* (RDP) (COLE *et al.*, 2009) pelo (WANG *et al.*, 2007) tem sustentado considerável popularidade devido ser considerado o método mais informativo para classificar sequências de 16 e 18S rRNA provenientes de sequenciamento de segunda geração (LIU *et al.*, 2008).

Conseqüentemente com o enorme número de sequências geradas pelas plataformas de sequenciamento de segunda geração, houve a necessidade de desenvolver programas computacionais adequados, responsáveis em analisar taxonomia e inferir filogenia baseados em dados de genes rRNA (SCHLOSS *et al.*, 2009; GIONGO *et al.*, 2010). Subseqüentemente, após a caracterização taxonômica os próximos passos são análise de alpha e beta diversidade. A alpha diversidade tem como objetivo analisar apenas uma amostra em questão respondendo, por exemplo, quantos OTUs existem na amostra. Em contraste, a beta diversidade tem como finalidade responder perguntas como: quantos OTUs são compartilhados entre amostras diferentes. Dessa maneira, utilizando-se de índices de diversidade microbiana, estimadores de riqueza e/ou curvas de rarefação para responder suas perguntas biológicas em questão (NUBEL *et al.*, 1999). Vale a pena ressaltar que, os dados devem ser analisados com muita cautela, pois os resultados de uma análise de genes rRNA pode ser influenciado por diversos fatores incluindo a região (V) escolhida dentro do gene, métodos de alinhamento, distância evolucionária e banco de dados (SCHLOSS 2010; WHITE *et al.*, 2010).

Independente da tecnologia utilizada, os erros estarão presentes durante o ato de sequenciamento. Em relação ao método utilizado neste trabalho, o de pirosequenciamento, o mesmo é conhecido pela alta taxa de homopolímeros (ANSORGE, 2009; QUINCE *et al.*, 2009). Quatro abordagens gerais têm sido sugeridas para reduzir os erros de sequenciamento e conseqüentemente os seus efeitos finais. A primeira abordagem seria remover as sequências que apresentam características ambíguas. A segunda abordagem seria cortar regiões de sequências associadas com baixa qualidade. Geralmente no início e no final das sequências há uma redução da qualidade de bases. Kuni e colaboradores analisando o gene do 16S rRNA de *E. coli*

previam encontrar apenas 1 OTU quando as sequências fossem agrupadas com *cut off* de 3 %, mas ao invés disso encontraram 16 OTUs. Quando os autores submeteram esses dados ao programa LUCY (CHOU *et al.*, 2001) utilizando o valor de qualidade de 27 o número foi corrigido para o esperado de 1 OTU (KUNIN *et al.*, 2010). A terceira abordagem foi o desenvolvimento de algoritmos como *PyroNoise* (QUINCE *et al.*, 2009), *DeNoiser* (REEDER *et al.*, 2010), *AmpliconNoise* (QUINCE *et al.*, 2011) e *Acacia* (BRAGG *et al.*, 2012) para reduzir a taxa de erros. Infelizmente esses algoritmos nem sempre são utilizados durante as análises, por demandar alto recurso computacional.

Por último as sequências devem ser removidas com característica de serem quimeras ou sequências que não foram classificadas taxonomicamente por nenhum banco de dados (EDGAR *et al.*, 2011; HAAS *et al.*, 2011). Embora haja passos determinados para reduzir a taxa de erros dentro de uma análise de genes rRNA seguida por pirosequenciamento, de fato ainda não há um método de análise padrão e uniforme a ser seguido pelos pesquisadores (SCHLOSS 2010; SCHLOSS *et al.*, 2011b; SCHLOSS *et al.*, 2011a).

B) Metagenômica

O sequenciamento do DNA total direto a partir de amostra ambiental (metagenôma) tem o potencial de avaliar a real proporção de diversidade da comunidade microbiana sem introdução de viés resultado da utilização da técnica de PCR (VENTER *et al.*, 2004; HAAS *et al.*, 2011), proporcionando não apenas uma visão sobre a variabilidade genética mais também gerando informação sobre a capacidade metabólica de comunidades microbianas.

Análise metagenômica inclui a identificação funcional e taxonômica de uma comunidade de organismos. Há muitos desafios envolvidos na análise desses conjuntos de dados, incluindo um grande volume de dados de sequências, heterogeneidade e incompletas sequências genômica. Devido à natureza dos dados metagenômicos, a análise é muito complexa e requer novas abordagens e recursos significativos de computação. Muitos projetos de dados metagenômicos tem optado em utilizar metodologias já padronizadas para análise de dados genômicos tais como: montagem de sequências com base em um consenso de similaridade (*contig*), e a partir desses *contigs* fazer todas as anotações necessárias (VENTER *et al.*, 2004; QIN *et al.*, 2010).

Entretanto, deve-se levar em consideração que a montagem de *contigs*, podem resultar em desvios significativos quando realizado uma análise de dados metagenômicos de comunidade microbiana (DESAI *et al.*, 2012).

Recentemente, várias ferramentas para análise de dados metagenômicos foram desenvolvidas incluindo: MG-RAST (MEYER *et al.*, 2008), IMG/M (MARKOWITZ *et al.*, 2008) e CAMERA (SESHADRI *et al.*, 2007). Por exemplo, MG-RAST, consiste no *pipeline* mais amplamente utilizado para a análise de dados metagenômicos gerados por sequenciamento *shotgun*. O servidor do MG-RAST compreende mais de 4.000 usuários com deposição de mais de 10.000 metagenomas públicos (SETEMBRO 2012). A vantagem desse programa consiste no fornecimento de vários métodos para acessar diferentes tipos de dados, incluindo caracterização filogenética e reconstruções metabólicas, além de poder comparar, em uma mesma análise, inúmeros contrastantes dados de metagenomas (EDWARDS *et al.*, 2006; FIERER *et al.*, 2007). Um exemplo de estudo similar foi à utilização de pirosequenciamento de amostra de DNA providas de nove ambientes distintos (DINSDALE *et al.*, 2008). Ao comparar a prevalência de diferentes tipos de genes entre os ambientes, o estudo comprovou que foi possível determinar diferentes requerimentos metabólicos para cada ambiente (DINSDALE *et al.*, 2008).

Independentemente da abordagem de sequenciamento utilizado para gerar os dados, as primeiras etapas de análise de qualquer metagenoma envolve a análise comparativa contra vários bancos de dados tanto para sequências de nucleotídeos quanto para aminoácidos. Estas primeiras comparações apresentam um enorme custo computacional, mas que por sua vez fornecerem os dados básicos para as análises subsequentes, incluindo comparações filogenéticas, anotações funcionais, reconstruções metabólicas e modelagem. Análise de um simples metagenoma fornece grande conhecimento dentro da comunidade. Entretanto análise de metagenomas contrastantes, como no nosso caso as diferentes fitofisionomias do bioma Cerrado, geram conhecimento sobre a adaptação microbiana e o papel de micro-organismos específicos nessa diferentes condições mencionadas. Adicionalmente, ainda é possível confirmar putativas relações entre função e estrutura das comunidades microbianas.

Análises de dados metagenômicos está em rápida mudança, devido à alta demanda para o desenvolvimento de novas ferramentas, espera-se que no futuro

próximo os novos programas de bioinformática apresentem maior escalabilidade, sensibilidade e performance para a análise dos dados. Com esses avanços, podemos esperar que o campo da bioinformática possa apresentar um futuro impactante nos estudos metagenômicos.

Diante do exposto, as comunidades de bactérias, archaeas e fungos que habitam amostras de solo do bioma Cerrado serão analisados e comparados, ressaltando as variações detectadas em sua composição, estrutura e potencial funcional em relação ao efeito da sazonalidade de precipitação.

3.0. Justificativa

Devido a grande complexidade físico-químico e mesmo biológicas que compreendem as amostras de solo, pouco se sabe sobre a diversidade, abundância e função de comunidades microbianas sob o efeito de variações no teor gravimétrico de água nas amostras de solo no bioma Cerrado. Neste sentido, o sequenciamento em larga escala do genes do 16S/18S rRNA permitirá o conhecimento sobre a diversidade taxonômica e ecologia microbiana, além de proporcionar um banco de dados para posteriormente ser utilizado como monitoramento nessa área. Esse conhecimento unido aos dados do metagenoma gerará referências para a comparação com projetos metagenômicos de solos de diferentes áreas do Brasil e do mundo, bem como a identificação mais detalhadas de enzimas específicas que são únicas ou superepresentadas nas distintas estações (seca e chuvosa). Vale a pena ressaltar que, de acordo com nossos conhecimentos, este estudo fornecerá a primeira análise simultânea de alfa/beta diversidade e potencial funcional em comunidades de microbianas, presentes em amostras de solo das quatro principais fitofisionomias (cerrado denso, campo sujo, cerrado *sensu stricto* e mata de galeria) do bioma Cerrado.

4.0. Objetivo Geral

Descrever e comparar a variabilidade de comunidades microbianas em relação ao efeito da disponibilidade de água nas amostras de solo em diferentes fitofisionomias presentes do Cerrado por meio de análises de sequências dos genes do 16S/18S rRNA e metagenômica utilizando pirosequenciamento.

4.1. Objetivos Específicos

a) Caracterizar a microbiota das quatro principais fitofisionomias (cerrado *sensu stricto*, cerrado denso, campo sujo e mata de galeria) através do pirosequenciamento de sequências dos genes do 16S e 18S rRNA da microbiota do solo do bioma Cerrado;

b) Determinar a abundância relativa, diversidade taxonômica e perfil metabólico para a comunidade de bactérias, archaeas e fungos em diferentes fitofisionomias na estação seca e chuvosa de solo do bioma Cerrado;

c) Determinar quais grupos taxonômicos tem sua abundância relativa alterada na presença de diferentes parâmetros físico-químicos e sob o efeito de alterações no teor gravimétrico de água nas amostras de solo através de índices de diversidade em amostras de solo do bioma Cerrado;

d) Determinar as categorias metabólicas alteradas em resposta aos períodos de seca e chuva do bioma Cerrado;

e) Determinar se a umidade do solo está relacionada positivamente ou negativamente com o padrão de diversidade microbiana em distintas estações;

5.0. Material e Métodos

5.1 Coleta das amostras

Amostras de solos foram coletadas na Reserva Ecológica do IBGE (RECOR), localizada no Distrito Federal, (15° 55' 58'' S e 47° 51' 02'' W). A RECOR é uma das Áreas Núcleo da Reserva da Biosfera do Cerrado, criada em 1993, pela UNESCO no Distrito Federal e faz parte da Área de Proteção Ambiental do Planalto Central, criada pelo Governo Federal em 2002 (fonte: <http://www.rbma.org.br/mab/unesco03rbcerrado.asp>). Dentro dessa reserva encontram-se os principais tipos de vegetação do bioma Cerrado.

Para esse estudo as fitofisionomias determinadas para análises foram cerrado *sensu stricto* (S15° 57'02.4'; WO 47° 52' 32.1''), cerrado denso (S15° 56'43.1'; WO 47° 51' 26.0''), campo sujo (S15° 56'54.6'; WO 47° 52' 11.7'') e mata de galeria (S15° 57'06.0''; WO 47° 53' 18.7'') (Figura 2). De acordo com a descrição de RIBEIRO *et al.* (2008), as fitofisionomias analisadas nesse estudo foram classificadas como formação savânica (cerrado denso e cerrado *sensu stricto*), formação campestre (campo sujo) e formação florestal (mata de galeria). A maioria das fitofisionomias analisadas nesse estudo desenvolve-se em Latossolos, apresentando relevo plano a suave ondulado.

As coletas foram realizadas durante dois períodos. A primeira coleta foi definida como estação seca em setembro de 2010 e posteriormente a estação chuvosa foi coletado em fevereiro de 2011. A precipitação mensal registrada na RECOR durante esse período de coleta está representada graficamente na Figura 3..

A amostragem foi composta por três réplicas biológicas para cada fitofisionomia. O primeiro local de coleta foi determinado aleatoriamente e os demais locais subsequentes foram separados por uma distância de aproximadamente 50 metros dentro de cada fitofisionomia. Em cada local foram feitos 10 pontos de coleta com profundidade dos 10 cm superiores do solo. As amostras de solo foram peneiradas em malha de 2 mm e pedaços de raízes e/ou folhas foram removidos manualmente durante o processo de peneiração. Para determinação do conteúdo gravimétrico, as amostras de solo foram acondicionadas em latas de alumínio e vedadas. O teor gravimétrico de água no solo foi determinado pela diferença entre o peso fresco e o peso seco do solo, após secagem em estufa a 105° C até peso constante.

Vale a pena ressaltar que todos os locais determinados para a coleta eram cuidadosamente escolhidos para estarem localizados longe de formigueiros ou cupinzeiros. Segue um esquema da coleta na Figura 4.

Após a coleta, o material foi mantido em gelo até chegar ao laboratório e posteriormente congelado a -20° C. As características físico-químicas do solo foram analisadas pela empresa particular Soloquímica Ltda. (Tabela 1). Conforme informado pelo técnico responsável pelas análises da empresa Soloquímica, as análises realizadas seguiram o protocolo estabelecido por EMBRAPA (1997).

Para as análises de componentes principais (PCA) com as propriedades físico-químicas do solo das fitofisionomias foi utilizado o programa estatístico PAST (*Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis*, UK)



cerrado denso



mata de galeria



campo sujo



cerrado *sensu stricto*

Figura 2: Imagens referentes as quatro fitofisionomias do Cerrado na Reserva Ecológica do IBGE – Brasília, DF, onde foram coletadas as amostras de solo para análise.

Tabela 1: Propriedades físico-químicas das amostras de solo coletadas na Reserva Ecológica do IBGE (RECOR) durante a estação seca e chuvosa.

Período	Fitofisionomia	Argila -----	Areia (%)	Silte -----	pH (H ₂ O)	P -----	B -----	Cu (ppm)	Fe -----	Mn -----	Carbono orgânico (g/kg)	Ca -----	Mg -----	K (cmolc/dm ³)	Na -----	Al -----
seca	cerrado denso	52.5	27.5	20.0	5.0	0.3	0.65	0.4	124	7.25	45.1	0.3	0.2	0.02	0.01	0.9
seca	campo sujo	42.5	40.0	17.5	5.0	0.1	0.25	0.85	36.1	65.3	46.2	0.2	0.1	0.02	0.01	0.9
seca	<i>sensu stricto</i>	55.0	30.0	15.0	5.0	0.1	0.1	0.45	70.2	26.4	55.3	0.3	0.2	0.02	0.01	1.9
seca	mata de galeria	45.0	42.5	12.5	5.0	2.0	0.63	0.29	124	19.3	83.2	0.6	0.3	0.02	0.01	2.2
chuva*	cerrado denso	52.5	32.5	15.0	4.6	0.5	0.31	0.17	136	3.7	32.0	0.2	0.1	0.09	0.02	1.7
chuva	campo sujo	42.5	40.0	17.5	4.8	2.5	0.33	0.89	125	15.9	35.7	0.2	0.1	0.09	0.05	1.0
chuva	<i>sensu stricto</i>	55.0	30.0	15.0	4.7	1.0	0.21	0.07	146	6.71	33.1	0.2	0.1	0.1	0.02	2.0
chuva	mata de galeria	45.0	42.5	12.5	4.7	5.0	0.19	0.5	85.9	11.1	57.0	0.5	0.1	0.14	0.05	3.1

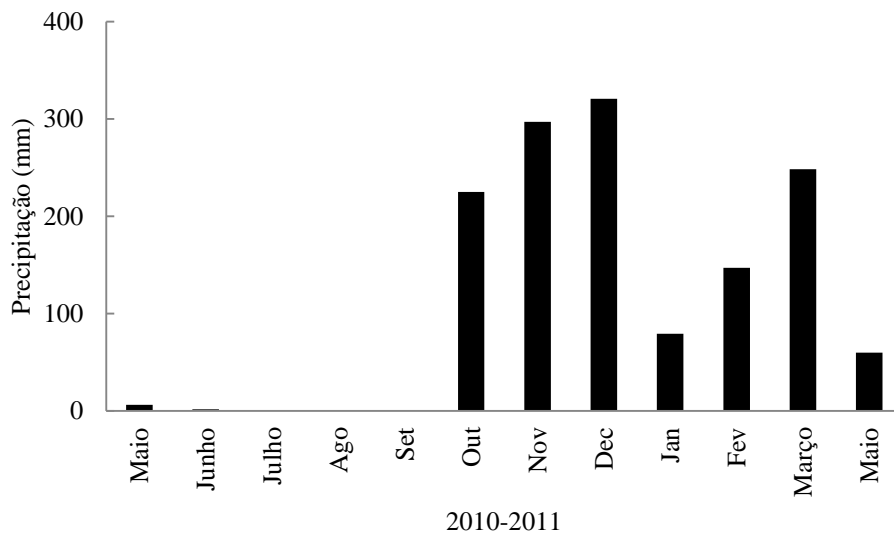


Figura 3: Precipitação mensal (mm) registrada na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília-DF, durante os anos referentes ao período de coletas de amostras de solos.

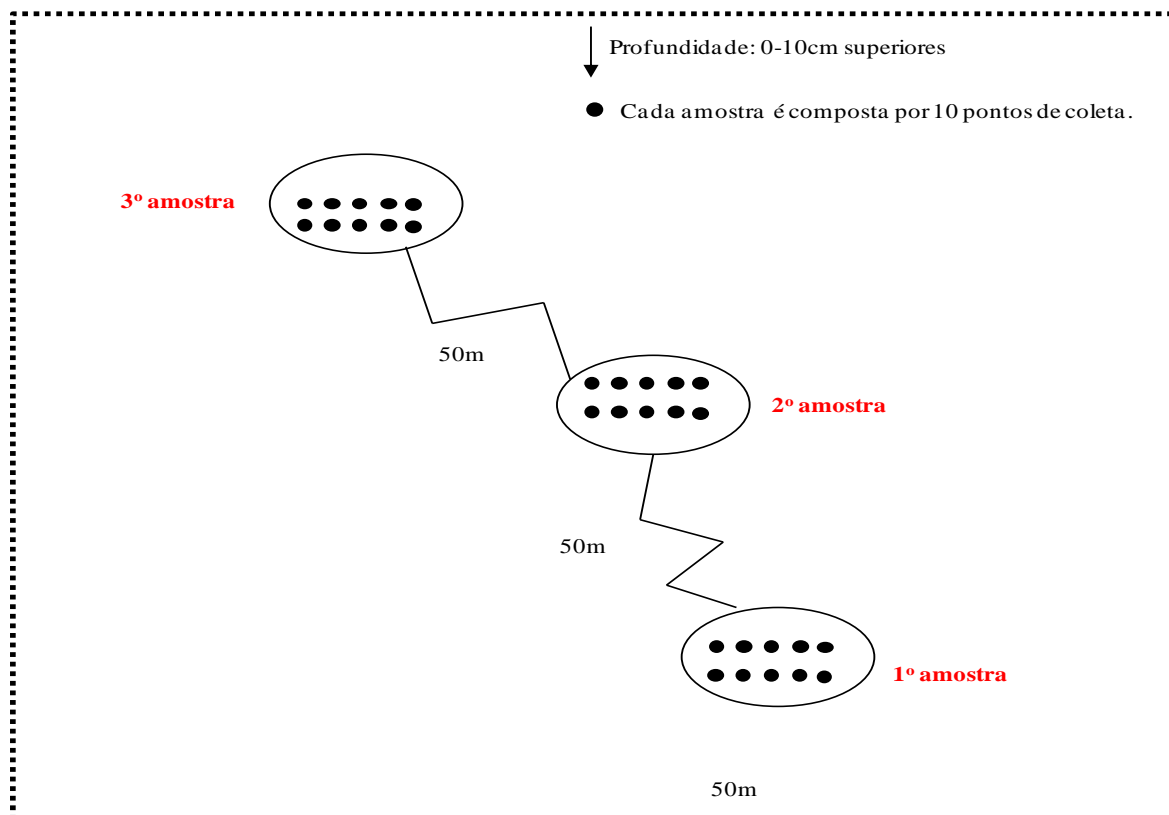


Figura 4: Esquema realizado para a coleta de amostras de solo.

5.2. Extração direta de DNA para análise dos genes do 16S e 18S rRNA.

A extração total direta de DNA de três réplicas biológicas da comunidade microbiana presente nas amostras de solo durante a estação seca e chuvosa foram extraídos utilizando o *kit* PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MOBIO Labs, Inc) conforme as instruções do fabricante. O produto da extração foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 0.8 % contendo brometo de etídeo ($2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) e o seu tamanho, estimado por comparação com marcador 1kb *plus ladder* (USB-EUA).

5.3. Extração direta de DNA para análise metagenômica.

A extração total de DNA, das quatro principais fitofisnomias na estação seca e chuvosa, foi realizada com protocolo de extração de DNA do Kit FastDNA® SPIN Kit (Califórnia, EUA), compatível com o equipamento FastPrep®, produzido pela mesma empresa. Nenhuma modificação foi adicionada as instruções do fabricante. A escolha por um kit diferente para a análise metagenômica teve como objetivo alcançar um maior rendimento de concentração de DNA para corrida *shotgun* (DNA total) no 454 *GS-FLX Titanium*. A *PicoTiterPlate* (PTP) foi dividida em duas regiões (seca e chuva), sendo que cada região foi reservado para a mistura referente a 6 amostras, tendo 3 réplicas biológicas para cada fitofisnomia.

5.4. Pirosequenciamento das sequências do gene rRNA.

Para as análises de pirosequenciamento, os fragmentos do gene do 16S rDNA das 3 réplicas biológicas de DNA de amostras do solo de cada fitofisnomia foram amplificados utilizando oligonucleotídeos iniciadores 787F-1492R que flanqueiam as regiões hipervariáveis V5 a V9 para o domínio *Bacteria* (ARMOUGOM *et al.*, 2009). Para o domínio *Archaea* foram utilizados os oligonucleotídeos 751F-UA1406R região V5 a V8 do gene do 16S rRNA (BAKER *et al.*, 2003). Para os fungos foram utilizados os oligonucleotídeos EF4F-Fung5R, os quais anelam na região V1 a V2 do gene do 18S rRNA (SMIT *et al.*, 1999).

Para possibilitar o sequenciamento de mais de uma amostra por corrida do pirosequenciamento, foram utilizados 12 diferentes MID's (*Multiplex Identifiers*) para cada réplica biológica representante das quatro fitofisnomias. Um exemplo do

esquema da construção das sequências dos oligonucleotídeos iniciadores encontra-se abaixo:

787F

5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGAGTGCCTATTAGATACCCIGGTAG-3'

1492Rm

5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTTCAGGITACCTTGTTACGACTT-3'

azul = adaptadores A ou B da 454 Life Science's

rosa = Key 454 Life Science's

verde = MID (Multiplex Identifiers) 454 Life Science's

vermelho = oligonucleotídeo específico para o Domínio microbiano

Os fragmentos dos genes do 16S e 18S rRNA foram amplificados via reação em cadeia da polimerase (PCR), seguindo dessa maneira: 1X de tampão da Taq polimerase (Invitrogen); 3,0 mM de MgCl₂; 5 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,25 mM de dNTPs; 1,0U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) com volume final da reação 20 µl ajustado com H₂O MiliQ. O ciclo da reação foi realizado com desnaturação inicial de 3 min a 95 °C, seguido por 25 ciclos com desnaturação por 30 segundos a 95 °C, anelamento por 30 segundos a 58 56.5 e 57 °C para bactéria, archaea e fungo respectivamente e por último, extensão por 1,4 minutos a 72 °C, seguido por uma extensão final de 7 minutos a 72 °C e resfriamento a 10 °C.

Para alcançar concentração adequada para o pirosequenciamento, foi necessário repetir o procedimento de PCR 10 vezes para cada amostra biológica. Posteriormente os produtos de PCR foram submetidos à purificação com o auxílio do kit *QIAquick PCR purification* (Chatsworth, CA). Os produtos de PCR foram quantificados via Qubit® (*Life technologies*) e em seguida enviados diretamente para 454 Life Sciences Corporation, Branford, CT, EUA para a execução do pirosequenciamento GS FLX Titanium (*454 Life Science*).

5.5. Análise de bioinformática para dados dos genes do 16S e 18S rRNA.

Com o conhecimento prévio da introdução de erros embutidos na utilização de sequenciamento de 2º geração, os dados foram analisados com cautela, seguindo os principais passos de filtros para a redução dos vieses. Com esse intuito a escolha do pipeline a ser utilizado para essas análises foi o QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) (CAPORASO *et al.*, 2010). O QIIME compreende um pacote completo de programas livres utilizados principalmente para comparação e análises de comunidades microbianas geradas através de plataformas de sequenciamento de alto desempenho.

O primeiro passo realizado para dar inícios às análises foi utilizar os seguintes parâmetros como passos para o primeiro filtro. Nesse primeiro passo é necessário utilizar as sequências nos formatos: Fasta e Qual.

- 1) Remoção das sequências dos oligonucleotídeos;
- 2) Remoção das sequências referentes aos diferentes MID's,
- 3) Remoção das sequências menores que 180 pares de bases;
- 4) Remoção das sequências maiores que 800 pares de bases;
- 5) Utilização de alta precisão: Phred 30;
- 6) Remoção de sequências ambíguas (tamanho máximo permitido = 6 pares de bases);
- 7) Remoção de homopolímeros (tamanho máximo permitido = 6 pares de bases);
- 8) Utilizar janela de qualidade de 50 pares de bases.

Após a execução desses passos muitas sequências foram removidas e apenas as sequências remanescentes são submetidas ao um segundo passo de filtro, dessa vez utilizando os dados do arquivo SFF (*Flowgram*) dessas sequências. Esse é o passo que mais exige de poder computacional. Para determinado fim foi utilizado o algoritmo Denoiser (REEDER *et al.*, 2010) como método para remover ruídos do pirosequenciamento.

Apenas as sequências remanescentes desses dois passos de filtro foram utilizadas para as análises subsequentes. Dessa maneira, as Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) foram definidas por agrupamento a 97% de similaridade utilizando como referência o banco de dados de OTUs mais recente (Fevereiro de 2012) do Greengenes com o método Uclust (EDGAR *et al.*, 2010). Para dar continuidade às análises, foi executado o passo para reservar apenas uma sequência (mais abundante) a qual é denominada de sequência representativa de cada OTU.

O alinhamento múltiplo das sequências representativas de cada OTU foi realizado pelo método PyNAST (CAPORASO *et al.*, 2010) utilizando o arquivo *core_set_aligned* do Greengenes disponível em <http://greengenes.lbl.gov/> como arquivo de comparação (Fevereiro 2012). Com o arquivo das sequências já alinhadas, foi realizado a busca para identificar e excluir sequências quiméricas pelo método Chimera Slayer (HAAS *et al.*, 2011). A taxonomia foi atribuída de acordo com o sistema de classificação do RDP (WANG *et al.*, 2007), aplicando o *confidence threshold* de 80%. Árvore filogenética foi construída pelo método FastTree (PRICE *et al.*, 2010).

Os índices de alpha (*chao1* e *observed_species*) e beta (*Unweighted_UniFrac*, *Weighted_UniFrac*, *Bray_Curtis*, *Canberra*, *Gower*, *Morisita-Horn* e *Soergel*) diversidade foram calculados. Essas sete medidas de β -diversidade foram cuidadosamente selecionadas de acordo com suas propriedades particulares aplicadas em estudos de ecologia microbiana.

Resumidamente, *Unweighted* e *Weighted-UniFrac* são calculados com base na distância filogenética dos grupos taxonômicos, os quais são atualmente as distâncias mais comumente utilizadas na ecologia microbiana (LOZUPONE *et al.*, 2005); distintamente, *Bray_Curtis* foi selecionado por não levar em consideração a distância filogenética entre os grupos amostrados, sendo dessa maneira o coeficiente de similaridade mais utilizado na ecologia clássica (LEGENDRE *et al.*, 1998 1441); Além disso, as medidas de *Canberra* e *Gower* foram selecionados devido a sua capacidade de detectar OTUs raros (KUCZYNSKI *et al.*, 2010 1439) e finalmente as medidas de *Soergel* e *Morisita-Horn* foram recentemente recomendadas, devido ser considerado uma abordagem mais equilibrada e com mais ênfase em OTUs abundantes respectivamente (PARKS *et al.*, 2012).

Dessa maneira, os dados de OTUs para cada estação do ano foram reduzidos a dados binários com a finalidade de calcular o número de OTUs compartilhados entre as amostras de solos. Adicionalmente, foi utilizado o teste de similaridade (ANOSIM) (999 permutações) (CLARKE, 1993) com a finalidade de testar as diferenças na composição da comunidade microbiana entre grupos de amostras de solo assim como o teste de Mantel foi utilizado para examinar a correlação entre duas matrizes de distância utilizando 999 permutações.

Para testar a diferença entre as amostras baseados em uma medida de distância no gráfico de PCoA, o teste não paramétrico ANOSIM foi realizado. Esse teste resulta em um valor de R, no qual R=1 significa que a separação da estrutura da comunidade é encontrada, ou se não houve a separação (R = 0). Mas detalhadamente, valores de R > 0.75 são comumente interpretados como fortemente separados, R > 0.2 como separados, mas valores de R < 0.2 são interpretados como não havendo separação entre os grupos (CLARKE, 1993).

Finalmente, correlação de Pearson foi utilizada para testar as relações entre a abundância relativa de grupos taxonômicos em relação à umidade das amostras de solo. Os dados foram plotados em gráficos de dispersão. Foram adotados o nível de significância $P < 0,05$ e o intervalo de confiança de 95 % para as relações observadas. Nestas análises, foi estipulado um padrão de correção para múltiplos testes chamado de FDR (*false discovery rate*) (BENJAMINI *et al.*, 1995), o valor de FDR escolhido foi de 5 %.

Os testes estatísticos sobre as diferenças taxonômicas entre as amostras foram calculados por meio do software STAMP utilizando o Teste exato de Fisher com múltipla correção de Bonferroni ($P < 0,01$) (cobertura nominal de 95%) (PARKS *et al.*, 2010).

Por ultimo, a análise de interação em rede foi realizada com um arquivo único contendo apenas uma réplica biológica para cada fitofisionomia para as estações seca e chuva. As Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) foram definidas por agrupamento a 90 % de similaridade utilizando o método Uclust (EDGAR *et al.*, 2010). O agrupamento a 90 %, o qual corresponde aproximadamente ao nível hierárquico taxonômico de família para bactérias, foi usado para gerar uma quantidade menor de

OTUs. Pois em comparação, o agrupamento a 97 % resulta em uma quantidade maior de OTUs fazendo com que esse tipo de análise seja visualmente mais difícil.

A análise estatística para fornecer suporte para os padrões à análise de network foi realizada com o método teste G para independência. O teste G para independência foi usado para testar se amostras que se agruparam em um determinado nó (fitofisionomias) são mais conectadas dentro desse nó do que se fosse esperado por acaso. O arquivo final foi visualizado com o auxílio do Cytoscape (SMOOT *et al.*, 2011).

5.6. Análise de bioinformática para dados metagenômicos.

As sequências geradas pelo pirosequenciamento foram submetidas a dois passos de filtro. Primeiramente as sequências foram analisadas contra réplicas artificiais pela ferramenta de bioinformática descrita por (GOMEZ-ALVAREZ *et al.*, 2009). Posteriormente as sequências remanescentes desse primeiro filtro foram submetidas ao segundo passo que são os passos de controle de qualidade do MG-RAST versão 3.2 (MEYER *et al.*, 2008).

Dentro MG-RAST, a identificação taxonômica foi determinada com auxílio do banco de dados do M5NR (Ribosomal Database Project) com esses parâmetros determinados: *Max. E-Value Cutoff* $1e-10$, *Min. % Identity Cutoff* = 60% e *Min. Alignment Length Cutoff* = 50. O banco de dados M5NR consiste em uma integração de bases de diversos dados de sequência (ex: NCBI's nr, KEGGs, GO, Greengenes, JGI, RDP, SEED, SILVA, VBI, UniProt, eggNOG) em um único banco de dados.

As atribuições metabólicas foram anotadas utilizando o banco de dados de subsistemas do SEED (Overbeek *et al.*, 2005) com esses parâmetros determinados: *Max. E-Value Cutoff* $1e-10$, *Min. % Identity Cutoff* = 60% e *Min. Alignment Length Cutoff* = 50. Visualizações referentes a análises de vias metabólicas foram realizados com os parâmetros: *Max. E-Value Cutoff* $1e-30$, *Min. % Identity Cutoff* = 97% e *Min. Alignment Length Cutoff* = 50. Os testes estatísticos sobre as diferenças taxonômicas e metabólicas entre as amostras foram calculados por meio do programa STAMP (PARKS *et al.*, 2010). As diferenças estatisticamente significativas entre os subsistemas dos dados metagenômicos foram identificados utilizando o Teste exato de Fisher com múltipla correção de Bonferroni ($P < 0,01$) (cobertura nominal de 95%).

5.7. Montagem das sequências metagenômicas

Para uma abordagem alternativa de análise dos dados metagenômicos, foi realizado uma montagem das sequências com o intuito de produzir vários fragmentos maiores contínuos (*contigs*). Cada *contig* foi produzido a partir da sobreposição de várias sequências com trechos similares entre si.

As sequências foram unidas conforme a estação amostrada, ou seja, todas as réplicas biológicas realizadas para cada fitofisionomia foram unidas com o intuito de diminuir a complexidade da montagem dos *contigs*. Consequentemente não visualizaremos as diferenças em cada fitofisionomia individualmente, mas sim obter um panorama geral das principais diferenças devido apenas à disponibilidade de água entre as amostras de solo do bioma Cerrado em contrastantes estações do ano: seca/ chuva.

Os contigs foram montados utilizando os arquivos .sff com parâmetros padrão do Newbler (MARGULIES *et al.*, 2005), tendo em vista a ausência de parâmetros específicos para montagem de sequências provindas de metagenoma de solos. Os parâmetros foram: *seed step: 12; seed length: 16; seed count: 1; min overlap length: 40; min. overlap identity: 90; align identity score: 2; align difference score: -3*. Posteriormente, todos os *contigs* foram submetidos ao programa MetaGeneMark (ZHU *et al.*, 2010) para a predição de genes. Finalmente, o banco de dados IMG associados com todos os registros do KEGG ortólogos (KO) disponível em (<http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi>) foi escolhido para realizar a anotação dos genes por meio BLASTp.

6.0. Resultados

6.1. Análise do solo das fitofisionomias do bioma Cerrado.

As análises das propriedades físico-químicas das amostras de solo nas diferentes fitofisionomias na estação seca e chuvosa (Tabela 1), demonstraram que o pH do solo aferido foi ácido variando de 4.6 a 5.0. Em relação à distribuição das partículas de solo, as amostras de solo da fitofisionomia de mata de galeria, independentemente da estação amostrada, demonstraram maiores valores de areia e valores reduzidos de argila quando comparados com as demais três fitofisionomias (Tabela 1).

Na profundidade de 0-10 cm de coleta de amostras de solo, geralmente maiores valores para P, Fe, K e Al foram encontrados durante a estação chuvosa (Tabela 1). Também foi observado que a quantidade de carbono orgânico determinado em mata de galeria foi quase o dobro da encontrada nas outras três áreas, independentemente da estação amostrada.

A distribuição da precipitação acumulada durante o período de coleta desse atual estudo (setembro de 2010 a fevereiro de 2011) está representada graficamente na Figura 3. No mês de setembro, durante a coleta das amostras referentes à estação seca, a precipitação acumulada no mês foi de 0 mm. Para o mês de fevereiro, a coleta das amostras referentes à estação chuvosa, a distribuição da precipitação mensal foi de aproximadamente 120 mm (Figura 3). O conteúdo gravimétrico de água no solo na profundidade 0-10 cm indicou variações da precipitação durante o ano (Figura 5) e foram detectadas diferenças significativas entre as amostras das estações seca e chuvosa. A umidade do solo variou de 20 % a 50 % entre as diferentes fitofisionomias, observando que a fitofisionomia florestal mesmo durante a estação seca detém de valores próximos de porcentagem de umidade no solo (30%) das demais fitofisionomias quando comparado durante a estação chuvosa.

De acordo com a Análise de Componentes Principais (PCA) dos parâmetros físico-químicos do solo na estação seca e chuvosa (Figura 6), cerrado *sensu stricto* e cerrado denso agruparam-se no mesmo quadrante, separando campo sujo e mata de galeria em quadrantes diferentes.

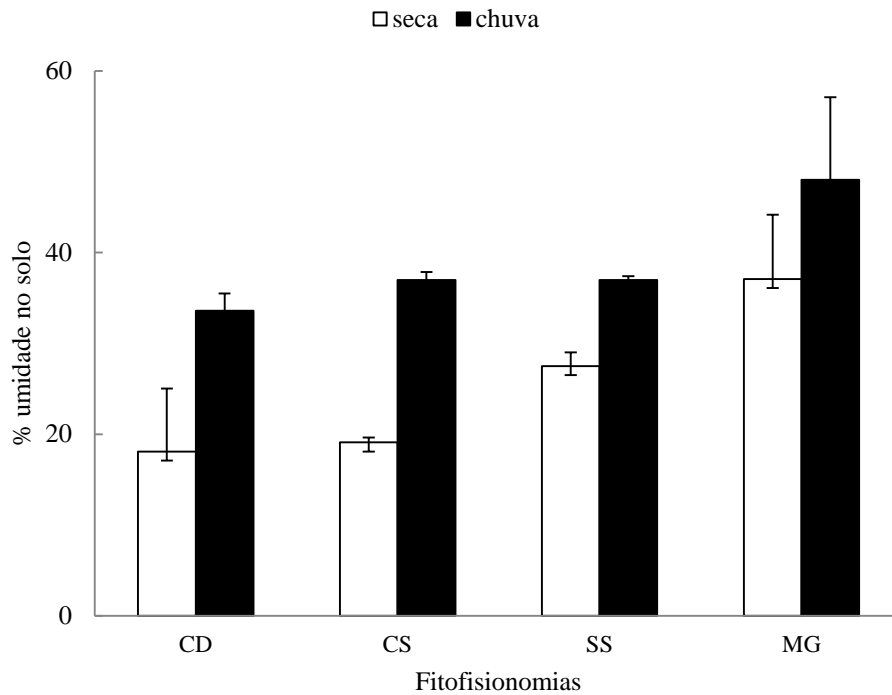


Figura 4: Média da mensuração de umidade do solo das três réplicas coletadas para cada fitofisionomia nos períodos de seca e chuva. CD=cerrado denso; CS= campo sujo; SS= cerrado *sensu stricto* e MG= mata de galeria.

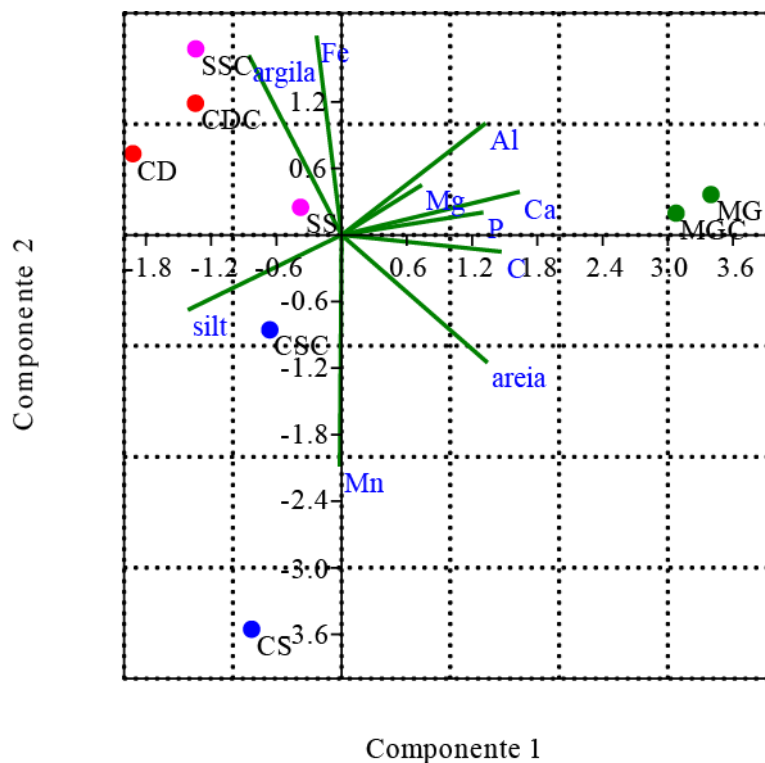


Figura 6: Análise de Componentes Principais (PCA) das propriedades físico-químicas do solo das fitofisionomias do Cerrado. Legenda: CD=cerrado denso na estação seca; CDC=cerrado denso na estação chuvosa; CS=campo sujo na estação seca; CSC=campo sujo na estação chuvosa; SS=cerrado *sensu stricto* na estação seca; SSC=cerrado *sensu stricto* na estação chuvosa; MG=mata de galeria na estação seca e MGC= mata de galeria na estação chuvosa.

6.2. Análise da comunidade microbiana do solo nas estações seca e chuvosa

Amostras de solo de quatro diferentes fitofisionomias (cerrado denso, campo sujo, cerrado *sensu stricto* e mata de galeria) do bioma Cerrado foram analisadas. As amostras de solo foram coletadas durante a estação seca e chuvosa durante 1 ano, com três réplicas biológicas para cada fitofisionomia, totalizando 12 amostras.

Para esse delineamento experimental foram realizados, ao total, duas corridas de pirosequenciamento. A primeira corrida foi reservada para as amostras do domínio *Bacteria* (seca e chuva) e para o domínio *Archaea* (seca). Posteriormente a segunda corrida de pirosequenciamento foi reservada para os fungos (seca e chuva) e para o domínio *Archaea* (chuva).

É importante ressaltar, que a escolha dos oligonucleotídeos iniciadores (751F-UA1406R) para amplificar o domínio *Archaea* utilizada nesse estudo não foi bem sucedida, pois este oligonucleotídeos iniciadores amplificou preferencialmente o domínio *Bacteria*, resultado também encontrado por (PIRES, 2012). Nesse estudo, apenas 10 % das sequências totais obtidas a partir do pirosequenciamento pertenciam ao domínio *Archaea*. Apesar da baixa cobertura de sequências para este domínio, o conjunto de dados gerados durante esse estudo é ainda maior do que qualquer outro dado para comunidade de archaeas publicados nestes solos. A tabela 2 mostra o resultado total das duas corridas de pirosequenciamento.

Tabela 2: Visão geral do resultado final das corridas de pirosequenciamento obtidos a partir das amostras de solo das quatro fitofisionomia do bioma Cerrado.

1º/454	Amostra	Estação amostrada	Sequências de qualidade	Média das leituras
1	Bactéria	seca	258,350	535
2	Bactéria	chuva	252,829	534
3	Archaea	seca	17,349	495
2º/454				
1	Fungos	seca	10,576	499
2	Fungos	chuva	37,386	525
3	Archaea	chuva	9,794	490

Um total de 403.569, 27.066 e 35.979 sequências de alta qualidade foram obtidas após os passos de filtros de qualidade para bactéria, archaea e fungos respectivamente (Tabela 3). Devido aos valores discrepantes entre as regiões do pirosequenciamento, o qual já é esperado, foi necessário delimitar um número de sequências mínimas que pudesse englobar todas as amostras, evitando dessa maneira a introdução de viés nas análises subsequentes (α e β -diversidade). De fato, para o domínio das *Bacterias* as análises foram realizadas com 4,438 sequências e 107 e 276 sequências para o domínio *Archaea* e para o Reino Fungi respectivamente. As amostras RSS.5 (2ª réplica biológica de cerrado *sensu stricto* durante a estação chuvosa referente ao domínio *Bacteria*) e CS.5 (2ª réplica biológica de campo sujo durante a estação seca referente ao Fungos) foram excluídas por não conter número mínimo para as análises posteriores (Tabela 3). Estes níveis de valores delimitados podem não ser suficientes para caracterizar toda a extensão da diversidade de bactérias, archaeas e fungos nessas amostras de solos coletados. No entanto, estudo anterior sugere que foi possível comparar quantitativamente a composição geral e diferenças relativas na diversidade da comunidade microbiana com estes níveis de valores de sequências (SHAW *et al.*, 2008).

De acordo com o índice de diversidade de Shannon-Wiener (H') (MAGURRAN, 2004) a diversidade de OTUs observados foi altamente variável ao longo das 24 amostras de solo (Tabela 3). A fitofisionomia de mata de galeria apresentou os maiores valores médios de Shannon para a comunidade bacteriana com 7.89 na estação seca e 7.87 na estação chuvosa. As outras fitofisionomias de solo apresentaram menor riqueza de espécies com base no índice de Shannon. Para a comunidade de archaeas, a fitofisionomia de mata de galeria continuou a apresentar os maiores valores médio (4.7) durante a estação seca, mas em contrapartida durante a estação chuvosa, campo sujo foi a fitofisionomia que apresentou os maiores valores de Shannon (3.8).

Finalmente, para a comunidade de fungos a fitofisionomia que apresentou maiores valores de Shannon na estação seca foi a fitofisionomia cerrado *sensu stricto* (5.2), onde na estação chuvosa a fitofisionomia campo sujo sugere ser um ambiente mais diverso com valores médio de (5.4).

Tabela 3: Frequência de diversidade de Bactéria, Archaea e Fungos ao longo das estações seca e chuvosa no bioma Cerrado revelados por análise de gene rRNA.

Amostra	Fitofisionomia	Estação	Bactéria			Archaea			Fungos		
			No. sequências	No. OTU observados	Índice de shannon	No. sequências	No. OTU observados	Índice de shannon	No. sequências	No. OTU observados	Índice de shannon
CD1	Cerrado denso	seca	27376	885	7.12	1046	77	4.45	662	100	4.75
CD5	Cerrado denso	seca	17375	822	7.18	3622	123	4.69	565	92	4.98
CD10	Cerrado denso	seca	53538	1216	7.79	147	42	4.49	280	76	5.56
CS1	Campo sujo	seca	11132	633	6.58	136	29	3.91	164	51	4.74
CS5	Campo sujo	seca	8202	555	6.71	107	32	4.31	276	69	5.01
CS10	Campo sujo	seca	7838	564	6.76	601	51	4.18	295	75	5.38
SS1	<i>Sensu stricto</i>	seca	4438	422	6.39	278	51	4.50	403	96	5.53
SS5	<i>Sensu stricto</i>	seca	9772	638	7.23	403	52	4.37	589	93	4.63
SS10	<i>Sensu stricto</i>	seca	17334	799	7.32	2198	118	5.05	486	103	5.51
MG1	Mata de galeria	seca	12504	747	7.71	776	77	4.79	958	105	4.69
MG5	Mata de galeria	seca	10997	948	8.28	7760	190	5.04	997	90	4.44
MG10	Mata de galeria	seca	16956	809	7.69	275	47	4.31	1060	69	2.87
RCD1	Cerrado denso	chuva	7986	643	7.30	835	42	3.13	1340	154	5.30
RCD5	Cerrado denso	chuva	15914	728	7.15	171	26	3.45	3016	188	5.51
RCD10	Cerrado denso	chuva	30217	930	7.23	404	55	4.47	941	134	5.34
RCS1	Campo sujo	chuva	16174	860	7.78	760	66	3.92	1652	158	5.64
RCS5	Campo sujo	chuva	12958	757	7.27	438	50	3.67	2236	174	5.43
RCS10	Campo sujo	chuva	6248	871	8.04	563	54	4.01	2991	194	5.38
RSS1	<i>Sensu stricto</i>	chuva	59068	1035	7.54	1505	86	4.08	2505	166	5.28
RSS5	<i>Sensu stricto</i>	chuva	1847	365	7.25	704	33	2.93	3259	118	2.41
RSS10	<i>Sensu stricto</i>	chuva	10199	720	7.56	695	52	3.88	4528	146	3.62
RMG1	Mata de galeria	chuva	10499	788	7.79	2019	133	4.60	3115	181	5.42
RMG5	Mata de galeria	chuva	19453	821	7.76	1209	80	3.81	1335	126	4.29
RMG10	Mata de galeria	chuva	15544	1117	8.05	491	44	2.50	2326	148	4.97

CD= cerrado denso; CS= campo sujo; SS= cerrado sensu stricto e MG= mata de galeria. Os valores 1, 5 e 10 são referentes às três réplicas biológicas utilizadas.

Em relação riqueza/abundância, estimado pelo índice de Chao1, as curvas de rarefação demonstraram que, para as comunidade bacterianas houve diminuição da riqueza de OTUs observados durante a estação seca, exceto para a fitofisionomia de cerrado denso (Figura 7 a-d), similarmente às comunidades bacterianas, a comunidade fúngica apresentou maior riqueza de OTUs durante a estação chuvosa, exceto nesse caso onde cerrado *sensu stricto* foi à fitofisionomia que apresentou decréscimo no número de riqueza de OTUs durante a estação chuvosa (Figura 7 i-m).

Ao contrário, a estação seca foi detectada possuir maior riqueza de OTUs dentro de todas as fitofisionomias analisadas para a comunidade de archaea (Figura 7 e-h).

Outra maneira de comparar como as comunidades têm sido bem amostradas consiste em traçar curvas de abundância relativa, no qual os OTUs são plotados dos mais abundantes para os OTUs menos abundantes. As curvas de abundância foram plotadas individualmente para cada fitofisionomia para bactérias, archaeas e fungos (Figura 8).

A Figura 8 (a-d) é referente ao domínio *Bacteria*, os gráficos demonstraram que a relação de abundância dos OTUs não segue um padrão entre as duas estações para as fitofisionomias. Para a área de cerrado denso destaca-se a estação seca como tendo mais OTUs raros (baixa abundância), para a área de campo sujo destaca-se a estação chuvosa com mais OTUs raros, o qual pode ser relacionado ao índice de Shannon e Chao1 (Figura 7 b) (Tabela 3). Adicionalmente, a maior concentração de OTUs com baixa abundância para a área de cerrado *sensu stricto* ocorreu na estação seca. A área de mata de galeria foi a que mais houve homogeneização entre os dois períodos em relação à abundância de OTUs.

As comunidades para o domínio *Archaea* (Figura 8 e-h) apresentaram um comportamento semelhante ao domínio *Bacteria*, exceto para a fitofisionomia mata de galeria, no qual a estação seca apresentou um número maior de OTUs tido como raros na estação seca.

Finalmente, a comunidade fúngica demonstrou ter mais OTUs com baixa abundância durante a estação chuvosa para todas as fitofisionomias analisadas (Figura 8 i-m).

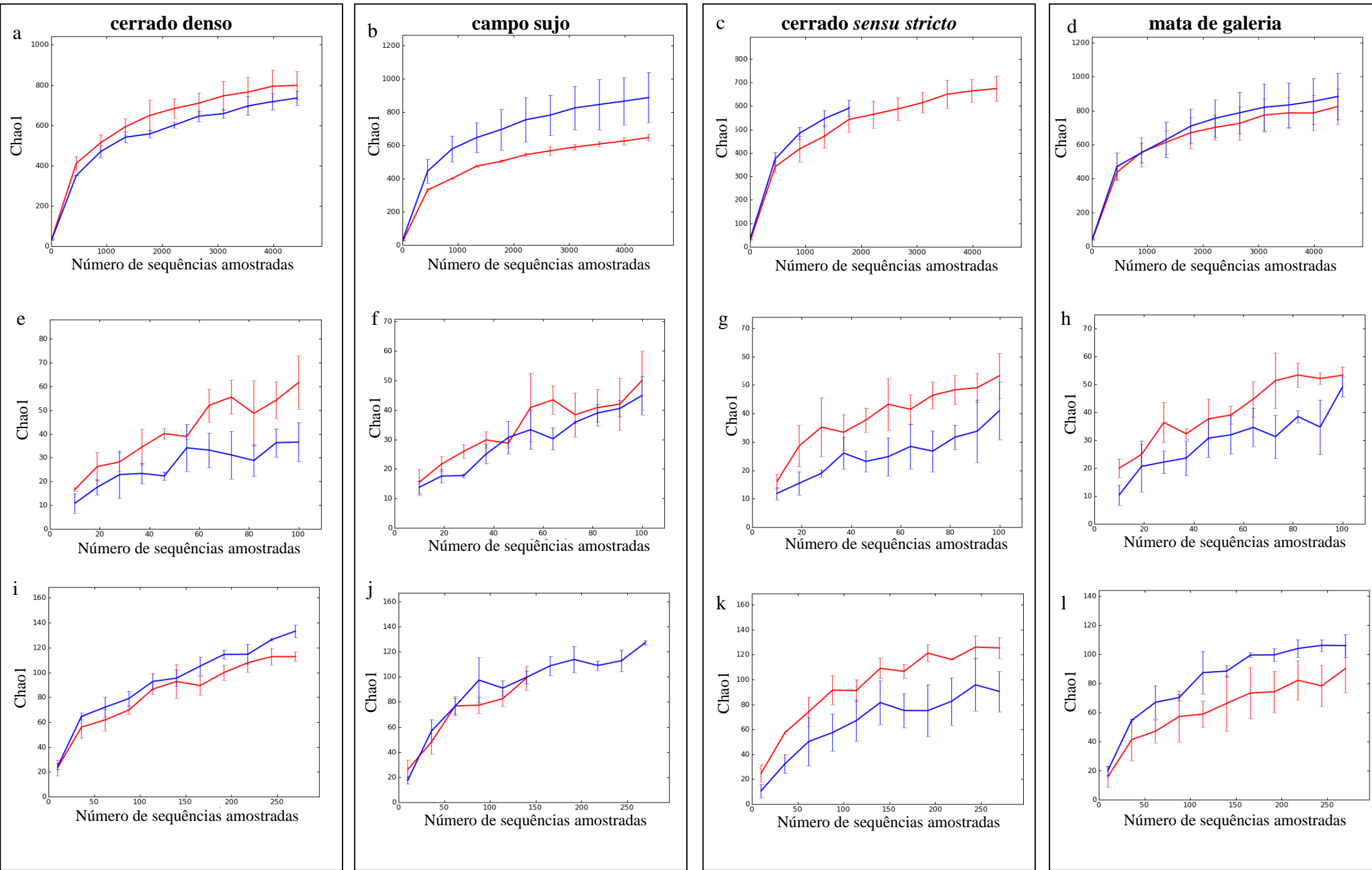
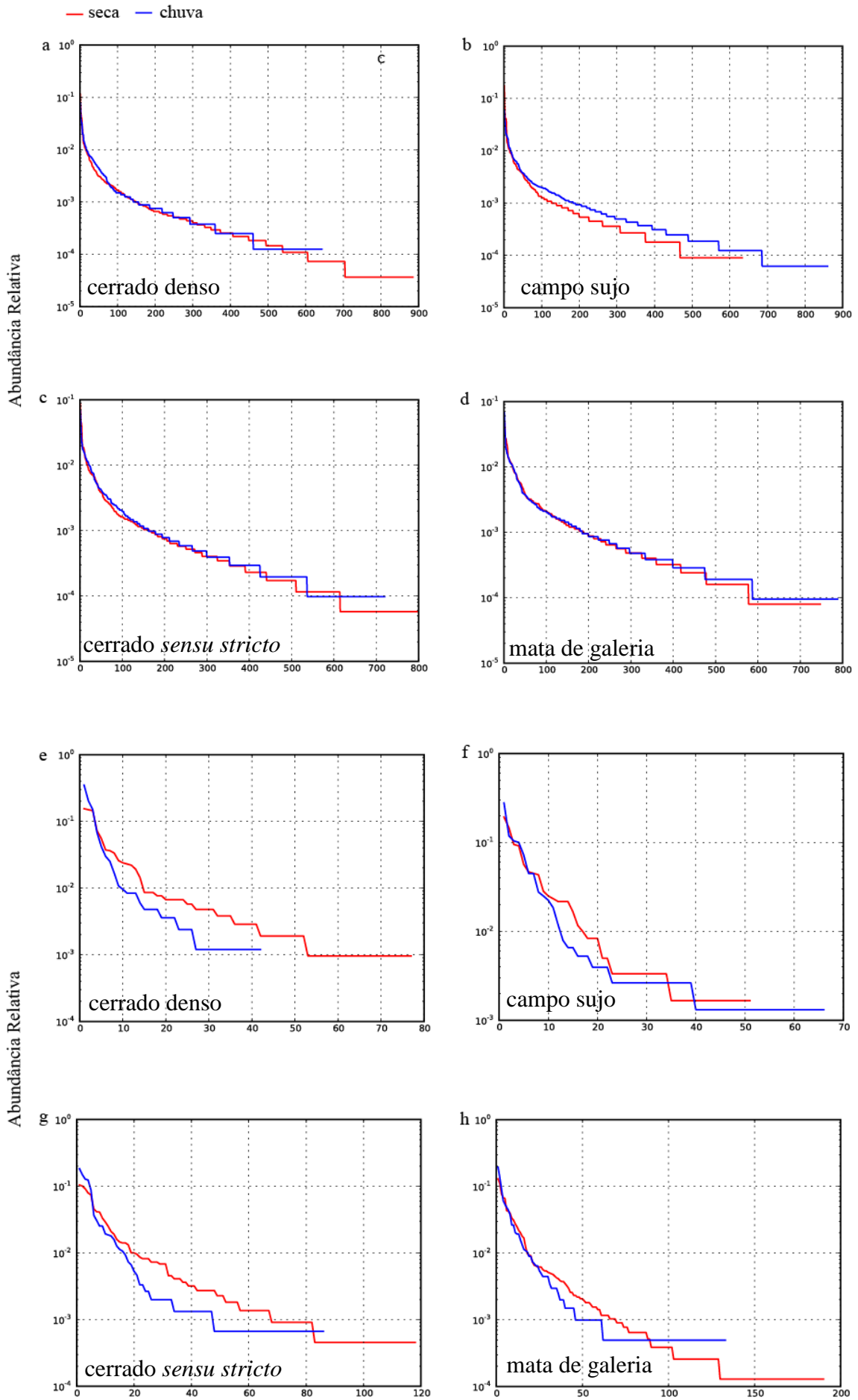


Figura 7: Curvas de rarefação, estimado por Chao1, das seqüências do gene rRNA do solo de fitofisionomias do Cerrado obtidas por pirosequenciamento, com um ponto de corte de 3%, calculada a partir de valores mínimos de seqüência para comunidade de bactérias (a-d); archaeas (e-h) e (i-l) fungos. A estação seca e chuvosa é representada pela barra vermelho e azul respectivamente. As barras representam o desvio padrão da média das duas amostras compostas de cada fitofisionomia.



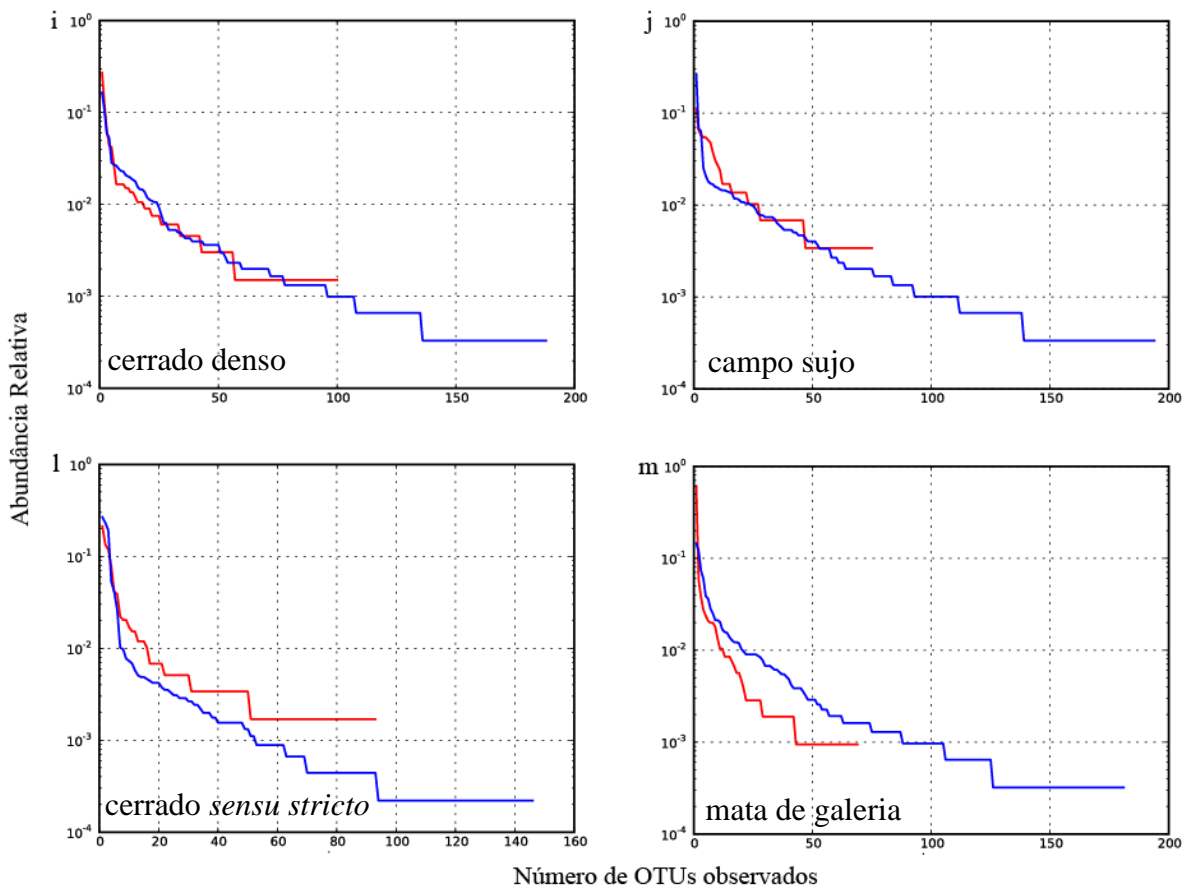


Figura 8: Abundância relativa do número de OTUs observados presente nas quatro diferentes fitofisionomias ao longo das contrastantes estações do ano. (a-d): Dados referentes a comunidade de bactérias; (e-h): archaeas e (i-m): fungos. As cores: vermelho e azul representam as estações seca e chuvosa respectivamente.

6.3. Análise da composição e estrutura da comunidade bacteriana do solo na estação seca e chuvosa

Com base nos resultados obtidos utilizando o banco de dados do RDP II (*Ribosomal Database Project*), a distribuição em nível de filo bacteriano para cada conjunto de dados revelou que *Acidobacteria*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *AD3*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes* e *Chloroflexi* foram os filos mais abundantes (Figura 9). Menor atribuição de sequências (com frequência menor que 1%) foi relacionada com os filos *Armatimonadetes*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *GAL 15*, *WPS-2*, *TM7* e *Elusimicrobia*.

Com análises de pirosequenciamento utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 787F- 1492R foi possível também encontrar sequências do gene do 16S rRNA

pertencentes ao domínio *Archaea* no solo das fitofisionomias do Cerrado. A porcentagem de sequências do domínio *Archaea* é pequena, abaixo de 0,1 % e foram encontradas sequências dos filos *Crenarchaeota* e *Euryarchaeota*. O filo *Crenarchaeota* correspondeu 0,2 % do total de sequências analisadas e o filo *Euryarchaeota* correspondeu de 0,1 % do total de sequências obtidas por pirosequenciamento.

Acidobacteria foi o filo dominante em todas as comunidades bacterianas estudadas, correspondendo aproximadamente 55 % das sequências totais de bactérias analisadas, independentemente da estação amostrada. Nas quatro fitofisionomias foram encontradas sequências correspondentes aos grupos de Acidobacteria-Gp1 (2,4%), Acidobacteria-Gp2 (10,9%), Acidobacteria-Gp5 (1,6%) e Acidobacteria-Gp6 (3,4%).

Dentre o filo *Proteobacteria*, *Alpha-Proteobacteria* foi à classe mais abundante apresentando 11,5 % na estação seca e 14,5 % durante a estação chuvosa. Em ambas as estações, membro de *Rhizobiales* e *Rhodospirillales* foram dominantes para a classe *Alpha-Proteobacteria*, assim como *Burkholderiales*, *Myxococcales*, *Xanthomonadales* foram dominantes para *Beta/Delta/Gamma-Proteobacteria* respectivamente.

A proporção de filos desconhecido não foi detectado nessas análises. Este fator pode ser atribuído à utilização do método de agrupamento de sequências utilizado para a comunidade bacteriana (vide Material e Métodos) onde sequências que não obtiveram similaridade com o banco de dados de OTUs de referência do Greengenes, nesse caso, foram descartadas das análises subsequentes.

Entretanto, com a utilização desse método de agrupamento de sequências, tem-se a vantagem de que para alguns OTUs (2,7%) a classificação taxonômica para comunidades bacterianas foi possível à elucidação completa. Dentre as espécies mais representadas, destacam-se: *Sphingomonas wittichii*, *Clostridium perfringens*, *Propionibacterium acnes*, *Bdellovibrio bacteriovorus*, *Roseateles depolymerans*, *Burkholderia tuberum*, *Bradyrhizobium elkanii* e *Candidatus Koribacter versatilis*.

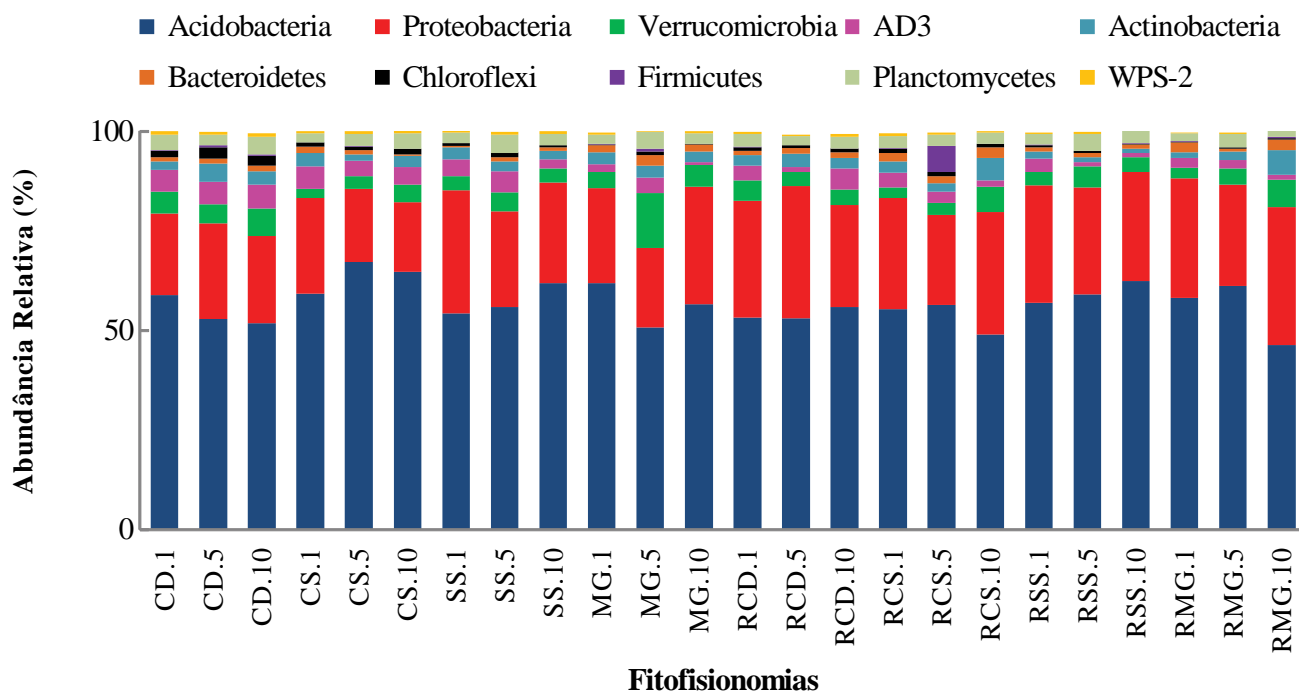


Figura 9: Abundância relativa dos filos bacterianos associados às quatro diferentes fitofisionomias do Cerrado nas estações seca e chuvosa. Sequências dos genes do 16S rRNA foram classificadas pelo RDP a 80% pelo QIIME. As doze primeiras amostras da esquerda para a direita são referentes à estação seca e posteriormente seguem as doze amostras durante a estação chuvosa.

Após a estação seca, foi possível detectar diferenças significativas referentes à abundância relativa de sequências para a comunidade bacteriana quando considerando (α 0.05) (p -value < 0,01) e correção de Bonferroni para os teores teor gravimétrico de água nas amostras de solo das quatro fitofisionomias (Figura 10 -13).

Dentre os filos com frequência maior que 1 %, *Acidobacteria* e *Proteobacteria* apresentaram aumento na sua abundância relativa durante a estação chuvosa. Os filos *Actinobacteria*, *AD3*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes* e *Verrucomicrobia* tiveram uma diminuição detectada na sua abundância relativa durante a estação chuvosa para a fitofisionomia de cerrado denso (Figura 10 a),

Apesar da porcentagem de sequências do domínio *Archaea* ter sido pequena (0,1%) em relação à quantidade total de sequências obtidas para o domínio *Bacteria*, o filo *Crenarchaeota* teve uma diminuição detectada na sua abundância relativa durante a estação chuvosa, assim como também foi detectado redução na abundância relativa dos

filos *Armatimonadetes*, *Firmicutes*, *Nitrospirae* e *WPS-2* para a fitofisionomia de cerrado denso (Figura 10b). A abundância relativa dos filoss raros (frequência menor que 1%) *Cyanobacteria*, *TM6* e *TM7* também foi detectada variação entre a estação seca e chuvosa (Figura 10b).

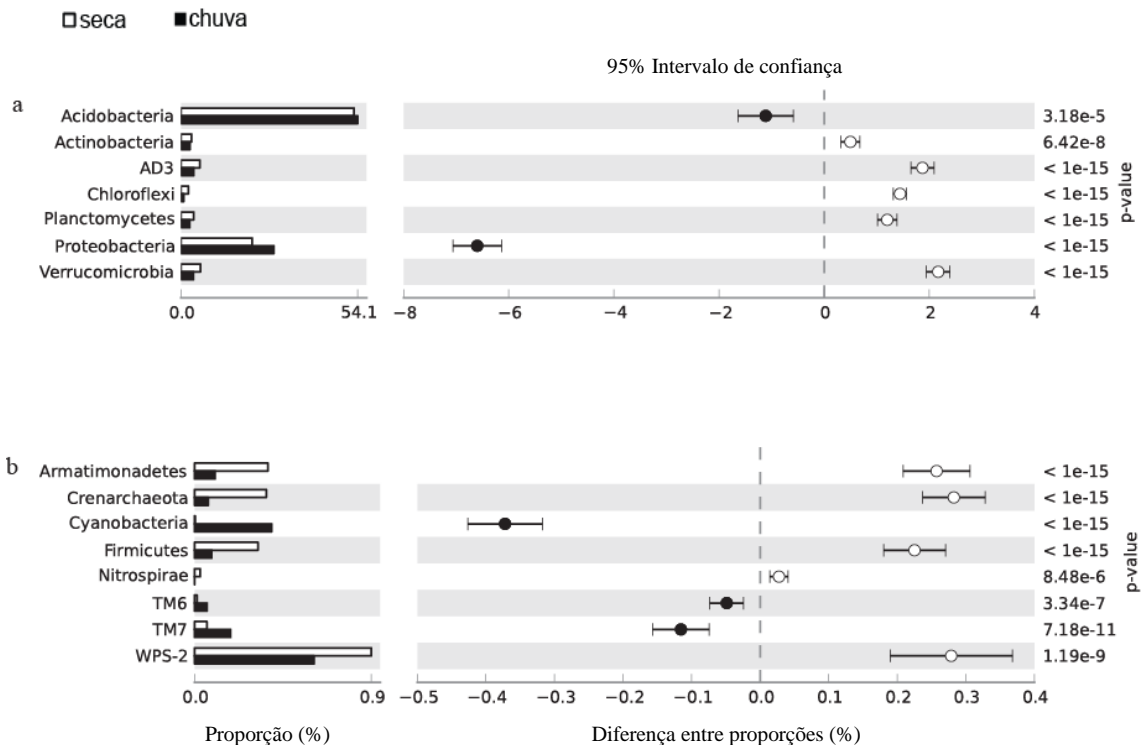


Figura 10: Proporção relativa de abundância referente ao domínio Bactéria distribuída em cerrado denso; (a) filoss com abundância maior que 1 % e (b) filoss com abundância menor que 1 %. O gráfico demonstra primeiramente a proporção média de sequências, a diferença nas proporções médias para cada par de amostras e por ultimo o *p*-value indicando se a proporção média é igual para um determinado par.

Para amostras de solo referentes à fitofisionomia campo sujo, dez filoss que apresentaram alteração em sua abundância relativa entre as duas estações foram detectados (Figura 11 a-b). O filo *Acidobacteria* apresentou declínio em sua abundância relativa durante a estação chuvosa, perfil ao contrário foi detectado para o filo *Proteobacteria* (Figura 11 a). Entre os filoss bacterianos pouco abundantes detectados na fitofisionomia campo sujo, os filoss *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Elusimicrobia*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes* e *TM7* foram os mais representativos

durante a estação chuvosa, ao contrário, o filo *AD3* foi o único que apresentou diminuição em sua abundância relativa durante a estação chuvosa (Figura 11 b).

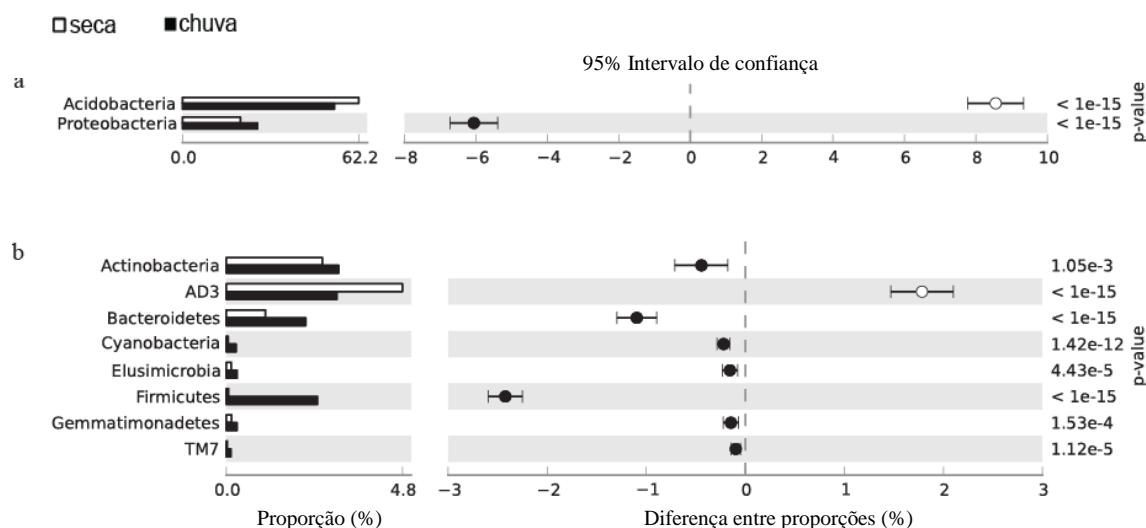


Figura 11: Proporção relativa de abundância referente ao domínio *Bacteria* distribuída em campo sujo; (a) filas com abundância maior que 5% e (b) filas com abundância menor que 5%. O gráfico demonstra primeiramente a proporção média de sequências, a diferença nas proporções médias para cada par de amostras e por ultimo o *p* -value indicando se a proporção média é igual para um determinado par.

Os filas *Actinobacteria*, *AD3*, *Planctomycetes* e *Verrucomicrobia* foram detectados com frequência maior que 10 % na fitofisionomias cerrado *sensu stricto*, indicando redução na abundância relativa desses filas durante a estação chuvosa (Figura 12 a). Adicionalmente, o número de representantes do filo *Proteobacteria* foi maior durante a estação chuvosa (Figura 12 a). Nesse contexto, foram detectados três filas com frequência menor a 0,7 %, os quais tiveram suas abundâncias relativas significativamente reduzida durante a estação chuvosa, semelhante aos filas *Chloroflexi*, *TM6* e *WPS-2* (Figura 12 b). Dentre os filas com frequência menor que 0,7 %, *Elusimicrobia* foi o único que apresentou aumento em sua abundância relativa durante a estação chuvosa na fitofisionomia cerrado *sensu stricto* (Figura 12 b).

Para a fitofisionomia mata de galeria foram detectadas diferenças significativas entre as duas estações em nove filas (Figura 13 a-b). A estação seca apresentou-se enriquecida com sequências referentes aos filas *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Armatimonadetes*, *Firmicutes*, *TM6* e *WPS-2* (Figura 13 a-b). Foi observado que os

membros pertencentes aos filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Cyanobacteria* tiveram suas abundâncias relativas aumentadas durante a estação chuvosa quando comparado com a estação seca.

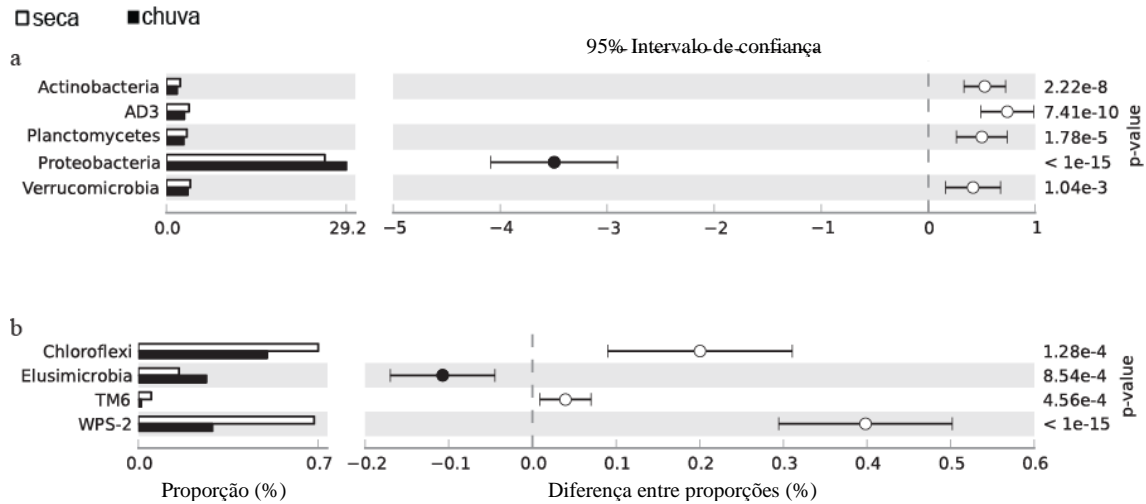


Figura 12: Proporção relativa de abundância referente ao domínio *Bacteria* distribuída em cerrado *sensu stricto*; (a) filotaxões com abundância maior que 10% e (b) filotaxões com abundância menor que 0.7%. O gráfico demonstra primeiramente a proporção média de sequências, a diferença nas proporções médias para cada par de amostras e por último o *p*-value indicando se a proporção média é igual para um determinado par.

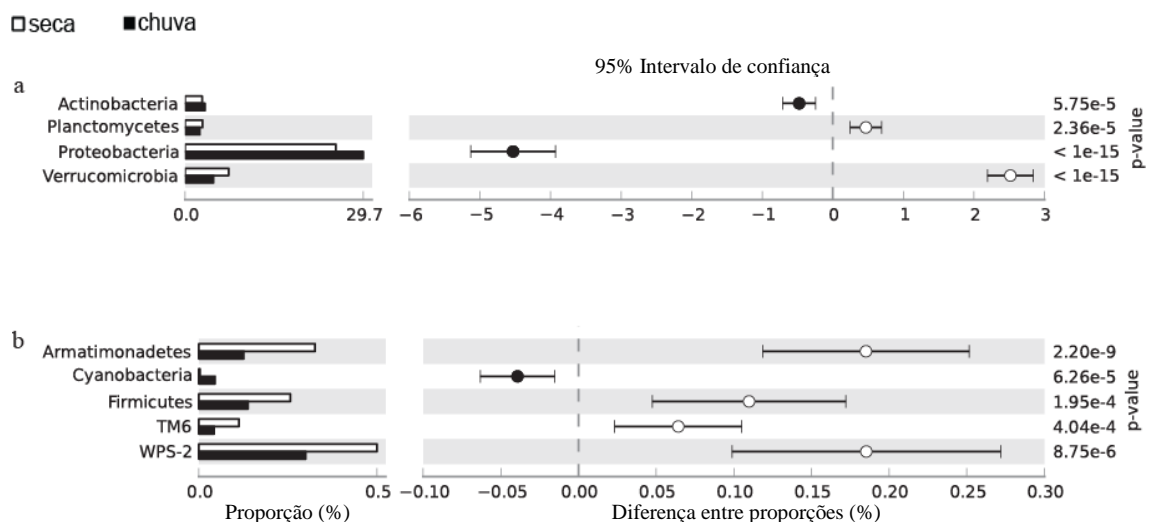


Figura 13: Proporção relativa de abundância referente ao domínio *Bacteria* distribuída em mata de galeria; (a) filotaxões com abundância maior que 10% e (b) filotaxões com abundância menor que 0.5%. O gráfico demonstra primeiramente a proporção média de sequências, a diferença nas proporções médias para cada par de amostras e por último o *p*-value indicando se a proporção média é igual para um determinado par.

Baseado nos resultados das Figuras 10 a 13 foi possível avaliar estatisticamente as diferenças entre comparações múltiplas entre amostras do solo. Com base no critério de sazonalidade de precipitação, foi observado que, independentemente da fitofisionomia analisada, os filos *AD3*, *WPS-2*, *Planctomycetos*, *Verrucomicrobia* e *Chloroflexi* tiveram sempre a suas abundâncias relativas reduzidas durante a estação chuvosa. Ao contrário, os filos *Proteobacteria* e *Cyanobacteria* sempre demonstraram aumento em suas abundâncias relativas em todas as fitofisionomias analisadas.

Análise mais refinada foi realizada com o intuito de visualizar quais são as famílias bacterianas mais afetadas pelas alterações no teor gravimétrico de água nas amostras de solo (Figura 14). O gráfico de dispersão indicou que membros das famílias bacterianas *Sinobacteraceae*, *Acidobacteraceae* e *Hyphomicrobiaceae* foram as famílias que mais foram influenciadas em relação ao teor gravimétrico de água nas amostras de solo para a fitofisionomia cerrado denso (Figura 14 a). Em contra partida, membros pertencentes às famílias bacterianas *Chthonibacteraceae* e *Koribacteraceae* apresentaram maior abundância durante a estação seca nas demais fitofisionomias (Figura 14). Outra informação detectada nesse gráfico foi que a maioria das famílias bacterianas presentes nas amostras de solo das quatro fitofisionomias está presentes em baixas proporções (<5%) e que a fitofisionomia cerrado denso teve a sua comunidade bacteriana, em nível hierárquico de família, mais afetada pelas alterações no teor gravimétrico de água nas amostras de solo ($R^2 = 0.90$) quando comparado com as demais fitofisionomias analisadas.

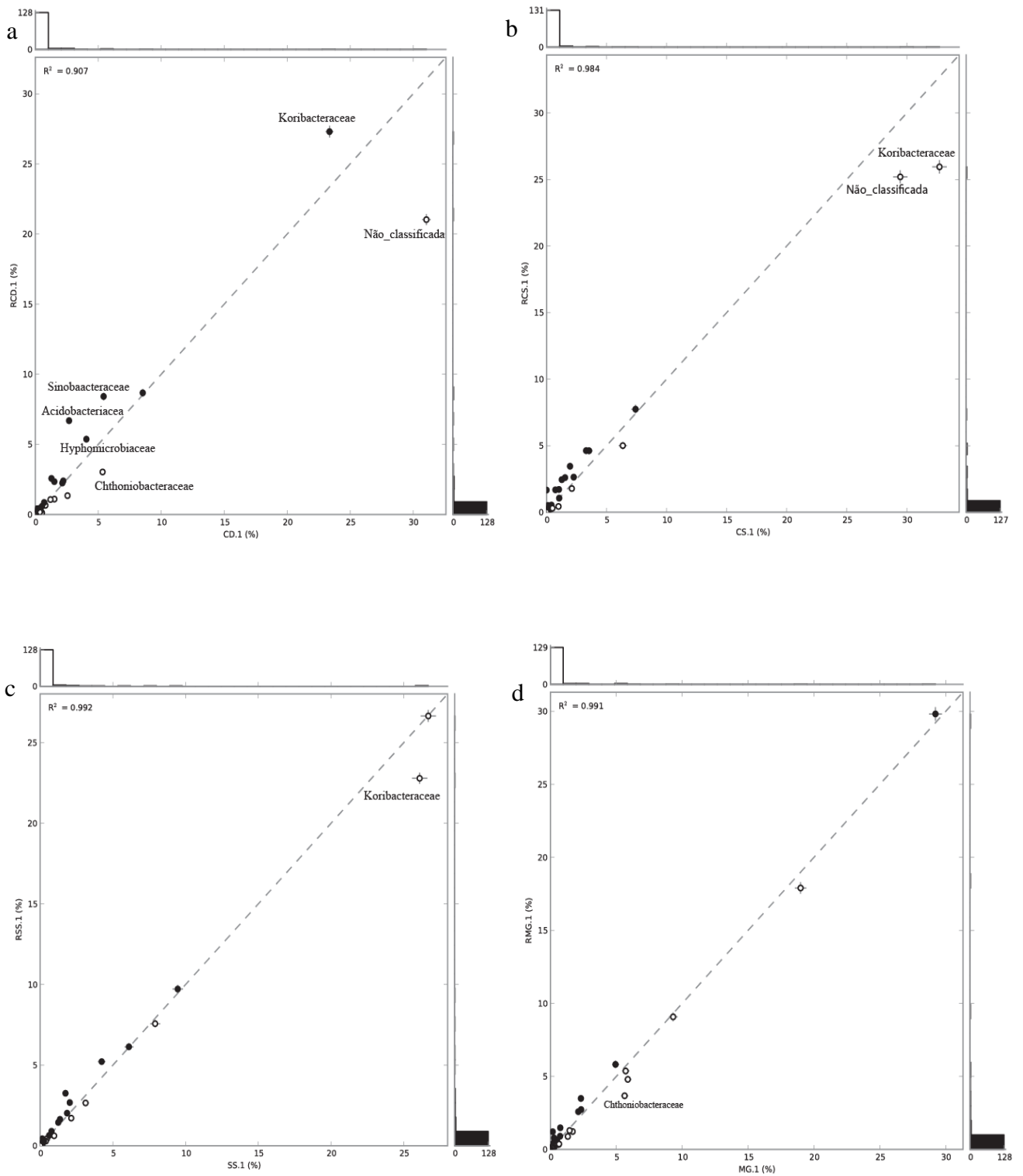


Figura 14. Proporção relativa de famílias bacterianas detectadas em (a): cerrado denso; (b): campo sujo; (c): cerrado sensu stricto e (d): mata de galeria, durante a estação seca (círculos brancos) e chuvosa (círculos pretos). O gráfico em branco a esquerda indica a proporção do número de sequências para a estação seca. O gráfico preto a direita indica a proporção do número de sequências para a estação chuvosa

Posteriormente, para avaliar se a estrutura da comunidade bacteriana foi afetada pelo teor gravimétrico de água nas amostras de solo (umidade do solo), optamos por utilizar β diversidade calculando sete distintos índices de similaridade (Unweighted_UniFrac, Weighted_UniFrac, Bray_Curtis, Canberra, Gower, Morisita-Horn e Soergel) (Tabela 4).

Para todas as distâncias de β -diversidade testadas nesse estudo, foi possível observar valores de R significativos para a conclusão de separação das amostras ao longo das duas distintas estações do ano (Tabela 4), indicando que níveis diferentes de teor gravimétrico de água nas amostras de solo podem alterar a estrutura da composição da comunidade bacteriana. Embora, o resultado para as sete distâncias de β -diversidade terem sido similar (Tabela 4), apenas os resultados para as distâncias Unweighted_UniFrac e Canberra foram demonstradas em gráficos PCoA (Figura 15). As sete medidas de β -diversidade foram analisados pelo teste de Mantel para todos os pares de matrizes de distância utilizando 999 permutações para cada teste (Tabela 5).

O resultado da Tabela 5 corroborou com os resultados exibidos pelo ANOSIM, demonstrando que há uma significativa relação entre teor gravimétrico de água nas amostras de solo com as variações na composição da comunidade bacteriana. A utilização de várias medidas de β -diversidade foi benéfica para fornecer informações adicionais, as quais têm como objetivo confirmar o mesmo resultado sobre como as comunidades bacterianas, presente em amostras de solo do bioma Cerrado, tem sua composição alterada ao longo das variações temporais de teor gravimétrico de água nas amostras de solo (Figura 15 a-b).

Tabela 4: Resultado para o teste ANOSIM para todas as distâncias de β -diversidade com um ponto de corte de 3% para agrupamento de OTUs.

Distâncias de β -diversidade	Bacteria	
	valor R	<i>P</i> value
Weighted UniFrac	0,4224	0,002
Unweighted UniFrac	0,4754	0,001
Bray-Curtis	0,5077	0,002
Canberra	0,6602	0,001
Gower	0,2932	0,004
Morisita-Horn	0,5146	0,001
Soergel	0,5077	0,002

Tabela 5: Resultado para o teste de Mantel realizado par a par para todas as sete distâncias de β -diversidade, incluindo 999 permutações para cada teste.

Matriz 1	Matriz 2	Bacteria	
		Mantel r	<i>P</i> -value
bray_curtis	Canberra	0,847	0,001
bray_curtis	Gower	0,444	0,013
bray_curtis	morisita_horn	0,259	0,042
bray_curtis	Soergel	0,993	0,001
bray_curtis	unweighted_unifrac	0,563	0,001
bray_curtis	weighted_unifrac	0,258	0,043
canberra	Gower	0,351	0,02
canberra	morisita_horn	0,399	0,001
canberra	Soergel	0,855	0,001
canberra	unweighted_unifrac	0,672	0,001
canberra	weighted_unifrac	0,437	0,001
gower	morisita_horn	0,200	0,197
gower	Soergel	0,448	0,006
gower	unweighted_unifrac	0,762	0,001
gower	weighted_unifrac	0,235	0,119
morisita_horn	Soergel	0,308	0,018
morisita_horn	unweighted_unifrac	0,543	0,002
morisita_horn	weighted_unifrac	0,817	0,001
soergel	unweighted_unifrac	0,577	0,001
soergel	weighted_unifrac	0,298	0,012
unweighted_unifrac	weighted_unifrac	0,592	0,001

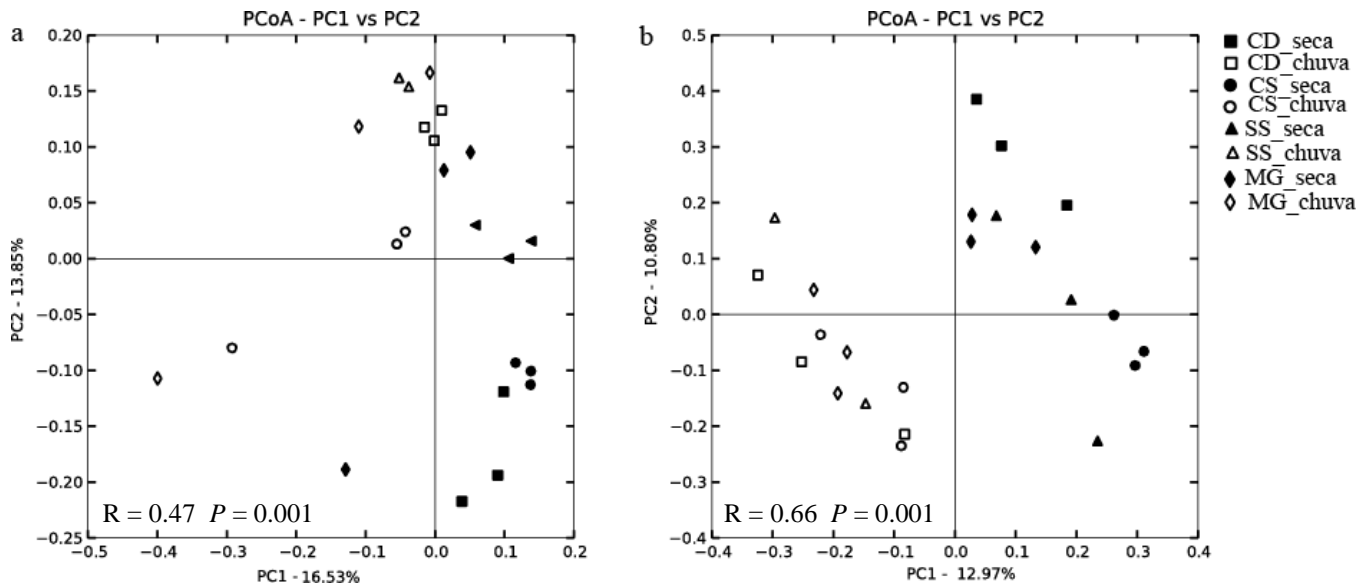


Figura 15: Análise de Coordenadas Principais (PCoA) das sequências do gene do 16S rRNA das amostras de solo das diferentes fitofisionomias do Cerrado ao longo das estações seca e chuvosa. Essa análise foi baseada no agrupamento das matrizes de similaridade Unweighted_UniFrac (a) e Canberra (b) para a comunidade bacteriana respectivamente. Diferentes formas geométricas representam as réplicas biológicas para cada fitofisionomia nas estações seca e chuvosa.

Adicionalmente, de acordo com as análises de coeficientes de correlação de Pearson, existe uma forte influência do teor gravimétrico de água nas amostras de solo com a composição da comunidade bacteriana nas estações seca e chuvosa. Esse resultado ficou evidente a partir dos dados de β -diversidade demonstrado no gráfico de PCoA (Figura 15) o qual corroboraram com o resultado do teste de ANOSIM (Tabela 4) e Mantel (Tabela 5). Ou seja, as distâncias filogenéticas das comunidades bacterianas foram claramente relacionadas com mudanças na abundância relativa para diferentes níveis hierárquicos de classificação taxonômica (Figura 16).

A abundância relativa de *Chloroflexi*, *AD3*, *Solibacteres*, *Acidobacteria*-subgrupo-6 e *Beta-Proteobacteria* diminuíram com o aumento da umidade do solo (Figura 16). Entretanto, *Alpha/Gamma-Proteobacteria*, *Acidobacteriales*, *Planctomycetia*, *Sphingobacteria*, *Pedospaerae* e *Gemmatimodates* tiveram sua abundância positivamente correlacionada com a umidade do solo (Figura 16).

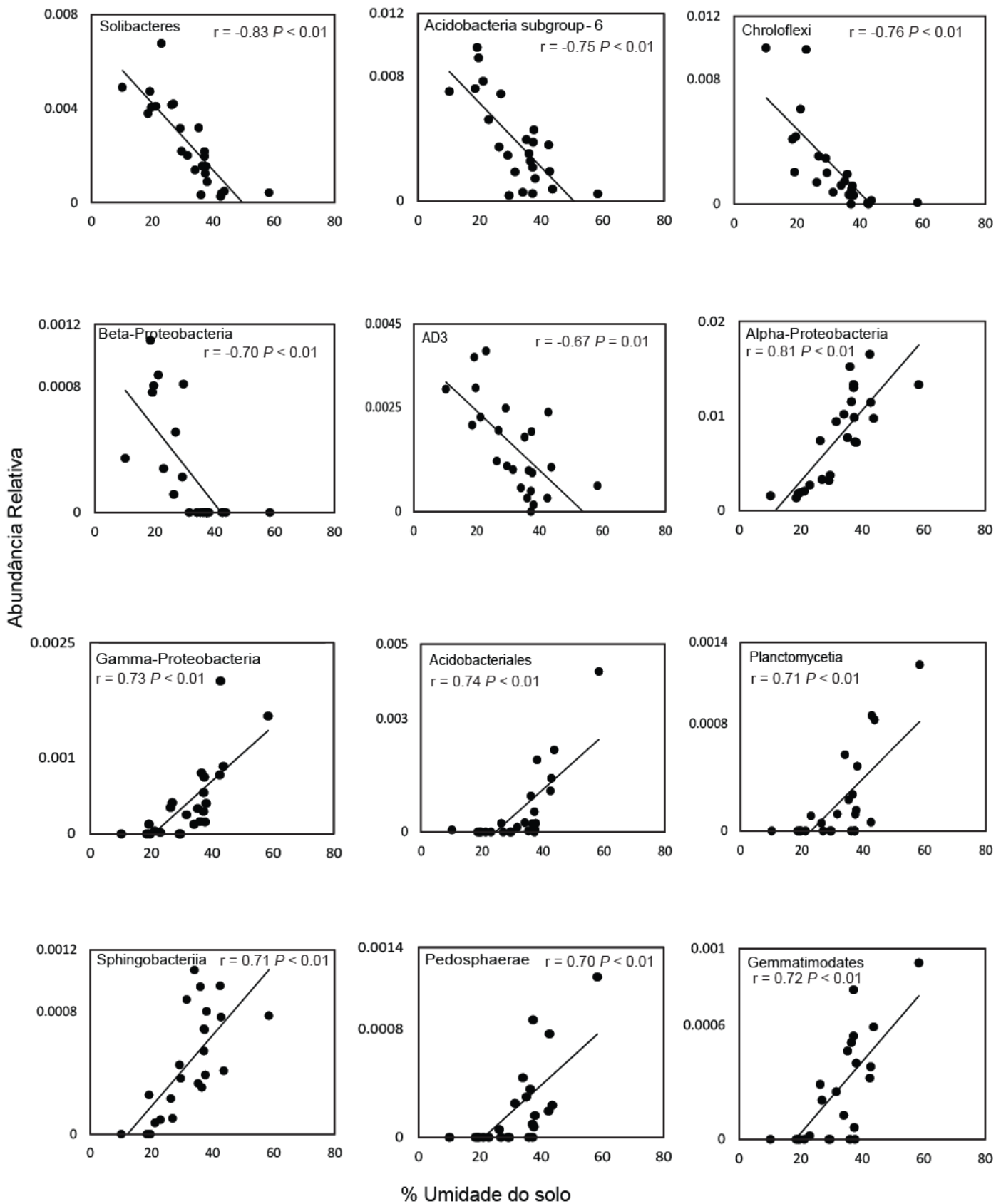


Figura 16: Análises de coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis de abundância relativa de diferentes grupos bacterianos com a porcentagem de umidade do solo do bioma Cerrado.

A análise de rede de interações (*network*) foi realizada para exibir e analisar como os OTUs são compartilhados entre as amostras (MONTROYA *et al.*, 2006). Geralmente esse método é utilizado para enfatizar as semelhanças e diferenças entre grandes e complexos conjuntos de dados.

O visual final dessa análise consiste no agrupamento dos OTUs observados, onde os nós ao redor da figura são os OTUs compartilhados, pois foram compartilhados por mais de uma amostra e /ou estação sazonal, e os nós localizados ao extremo são os OTUs não compartilhados, pois foram visualizados unicamente naquela fitofisionomia e estação respectiva. .

Nesse estudo, maiores detalhes serão fornecidos apenas para a análise do domínio *Bacteria*, pois devido à classificação taxonômica ser mais eficiente para esse domínio. Entretanto análise similar foi realizada para as demais comunidades microbianas (Dados não mostrados), onde é possível observar que há OTUs vistos unicamente em determinada fitofisionomia e estação específica, mas devido à limitação na classificação taxonômica, não foi possível atingir nível hierárquico mais baixo que filo, e conseqüentemente o nosso conhecimento sobre essas interações continuam escassos.

Contudo, o resultado das interações para a comunidade bacteriana do solo presente nas quatro diferentes fitofisionomias e em estações contrastantes consistiu de 685 nós (OTUs) e 2358 *edges* (interações) (Figura 17). Muitos OTUs compartilharam as mesmas preferências do ambiente, indicando quais são as famílias mais comumente detectadas em amostras de solo do bioma Cerrado (Tabela 6). Toda a informação centralizada na análise de interações em rede (Figura 17) foi detalhada em diagrama de Venn, o qual ilustra de maneira visual mais simples, a proporção de OTUs que foram compartilhados ou não compartilhados para cada estação do ano (Figura 18), lembrando-se que apenas foram mensurados os OTUs que atingiram completa classificação taxonômica para nível hierárquico família.

Foi possível observar no diagrama de Venn (Figura 18) que há uma sobreposição de organismos nas duas estações, totalizando 42 OTUs, sugerindo que provavelmente essas famílias bacterianas são mais comumente detectadas, sofrendo pouca influência em relação à umidade do solo. Dentre elas destacam-se:

Acidobacteriaceae, *Myxococcaceae*, *Bacillaceae*, *Nitrospiraceae*, *Paenibacillaceae*, *Solibacteraceae*, *Burkholderiaceae* dentre outras (Tabela 6).

Para os períodos de seca (cor vermelho) foi possível detectar 14 OTUS não compartilhados para essa determinada estação do ano (Figura 17), indicando que tais organismos não foram visualizados durante a estação chuvosa, dentre essas se destacam principalmente as famílias: *Flavobacteriaceae*, *Caulobacteraceae*, *Streptomycetaceae*, *Syntrophobacteraceae*, *Thermobaculaceae*, *Staphylococcaceae*, e dois clones cultivados das classes *Acidimicrobiia* e *Thermoplasmata* (Tabela 6). Por último, o período chuvoso (cor azul) também apresentou conter OTUs não compartilhados durante a estação seca como: *Acetobacteraceae*, *Armatimonadaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Haliangiaceae*, *Nocardiodiaceae*, *Pseudomonadaceae* e *Sphingobacteriaceae* assim como também clones cultivados das ordens *Pedospaerales*, *Acidimicrobiales* e *Gemmatimonadales* (Tabela 6).

Interessantemente, nessa análise foi possível detectar dois membros referentes ao domínio *Archaea*, uma como OTU compartilhado: SAGMA-X (ordem: *Cenarchaeales*) e WCHD3-02 (classe: *Thermoplasmata*) como um OTU não compartilhado para a estação seca (Tabela 6). A classificação taxonômica para OTUs referentes ao domínio *Archaea* muitas vezes são indistinguíveis, devido à incorreta ou ausência de informações filogenéticas depositadas em bancos de dados. Portanto, vale a pena analisar estrutura da comunidade de archaea por meio de interações ecológicas tais como examinar os padrões de co-ocorrência juntamente com a comunidade bacteriana.

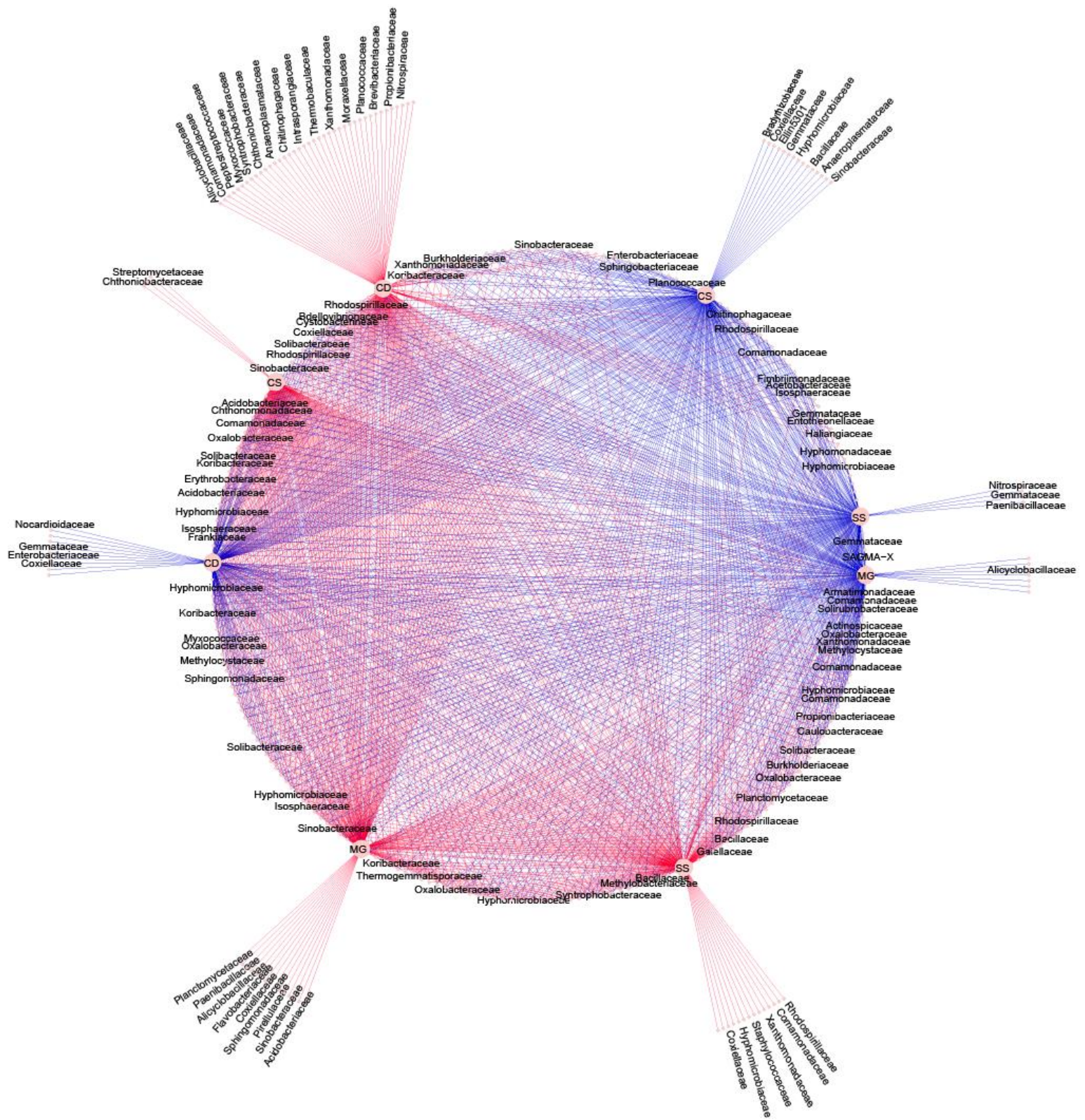


Tabela 6: Relação das famílias bacterianas associados às quatro diferentes fitofisionomias do Cerrado ao longo das estações de seca e chuvosa. Sequências dos genes do 16S rRNA foram agrupadas a 90% de similaridade e classificadas pelo RDP a 80% pelo QIIME.

OTUs exclusivos na seca	OTUs compartilhados (seca/chuva)	OTUs exclusivos na chuva
Brevibacteriaceae	Acidobacteriaceae	Acetobacteraceae
C111(classe: Acidimicrobiia)	Actinospicaceae	Armatimonadaceae
Caulobacteraceae	Alicyclobacillaceae	auto674W (ordem: Pedosphaerales)
Entothionellaceae	Anaeroplasmataceae	Bradyrhizobiaceae
Erythrobacteraceae	Bacillaceae	EB1017 (ordem: Acidimicrobiales)
Flavobacteriaceae	Bdellovibrionaceae	Ellin5301 (ordem: Gemmatimonadales)
Intrasporangiaceae	Burkholderiaceae	Haliangiaceae
Moraxellaceae	Chitinophagaceae	Nocardioideaceae
Peptostreptococcaceae	Chthoniobacteraceae	Pseudomonadaceae
Staphylococcaceae	Chthonomonadaceae	Sphingobacteriaceae
Streptomycetaceae	Comamonadaceae	
Syntrophobacteraceae	Coxiellaceae	
Thermobaculaceae	Cystobacterineae	
WCHD3-02 (classe: Thermoplasmata)	Enterobacteriaceae	
	Fimbriimonadaceae	
	Frankiaceae	
	Gaiellaceae	
	Gemmataceae	
	Hyphomicrobiaceae	
	Hyphomonadaceae	
	Isosphaeraceae	
	Koribacteraceae	
	Methylobacteriaceae	
	Methylocystaceae	
	Myxococcaceae	
	Nitrospiraceae	
	Oxalobacteraceae	
	Paenibacillaceae	
	Pirellulaceae	
	Planctomycetaceae	
	Planococcaceae	
	Propionibacteriaceae	
	RB40 (class: Acidobacteria-6)	
	Rhodospirillaceae	
	SAGMA-X (ordem: Cenarchaeales)	
	Sinobacteraceae	
	Solibacteraceae	
	Solirubrobacteraceae	
	Sphingomonadaceae	
	Thermogemmatissporaceae	
	Xanthobacteraceae	



Figura 18. Diagrama de Venn representando o número de OTUs (90%) para o domínio *Bacteria*. Os valores representam o número de OTUs compartilhados e não compartilhados entre as estações seca (rosa) e chuvosa (verde) referentes às amostras de solo do bioma Cerrado.

6.4. Análise da composição e estrutura da comunidade de archaeas do solo na estação seca e chuvosa

Os resultados baseados nas análises do banco de dados do RDP II (*Ribosomal Database Project*) para os dados das sequências do gene do 16S rRNA referentes ao domínio das *Archaeas*, revelou a predominância do filo *Crenarchaeota* em ambas as estações amostradas (Figura 19).

Em seguida, membros referentes à *Thaumarchaeota*, atualmente considerado por vários autores como o novo filo (NUNOURA *et al.*, 2011), indicou ser o segundo filo mais abundante em todas as amostras de solo das quatro fitofisionomias. Sequências de *Euryarchaeota* também foram presentes nos dados, destacando-se a classe *Thermoplasmata* como a classe mais abundante. Em contraste ao domínio *Bacteria*, para o domínio *Archaea* foram detectadas, em baixa proporção, sequências que não foram classificadas a 80% de limite de confiança (*confidence threshold*) (Figura 19). Para a maioria dos OTUs observados não foi possível obter classificação taxonômica inferior à classe, mesmo possuindo sequências de boa qualidade e com fragmentos superiores a 400 pares de bases. Essa limitação pode ser atribuída à falta de assinaturas genômicas para níveis taxonômicos mais específicos depositadas em bancos de dados, ou provavelmente devido ao par de oligonucleotídeos utilizados nesse atual estudo para amplificar o domínio *Archaea*. Entretanto, para alguns OTUs observados, o nível taxonômico mais específico elucidado para a comunidade de archaea foi para o gênero, revelando-se *Candidatus Nitrososphaera* e *Methanobacterium* como os mais abundantes.

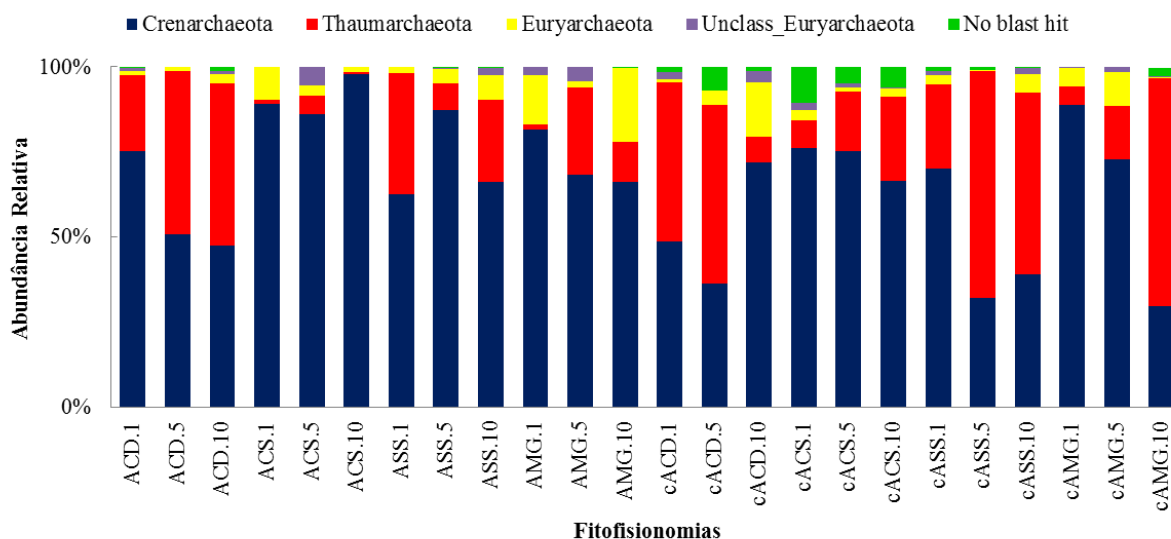


Figura 19: Abundância relativa dos filios de Archaeas associados às quatro diferentes fitofisionomias do Cerrado nas estações seca e chuvosa. Sequências dos genes do 16S rRNA foram classificadas pelo RDP a 80% pelo QIIME. As doze primeiras amostras da esquerda para a direita são referentes à estação seca e posteriormente seguem as doze amostras durante a estação chuvosa.

Diferenças significativas na abundância relativa de sequências para a comunidade de archaeas foram detectadas entre a estação seca para a chuvosa, em todas as amostras de solo nas quatro fitofisionomias analisadas no bioma Cerrado. (Figura 20).

Para a fitofisionomia cerrado denso, membros referentes aos principais filios de archaeas tiveram sua abundância relativa influenciadas pela teor gravimétrico de água nas amostras de solo (Figura 20a). Indicando que membros do filo *Crenarchaeota* tiveram um declínio em sua abundância relativa durante a estação chuvosa, perfil contrastante foi observado para os membros do filo *Euryarchaeota*.

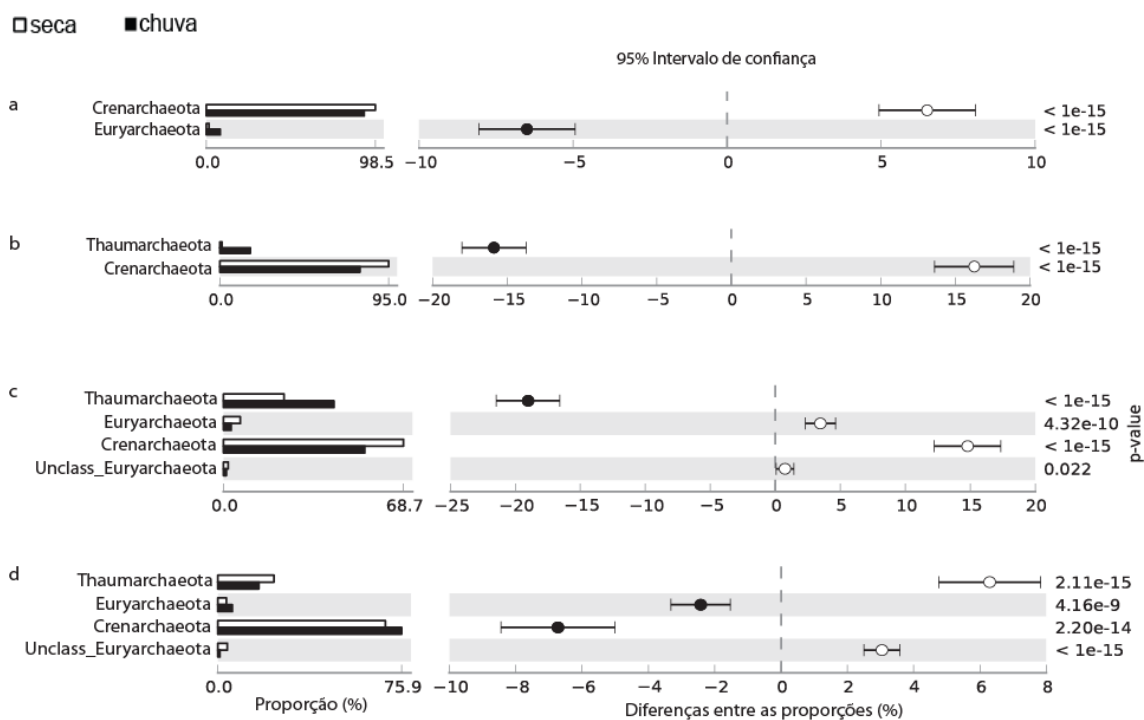


Figura 20: Proporção relativa de abundância referente ao domínio archaea distribuída em (a) cerrado denso; (b) campo sujo; (c) cerrado *sensu stricto* e (d) mata de galeria. O gráfico demonstra primeiramente a proporção média de sequências dentro de cada fitofisionomia, a diferença nas proporções médias para cada par de amostras e por ultimo o *p*-value indicando se a proporção média é igual para um determinado par.

O número de representantes do filo *Crenarchaeota* foi maior durante a estação de seca para as fitofisionomias campo sujo e cerrado *sensu stricto* (Figura 20 b-c), entretanto para a fitofisionomia mata de galeria a abundância relativa desse filo apresentou aumento significativo durante a estação chuvosa (Figura 20 d).

Demais membros que tiveram variações em sua abundância relativa, na fitofisionomia de mata de galeria, incluem *Thaumarchaeota* e sequências assinadas como não classificadas para o filo *Euryarchaeota* as quais foram enriquecidas durante a estação seca, assim como membros do filo *Crenarchaeota* tiveram maior representatividade durante a estação chuvosa (Figura 20 d).

Além das diferenças significativas entre as frequências relativas da comunidade de archaea entre a mesma fitofisionomia na estação seca e chuvosa, compararam-se também as diferenças significativas entre área com área, enfatizando as diferenças par a par entre as formações savânicas e campestre com a formação florestal em ambas as estações do ano (Figura 21). Semelhante comparação já havia sido realizada para as fitofisionomias cerrado denso e mata de galeria durante apenas a estação seca (CATAO *et al.*, 2013); Entretanto, essa é a primeira comparação realizada com as quatro fitofisionomia em ambas as estações do ano simultaneamente com maior cobertura de dados de pirosequenciamento do gene do 16S rRNA.

A comparação das três fitofisionomia (cerrado denso, campo sujo e cerrado *sensu stricto*) demonstrou que campo sujo apresentou ter maiores proporções para os membros de *Thermoprotei* independentemente da estação avaliada, quando comparado com as demais fitofisionomias (Figura 21 a). A análise de comparação ente cerrado denso com cerrado *sensu stricto* durante a estação seca, houve maior proporção de *Thermoplasmata* e sequências afiliadas como não classificadas do filo *Euryarchaeota* na fitofisionomia cerrado *sensu stricto* (Figura 21 a). Perfil contrastante foi visualizado durante a estação chuvosa, o qual houve maior proporção de sequências de *Thermoplasmata* e sequências afiliadas como não classificadas do filo *Euryarchaeota*, na fitofisionomia cerrado denso. Interessantemente, membros pertencentes à *Methanomicrobia* e *Methanobacteria* foram visualizados apenas na fitofisionomia cerrado denso durante a estação chuvosa.

Quando as fitofisionomias savânicas e campestre foram comparadas individualmente com a fitofisionomia mata de galeria, foi possível observar que na área florestal há maior proporção de sequências afiliadas como não classificadas do filo *Euryarchaeota* durante a estação seca. Entretanto perfil contrário foi visualizado durante a estação chuvosa (Figura 21 b).

Por meio do dendograma foi possível observar que à disponibilidade de água foi determinante para agrupar as fitofisionomias cerrado *sensu stricto* e campo sujo durante a estação seca e chuvosa próxima e separando as comunidades archaeas de cerrado denso e mata de galeria (Figura 21 c).

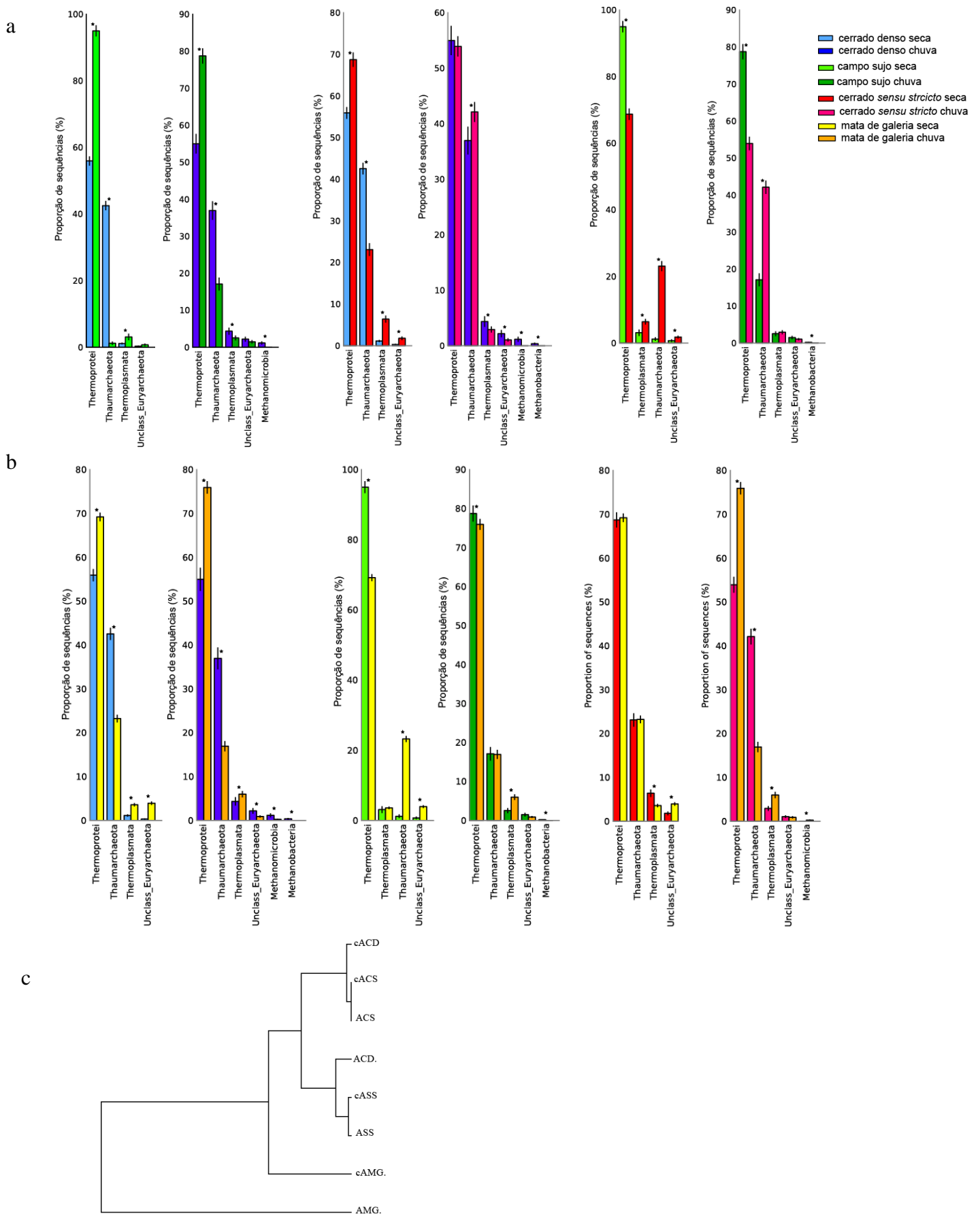


Figura 21. Comparação entre as proporções relativa de abundância de grupos taxonômicos de archaeas durante a estação seca e chuvosa (a) entre as fitofisionomias savânicas e campestre (b) entre as fitofisionomias savânicas e campestre com a fitofisionomia florestal. A presença de um asterisco indica significativa diferença ($P < 0,01$) por meio do *software* STAMP utilizando o Teste exato de Fisher entre as duas fitofisionomias. (c): Dendrograma da análise de agrupamento com base na distância euclidiana para a comunidade de archaeas. Legenda das fitofisionomias: ACD (cerrado denso na seca); ACS (campo sujo na seca); ASS (cerrado *sensu stricto* na seca); AMG (mata de galeria na seca); cACD (cerrado denso na chuva); cACS (campo sujo na chuva); cASS (cerrado *sensu stricto* na chuva); cAMG (mata de galeria na chuva).

A Análise de Coordenadas Principal (PCA), baseados nos dados para a comunidade de archaeas, utilizando sete diferentes medidas de β -diversidade (Tabela 7), sugeriu que a composição da comunidade de archaeas em amostras de solo durante a estação seca e durante a estação chuvosa difere entre si (Figura 22).

Para todas as distâncias de β -diversidade testadas nesse estudo para a comunidade e de archaea, as distâncias de Gower foi à única que apresentou valores de R não significativos (Tabela 7). Entretanto, para as demais distâncias de β -diversidade, foi possível observar valores de R significativos para a conclusão de separação das amostras ao longo das duas distintas estações do ano (Tabela 7). Indicando que níveis diferentes de teor gravimétrico de água nas amostras de solo podem alterar a estrutura da composição da comunidade de archaeas.

Semelhante para os resultados apresentados para a comunidade bacteriana, apenas os resultados para as distâncias Unweighted_UniFrac e Canberra foram demonstradas em gráficos PCoA (Figura 22). As sete medidas de β -diversidade foram analisados pelo teste de Mantel para todos os pares de matrizes de distância utilizando 999 permutações para cada teste (Tabela 8).

O teste de similaridade ANOSIM (Tabela 7) confirmou que a estrutura da comunidade de archaeas apresentou uma variação sazonal de precipitação, corroborando com os resultados do teste de Mantel (Tabela 8). Indicando que há uma significativa relação entre teor gravimétrico de água nas amostras de solo com as variações na composição da comunidade de archaeas.

Tabela 7: Resultado para o teste ANOSIM para todas as distâncias de β -diversidade com um ponto de corte de 3 % para agrupamento de OTUs.

Distâncias de β -diversidade	Archaea	
	Valor R	<i>P</i> value
Weighted UniFrac	0,2873	0,003
Unweighted UniFrac	0,4904	0,001
Bray-Curtis	0,2384	0,01
Canberra	0,4808	0,001
Gower	0,0254	0,224
Morisita-Horn	0,4289	0,001
Soergel	0,2384	0,016

Tabela 8: Resultado para o teste de Mantel realizado par a par para todas as sete distâncias de β -diversidade, incluindo 999 permutações para cada teste.

Matriz 1	Matriz 2	Archaea	
		Mantel r	<i>P</i> -value
bray_curtis	Canberra	0,721	0,001
bray_curtis	Gower	0,277	0,040
bray_curtis	morisita_horn	0,498	0,001
bray_curtis	Soergel	0,994	0,001
bray_curtis	unweighted_unifrac	0,198	0,029
bray_curtis	weighted_unifrac	0,408	0,003
canberra	Gower	0,429	0,002
canberra	morisita_horn	0,360	0,001
canberra	Soergel	0,713	0,001
canberra	unweighted_unifrac	0,448	0,001
canberra	weighted_unifrac	0,225	0,041
gower	morisita_horn	-0,104	0,472
gower	Soergel	0,255	0,056
gower	unweighted_unifrac	0,139	0,304
gower	weighted_unifrac	-0,139	0,359
morisita_horn	Soergel	0,507	0,001
morisita_horn	unweighted_unifrac	0,357	0,001
morisita_horn	weighted_unifrac	0,656	0,001
soergel	unweighted_unifrac	0,200	0,033
soergel	weighted_unifrac	0,406	0,001
unweighted_unifrac	weighted_unifrac	0,107	0,345

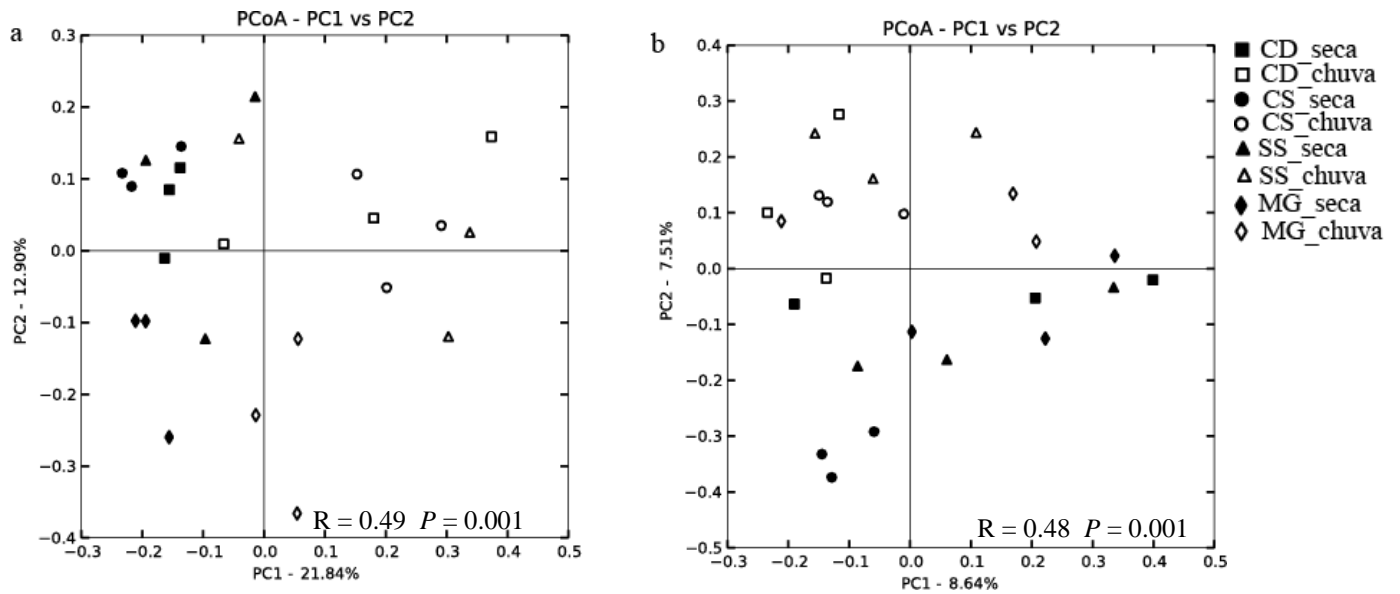


Figura 22: Análise de Coordenadas Principais (PCoA) das sequências do gene do 16S rRNA das amostras de solo das diferentes fitofisionomias do Cerrado ao longo das estações seca e chuvosa. Essa análise foi baseada no agrupamento das matrizes de similaridade Unweighted_UniFrac (a) e Canberra (b) para a comunidade de archaeas respectivamente. Diferentes formas geométricas representam as réplicas biológicas para cada fitofisionomia nas estações seca e chuvosa.

Com base nos resultados das análises de coeficientes de correlação de Pearson, a comunidade de archaeas demonstrou uma forte influência para o teor gravimétrico de água nas amostras de solo na estação seca e chuvosa (Figura 23). Esse resultado corroborou como dados de β -diversidade demonstrado no gráfico de PCoA (Figura 22), assim como evidente no resultado do teste de ANOSIM (Tabela 7) e Mantel (Tabela 8).

Similarmente a comunidade bacteriana, a composição das comunidades de archaea também foi relacionada com as variações temporais de umidade de solo, embora essa relação tenha sido para poucos grupos taxonômicos. Por exemplo, a abundância relativa de *Thaumarchaeota* demonstrou está positivamente relacionada com a umidade de solo (Figura 23). Entretanto, a classe de archaea, *Thermoplasmata*, não teve sua abundância relativa afetada em relação à umidade do solo ($r = 0.42$; $P > 0.10$) (Figura 23).

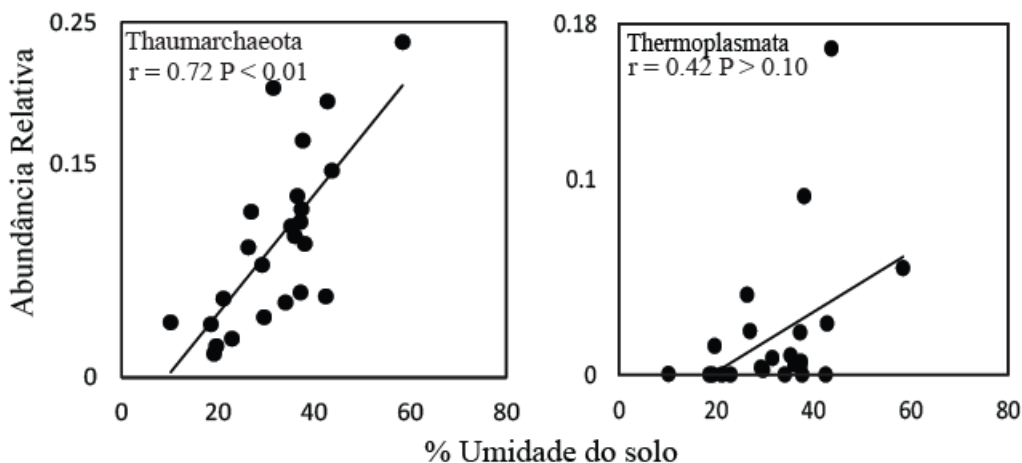


Figura 23: Análises de coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis de abundância relativa de diferentes grupos de archaeas com a porcentagem de umidade do solo do bioma Cerrado.

6.5. Análise da composição e estrutura da comunidade de fungos do solo na estação seca e chuvosa

Para a classificação das sequências de boa qualidade obtidas por meio do pirosequenciamento do gene do 18S rRNA, foi utilizado o banco de dados refinado do Silva (*Comprehensive ribosomal RNA database*). Uma desvantagem clara da utilização do método de classificação baseado em banco de dados acurado é a perda enorme da quantidade de sequências para as análises finais. Embora nossas análises tenham sido prejudicadas pelo número limitado de sequências, amplas inferências gerais sobre as mais prováveis afinidades na comunidade fúngica presente nos solos dessas quatro fitofisionomias diferentes foram possíveis de ser inferidas.

Para todas as amostras de solo das fitofisionomias analisadas, o filo mais abundante foi o *Ascomycota* (43 %), seguido pelo filo *Basidiomycota* (38 %). Menor atribuição de sequências foi atribuída para o filo *Glomeromycetes* (4,4 %) (Figura 24). Igualmente ao domínio das *Archaeas*, houve uma alta proporção de sequências (7,9 %) que não foram classificadas a 80 % de limite de confiança (*confidence threshold*) (Figura 24).

Sequências referentes ao grupo taxonômico *Alveolata* (1,8 %) e *Viridiplantae* (4,9 %) também foram detectadas pelo sequenciamento do gene 18S do rRNA (Figura 24) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores EF4F-Fung5R.

Dentre os *Ascomycota* detectados, *Saccharomyceta* destacou-se como o gênero mais abundante. Para os membros atribuídos no filo *Basidiomycota*, a classe mais abundante foi *Agaricomycetes*.

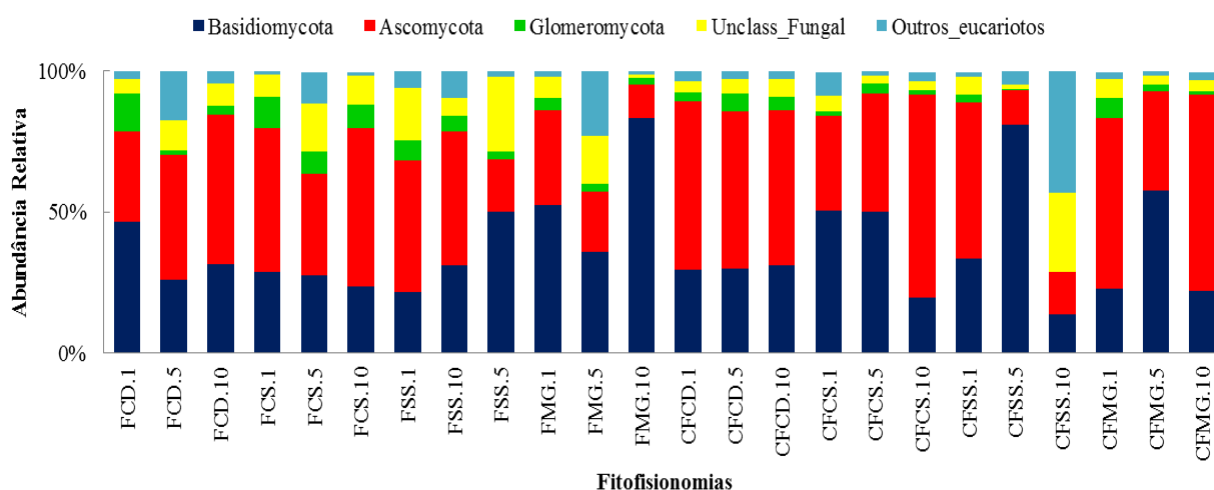


Figura 24: Abundância relativa dos filos de Eucariotos associados às quatro diferentes fitofisionomias do Cerrado nas estações seca e chuvosa. Sequências dos genes do 18S rRNA foram classificadas pelo RDP a 80% pelo QIIME. As doze primeiras amostras da esquerda para a direita são referentes à estação seca e posteriormente seguem as doze amostras durante a estação chuvosa.

Para a comunidade de fungos, assim como para a comunidade de bactéria e archaeas, foi possível detectar diferenças significativas referentes à abundância relativa de sequências quando considerando (α 0.05) (p -value < 0,01) para os teores teor gravimétrico de água nas amostras de solo (Figura 25).

Nesse contexto, o filo *Ascomycota* e as sequências as quais não obtiveram similaridade com o banco de dados para a comunidade fúngica tiveram um aumento significativo em sua abundância relativa durante a estação seca para as fitofisionomias cerrado denso, campo sujo e mata de galeria (Figura 25 a-b-d). Perfil diferente foi observado na fitofisionomia cerrado *sensu stricto* (Figura 25 c).

Para o filo *Basidiomycota* houve declínio em sua abundância relativa, com relevância estatística, durante a estação chuvosa para cerrado denso e mata de galeria. Por fim, a estação seca demonstrou ser enriquecida com sequências pertencentes ao filo *Glomeromycota* nas fitofisionomias cerrado denso, campo sujo e cerrado *sensu stricto* em comparação a estação chuvosa (Figura 25 a-b-c).

Um ponto interessante que merece atenção, é que se observaram variações na abundância relativa de OTUs não classificados (Figura 24-25) em todas as amostras de solo das quatro fitofisionomias. Este dado indica a ausência de sequências similares (80%) depositadas no banco de dados ou o fato desses organismos nunca terem previamente sido isolados.

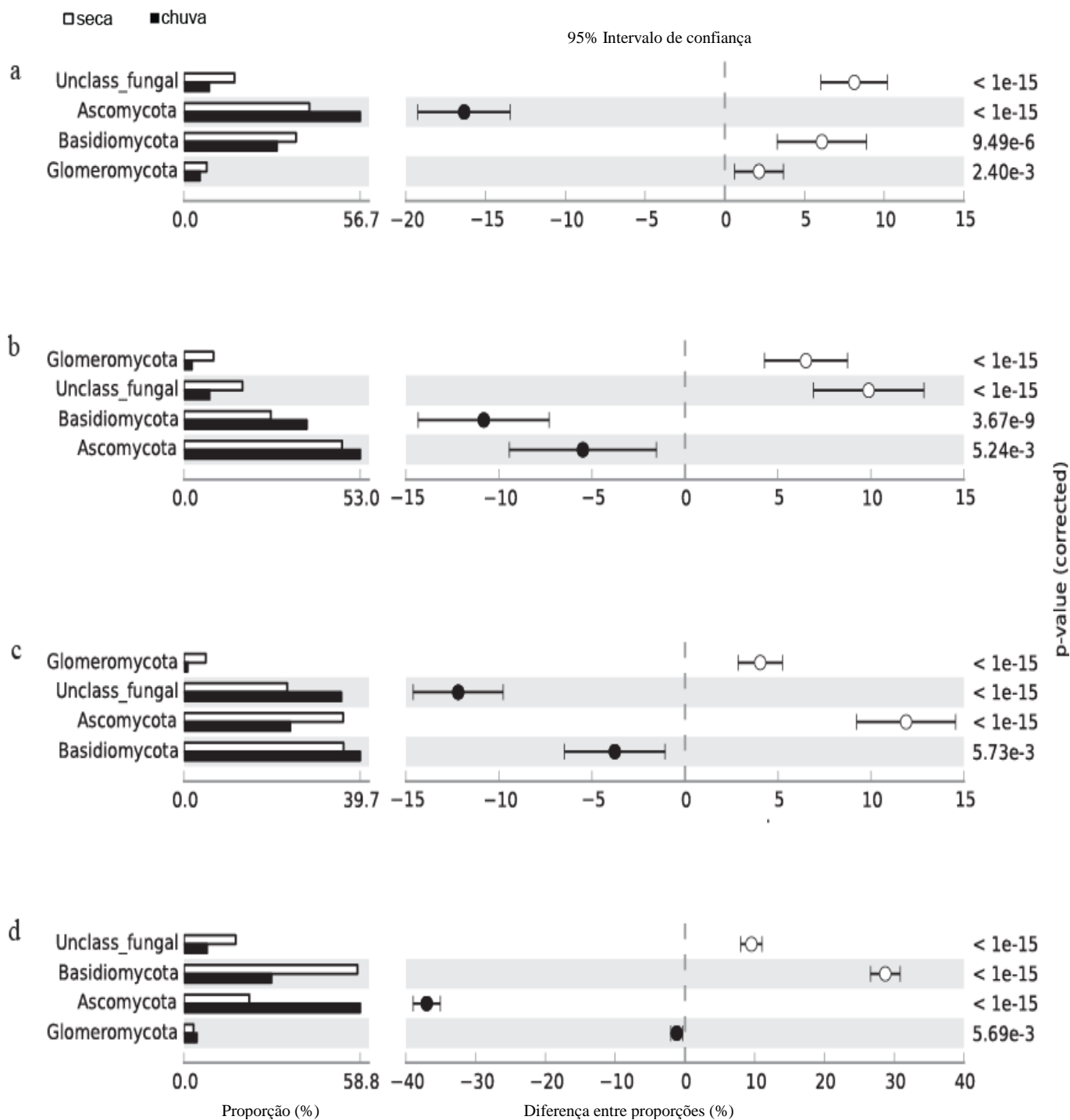


Figura 25: Proporção relativa de abundância referente a comunidade de fungos distribuída em (a) cerrado denso; (b) campo sujo; (c) cerrado *sensu stricto* e (d) mata de galeria. O gráfico demonstra primeiramente a proporção média de seqüências dentro de cada fitofisionomia, a diferença nas proporções médias para cada par de amostras e por ultimo o *p*-value indicando se a proporção média é igual para um determinado par.

Tal como realizado para a comunidade de archaeas, foram avaliadas as diferenças significativas entre duas áreas, enfatizando as diferenças par a par entre as formações savânicas, campestre com a formação florestal em ambas as estações do ano para a comunidade de fungos (Figura 26). Semelhante comparação, utilizando técnicas independentes de cultivo, já havia sido realizada para área nativa (cerrado *sensu stricto* e em mata de galeria) assim como em áreas de Cerrado convertidas em pastagem e em plantação de soja (CASTRO *et al.*, 2008; BRESOLIN *et al.*, 2010); Entretanto, até o momento, essa é a primeira comparação realizada com as quatro fitofisionomias em ambas as estações do ano simultaneamente utilizando maior cobertura de dados de pirosequenciamento do gene do 18S rRNA.

Primeiramente, a análise par a par entre as fitofisionomias (cerrado denso, campo sujo e cerrado *sensu stricto*) demonstrou que a fitofisionomia cerrado *sensu stricto* compreende os maiores valores de proporção de sequência para os membros classificados como Unclass_fungal, independentemente da estação amostrada (Figura 26 a). Quando comparamos a fitofisionomia cerrado denso com campo sujo houve maior proporção do filo *Ascomycota* na fitofisionomia campo sujo durante a estação seca; Entretanto, perfil contrastante foi visualizado durante a estação chuvosa, o qual a maior proporção do filo *Ascomycota* foi detectada em cerrado denso (Figura 26 a).

A abundância relativa do filo *Glomeromycota* também apresentou variações entre as fitofisionomias, o qual cerrado *sensu stricto* apresentou os menores valores em relação a esse filo em particular para ambas as estações amostradas (Figura 26 a).

Em particular, quando as fitofisionomias savânicas e campestre são comparadas individualmente com a fitofisionomia de formação florestal: mata de galeria, é possível observar que a fitofisionomia mata de galeria se destaca com maior proporção de sequências referentes ao filo *Ascomycota* durante a estação chuvosa em todas as comparações possíveis com as demais fitofisionomias (Figura 26 b). Valores com relevância estatística também foram observados para o filo *Basidiomycota* na fitofisionomia florestal durante a estação seca, quando comparada com as demais fitofisionomias (Figura 26 b).

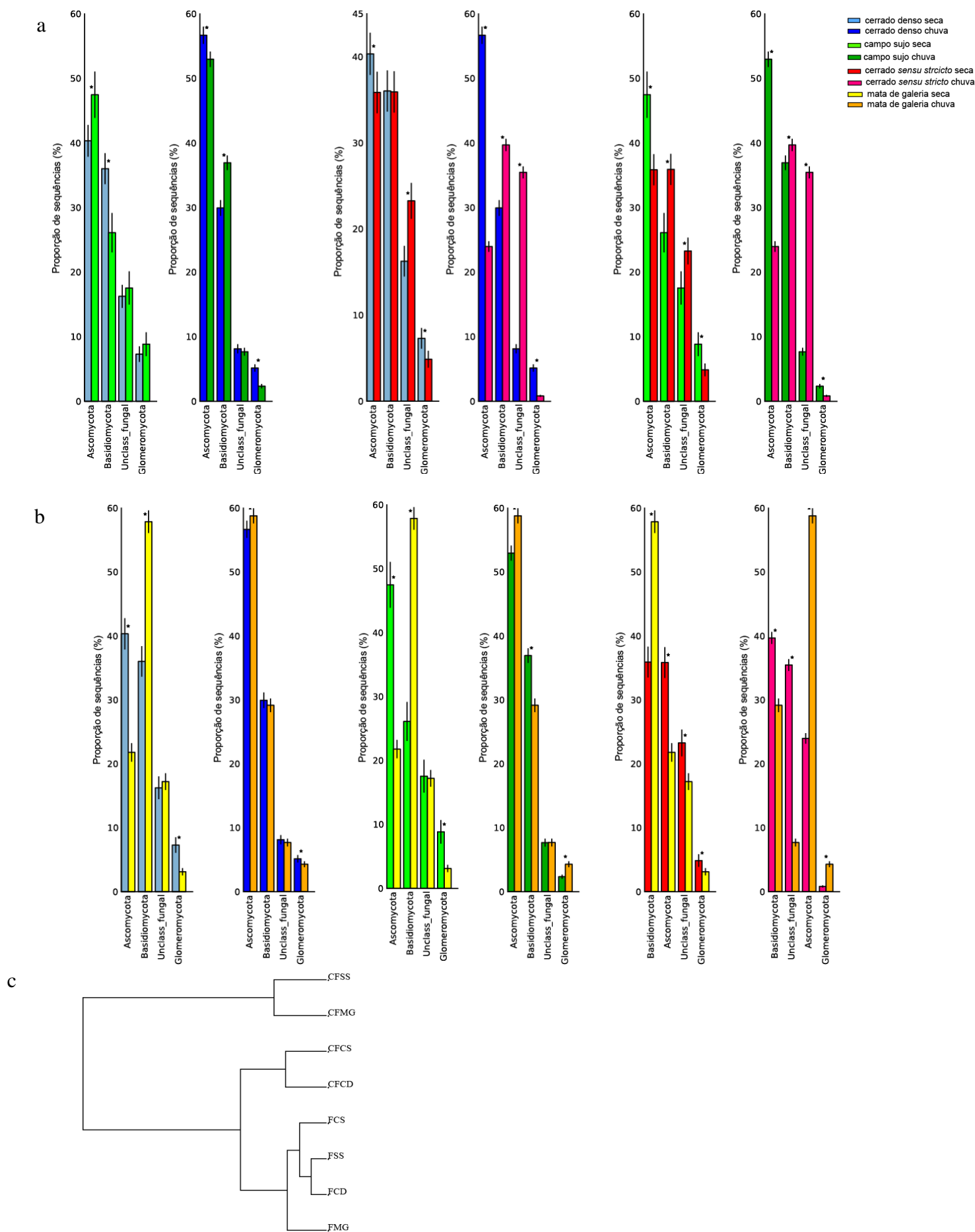


Figura 26. Comparação entre as proporções relativa de abundância de filões de fungos durante a estação seca e chuvosa (a) entre as fitofisionomias savânicas e campestre (b) entre as fitofisionomias savânicas e campestre com fitofisionomia florestal. A presença de um asterisco indica significativa diferença ($P < 0,01$) por meio do *software* STAMP utilizando o Teste exato de Fisher entre as duas fitofisionomias. (c) Dendrograma da análise de agrupamento com base na distância euclidiana para a comunidade de archaeas. Legenda: FCD (cerrado denso na seca); FCS (campo sujo na seca); FSS (cerrado *sensu stricto* na seca); FMG (mata de galeria na seca); cFCD (cerrado denso na chuva); cFCS (campo sujo na chuva); cFSS (cerrado *sensu stricto* na chuva); cFMG (mata de galeria na chuva).

Em relação à comunidade fúngica, o resultado do dendograma demonstrou claramente que a disponibilidade de água nas amostras de solo foi o fator determinante para o agrupamento das fitofisionomias analisadas. As amostras de solo coletadas durante a seca agruparam-se todas em um clado diferente das amostras de solo coletadas durante a estação chuvosa (Figura 26 c).

Para avaliar se as diferenças observadas na composição da comunidade de fungos representam diferenças estatisticamente significantes foi utilizado sete distintos índices de similaridade (Tabela 9). Dessa maneira, foi possível determinar se as comunidades de fungos presentes nas amostras de solo coletadas durante a estação seca são significativamente diferentes em sua composição da comunidade de fungos presentes nas amostras de solo coletadas durante a estação chuvosa.

A partir da análise realizada para todas as distâncias de β -diversidade, foi possível observar valores de R significativos para a conclusão de separação das amostras ao longo das duas distintas estações do ano (Tabela 9), indicando que níveis diferentes de teor gravimétrico de água nas amostras de solo podem alterar a estrutura da composição da comunidade de fungos. Apesar dos valores terem variado bastante dentre as sete distâncias de β -diversidade, a distância de Morisita-Horn foi a única que, quando aplicado para a comunidade fúngica, apresentou valores de R não significativos (Tabela 9).

Assim como realizado para a comunidade de bactérias e archaeas, apenas os resultados para as distâncias Unweighted_UniFrac e Canberra foram demonstradas em gráficos PCoA para a comunidade de fungos (Figura 27). As sete medidas de β -diversidade foram analisadas pelo teste de Mantel para todos os pares de matrizes de distância utilizando 999 permutações para cada teste (Tabela 10).

O resultado da Tabela 10 corroborou com os resultados exibidos pelo ANOSIM, demonstrando que há uma significativa relação entre teor gravimétrico de água nas amostras de solo com as variações na composição da comunidade de fungos.

Tabela 9: Resultado para o teste ANOSIM para todas as distâncias de β -diversidade com um ponto de corte de 3% para agrupamento de OTUs.

Distâncias de β -diversidade	Fungal	
	Valor R	<i>P</i> value
Weighted UniFrac	0,3018	0,006
Unweighted UniFrac	0,5922	0,001
Bray-Curtis	0,5664	0,001
Canberra	0,5383	0,001
Gower	0,1749	0,001
Morisita-Horn	0,1772	0,008
Soergel	0,5664	0,001

Tabela 10: Resultado para o teste de Mantel realizado par a par para todas as sete distâncias de β -diversidade, incluindo 999 permutações para cada teste.

Matriz 1	Matriz 2	Fungo	
		Mantel r	<i>P</i> -value
bray_curtis	Canberra	0,752	0,001
bray_curtis	Gower	0,184	0,115
bray_curtis	morisita_horn	0,639	0,001
bray_curtis	Soergel	0,992	0,001
bray_curtis	unweighted_unifrac	0,580	0,001
bray_curtis	weighted_unifrac	0,621	0,001
canberra	Gower	-0,119	0,396
canberra	morisita_horn	0,272	0,011
canberra	Soergel	0,751	0,001
canberra	unweighted_unifrac	0,495	0,001
canberra	weighted_unifrac	0,460	0,001
gower	morisita_horn	0,113	0,529
gower	Soergel	0,174	0,117
gower	unweighted_unifrac	0,570	0,001
gower	weighted_unifrac	0,005	0,978
morisita_horn	Soergel	0,651	0,001
morisita_horn	unweighted_unifrac	0,298	0,002
morisita_horn	weighted_unifrac	0,712	0,001
soergel	unweighted_unifrac	0,557	0,001
soergel	weighted_unifrac	0,614	0,001
unweighted_unifrac	weighted_unifrac	0,320	0,001

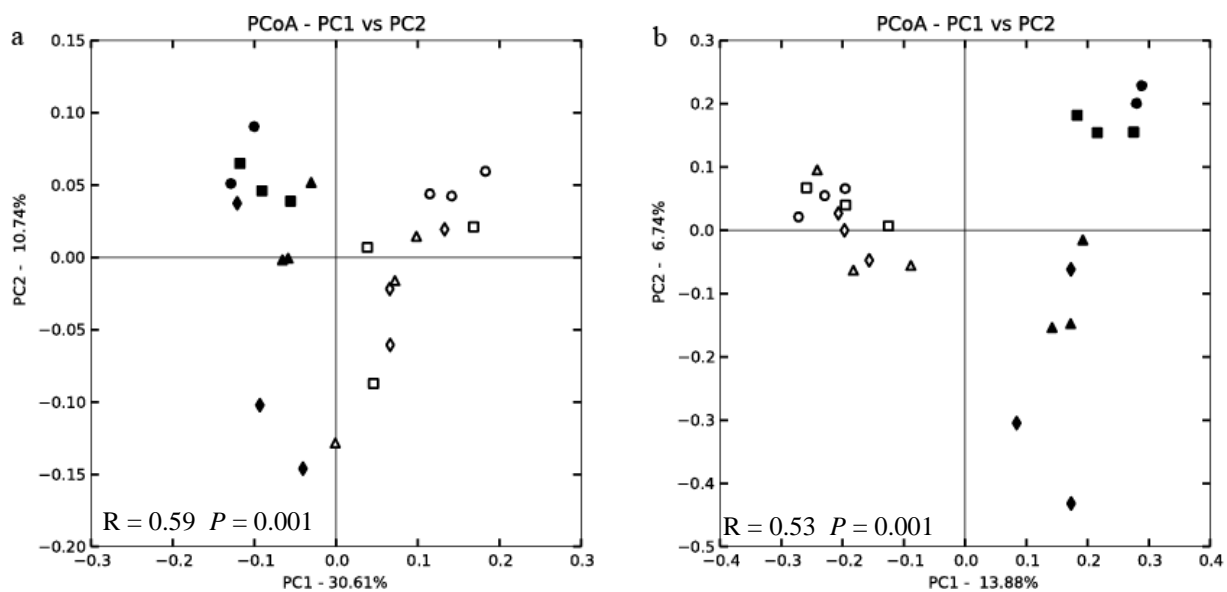


Figura 27: Análise de Coordenadas Principais (PCoA) das sequências dos genes do 18S rRNA das amostras de solo das diferentes fitofisionomias do Cerrado ao longo das estações seca e chuvosa. Essa análise foi baseada no agrupamento das matrizes de similaridade Unweighted_UniFrac (a) e Canberra (b) para a comunidade de fungos respectivamente. Diferentes formas geométricas representam as réplicas biológicas para cada fitofisionomia nas estações seca e chuvosa.

Os resultados demonstrados no gráfico de PCoA (Figura 27) juntamente com o resultado de similaridade ANOSIM (Tabela 9) e o teste de Mantel (Tabela 10) nos indicou que há uma forte influência do teor gravimétrico de água nas amostras de solo com a composição da comunidade de fungos nas estações seca e chuvosa do bioma Cerrado. Adicionalmente, a análise de coeficientes de correlação de Pearson, veio a contribuir com o conhecimento sobre a relação entre a abundância relativa da comunidade dos fungos com a porcentagem de umidade nas amostras de solo.

Nesse contexto, para a comunidade fúngica foi detectado influência apenas para *Saccharomyceta* e *Agaricomycotina*, onde ambos tiveram correlação negativa com a variação da umidade do solo no bioma Cerrado (Figura 28). Esses resultados indicam que, as variações temporais de umidade do solo podem ser consideradas como um dos preditores de variabilidade dentro da diversidade microbiana presente em amostras de solo do bioma Cerrado.

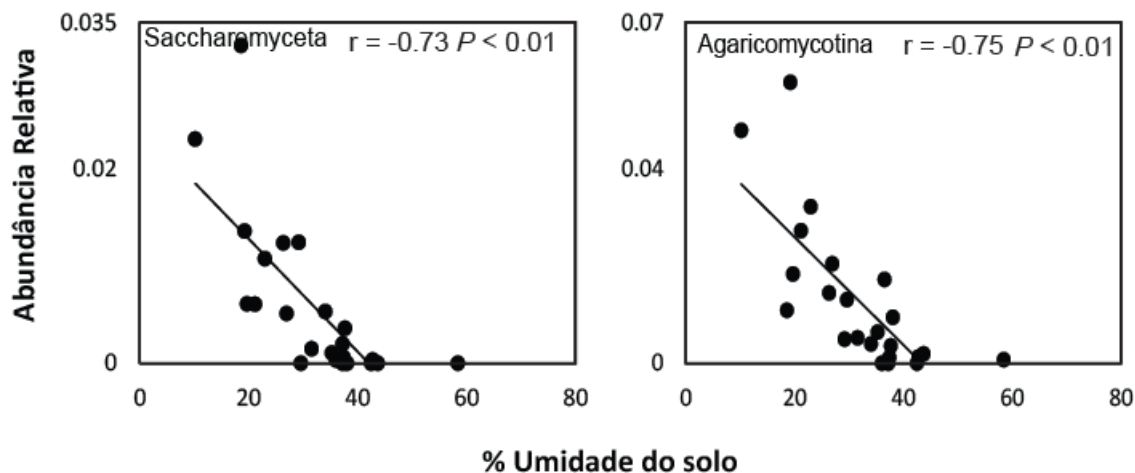


Figura 28: Análises de coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis de abundância relativa de diferentes grupos de archaeas com a porcentagem de umidade do solo do bioma Cerrado.

7.0. Caracterização do potencial funcional para as comunidades microbianas

Ao total, a comunidade microbiana presente em amostras de solo nas quatro fitofisionomias do cerrado (cerrado denso, campo sujo, cerrado *sensu stricto* e mata de galeria) foram analisados quanto ao conteúdo total de DNA (*shotgun*), durante duas estações contrastante (seca e chuvosa), totalizando a construção e análise de 8 metagenomas. Sendo que cada metagenoma foi formado por três réplicas biológicas (n= 24 amostras).

Para esse delineamento experimental, foram realizadas duas corridas de pirosequenciamento. A primeira corrida foi reservada para as amostras da área de cerrado *sensu stricto* (seca e chuva) e para a fitofisionomia mata de galeria (seca e chuva). Posteriormente a segunda corrida de pirosequenciamento foi reservada para as fitofisionomias: cerrado denso e campo sujo.

As seqüências que não passaram pelos filtros de controle de qualidade do *MetaGenome Rapid Annotation with Subsystem Technology* (MG-RAST) foram descartadas das análises subsequentes. Os passos de controle de qualidade (QC)

realizado pelo MG-RAST tem como base remover todas as sequências que apresentarem baixa qualidade (bases ambíguas e/ou múltiplos N's internos) e sequências com os 50 primeiros pares de bases idênticos, pois a plataforma de sequenciamento 454 tem a característica de produzir ocasionalmente leituras que são quase idênticas.

Informações sobre o resultado da corrida *shotgun* 454 encontram-se na Tabela 11. Dezoito por cento do total das sequências foi eliminado pelo processo de filtro de qualidade das leituras, e aproximadamente 47% das sequências foram classificadas como função conhecida contra o banco de dados de subsistemas de perfil metabólico do SEED. Adicionalmente, 35% das sequências não foram atribuídas a nenhuma função conhecida com base nos dados de subsistemas de perfil metabólico do SEED, sugerindo a necessidade de aprimoramento nos algoritmos de predição para anotação de genes com função desconhecidas, ou talvez a utilização de outros métodos de predição de genes como, por exemplo, a construção de *contigs* antes da submissão dessas sequências a banco de dados específicos, com o intuito de melhorar a análise funcional dos metagenomas.

Embora a análise de metagenoma tenha sido realizada através da extração direta de DNA da comunidade microbiana presente em solos, os resultados demonstram que a maior proporção das sequências (87 %) foi classificada como pertencentes ao domínio das *Bacterias*. Aproximadamente, em média 10 % das sequências totais não obtiveram semelhança com o banco de dados, sendo essas sequências denominadas: Não_classificadas. De modo semelhante, menos de 1 % das sequências totais foram designadas como pertencente a Eucariotos, Archaeas e Vírus nas oito amostras de solo (Dados não mostrados).

Embora seja possível realizar análises de classificação taxonômicas baseado em dados metagenômicos, nesse atual estudo a classificação taxonômica foi inferida baseada apenas na informação contida nos genes rRNA (Figuras 9-19 e 24), os quais são conhecidos por fornecerem informação mais precisas em relação a classificação taxonômica.

Tabela 11: Valores dos dados metagenômicos obtidos a partir pirosequenciamento das amostras de solo das quatro fitofisionomia do bioma Cerrado.

Amostras	total de seqs	seqs removidas pelo QC*	seqs rRNA	seqs com função conhecida	seqs com função desconhecida	média das leituras
CD1_seca	85,346	15,821	538	40,547	28,366	425
CD5_seca	82,878	16,227	667	37,506	28,450	418
CD10_seca	42,190	7,564	354	20,094	14,178	426
CS1_seca	38,170	6,851	247	18,163	12,852	423
CS5_seca	65,601	11,749	388	31,751	21,643	424
CS10_seca	33,087	5,594	184	15,685	11,526	423
SS1_seca	79,968	17,194	726	35,263	26,785	401
SS5_seca	108,011	25,767	1,213	45,076	35,955	386
SS10_seca	66,301	14,395	683	29,175	22,048	400
MG1_seca	68,926	14,351	608	31,083	22,885	404
MG5_seca	70,393	14,781	614	31,354	23,644	402
MG10_seca	57,762	11,961	484	25,408	19,892	397
CD1_chuva	57,790	10,955	418	27,106	19,282	425
CD5_chuva	82,118	14,959	536	38,614	27,857	424
CD10_chuva	123,750	22,875	902	58,206	41,767	425
CS1_chuva	100,842	17,101	609	49,257	33,824	427
CS5_chuva	204,018	39,271	1,656	96,803	66,288	425
CS10_chuva	127,952	23,102	834	61,113	42,811	426
SS1_chuva	88,497	18,898	867	39,187	29,545	400
SS5_chuva	75,308	15,985	561	33,424	25,338	402
SS10_chuva	78,449	16,586	674	34,690	26,499	401
MG1_chuva	49,466	9,766	346	22,061	17,274	402
MG5_chuva	101,942	21,166	897	44,123	35,756	401
MG10_chuva	80,869	17,561	792	35,445	27,071	394

Na tabela 11, o qual demonstra os resultados gerais e individuais para cada réplica biológica das corridas *shotgun*, foi possível observar valores de porcentagem médios (47%) para as sequências que obtiveram classificação para função conhecida contra o banco de dados do SEED (*Max. E-Value Cutoff* $1e-10$, *Min. % Identity Cutoff* = 65% e *Min. Alignment Length Cutoff* = 50). Em contrapartida, muitas leituras não tem similaridade com o banco de dados (Tabela 11).

Atribuição funcional das sequências contra o banco de dados de subsistemas de perfil metabólico do SEED integrado ao programa MG-RAST forneceu uma visão integrada do metabolismo global para os 8 metagenomas analisados, o qual revelou que a maior parte das vias metabólicas foram detectadas em todas as fitofisionomias do bioma Cerrado, indicando um grau elevado de semelhança entre os metagenomas analisados.

Esse resultado já era esperado tendo em vista o conhecimento com o fato da redundância funcional encontrado em amostras ambientais (ALLISON *et al.*, 2008). No entanto, há algumas diferenças estatisticamente comprovadas no perfil metabólico ao longo da estação seca e chuvosa presente nas quatro fitofisionomias (Figura 29 a-d).

Entre as categorias funcionais identificadas pelo MG-RAST, destacaram-se como categorias dominantes: *clustering-based subsystems*, metabolismo de carboidratos e genes associados ao metabolismo de aminoácidos e derivados, assim como metabolismo de proteínas também foram abundantes em ambos metagenomas.

As análises estatísticas para as atribuições funcionais foram realizadas para cada fitofisionomia individualmente para detectar a influência a disponibilidade de água nas amostras de solo (Figura 29 a-d). Nesse contexto, a fitofisionomia cerrado denso apresentou alteração em 17 categorias funcionais (Figura 29 a). Dentre essas, *clustering-based subsystems*, metabolismos de carboidratos, aminoácidos, proteínas, DNA, potássio e genes associados à divisão e ciclo celular tiveram um aumento na sua abundância relativa durante a estação chuvosa quando comparado à estação seca (Figura 29 a).

A fitofisionomia de campo sujo apresentou 7 categorias funcionais com abundância relativa alterada, sendo que apenas o metabolismo de aminoácidos e

derivados tiveram sua abundância relativa significativamente enriquecida na estação chuvosa (Figura 29b). Para as fitofisionomias: cerrado *sensu stricto* e mata de galeria, 15 categorias funcionais apresentaram sua abundância relativa alterada, com relevância estatística, ao longo das estações seca e chuvosa (Figura 29 c-d).

A fitofisionomia cerrado *sensu stricto* foi à única que apresentou alterações na categoria referente à virulência, doença e defesa, com relevância estatística, durante a estação seca (Figura 29 c). Apesar das demais fitofisionomias também terem apresentado sequências com similaridade para essa categoria funcional, não houve diferença estatística entre as estações do ano (Figura 29 a-b-d). Esse resultado indicou que amostras de solos consistem em excelente reservatório para busca de novos genes associados à resistência a antibióticos e virulência. Analisando com mais detalhe essa categoria em específico, foi possível observar que maior proporção (48 %) das sequências foi identificada como membros resistentes a antibiótico e compostos tóxicos como, por exemplo: para resistência para cobalto-cádmio-zinco seguido por genes associados à resistência a fluoroquinolonas (11 %) ou para beta-lactamase (6 %).

Os solos analisados nesse estudo são caracterizados por possuírem níveis elevados de ferro (HARIDASAN, 1994) (Tabela 1) o qual pode ter sido o responsável pela elevada presença de genes relacionados à categoria funcional metabolismo e aquisição de ferro demonstrado na Figura 29.

Em adição, análise com mais detalhes dentro das subcategorias do metabolismo e aquisição de ferro, *Siderophores* (17%) seguido por *Hemi transposrt system* (15%) foram às subcategorias altamente representadas em todas fitofisionomias. O ferro é considerado um elemento essencial e pode ser limitante para a maioria dos organismos devido à sua insolubilidade em ambientes aeróbicos com pH neutro (BOYD *et al.*, 2007).

Em resposta a esses níveis elevados de ferro em amostras de solo, os micro-organismos têm desenvolvido várias estratégias para adquirir ferro, dessa maneira algumas bactérias possuem elevada afinidade pela produção e utilização de sideróforos, os quais são os agentes quelantes de ferro.

Genes encontrados em relação à resposta ao stress foram visualizados em todos os metagenomas analisados, entretanto apenas para as fitofisionomias campo sujo, cerrado *sensu stricto* e mata de galeria houve relevância estatística (Figura 29 b-c-d). Dentro da categoria resposta ao stress incluem genes relacionados ao stress oxidativo, osmótico, periplasmático, detoxificação, expressão das proteínas de choque térmico (HSPs).

Adicionalmente, genes relacionados com esporulação e dormência, como esperado, foram estatisticamente mais visualizados durante a estação seca do que em relação à estação chuvosa nas fitofisionomias cerrado denso, campo sujo e cerrado *sensu stricto*. Provavelmente, à exposição frequente às variações no nível de precipitação nas amostras desses solos podem explicar o fato dessa alta abundância desses genes anotados, indicando a presença de uma comunidade microbiana adaptada contra a dessecação (Figura 29 a-b-c).

Adicionalmente, genes associados ao metabolismo de compostos aromáticos foram visualizados em todas as fitofisionomias do bioma Cerrado sem alteração significativa entre as estações (Figura 29 a-d).

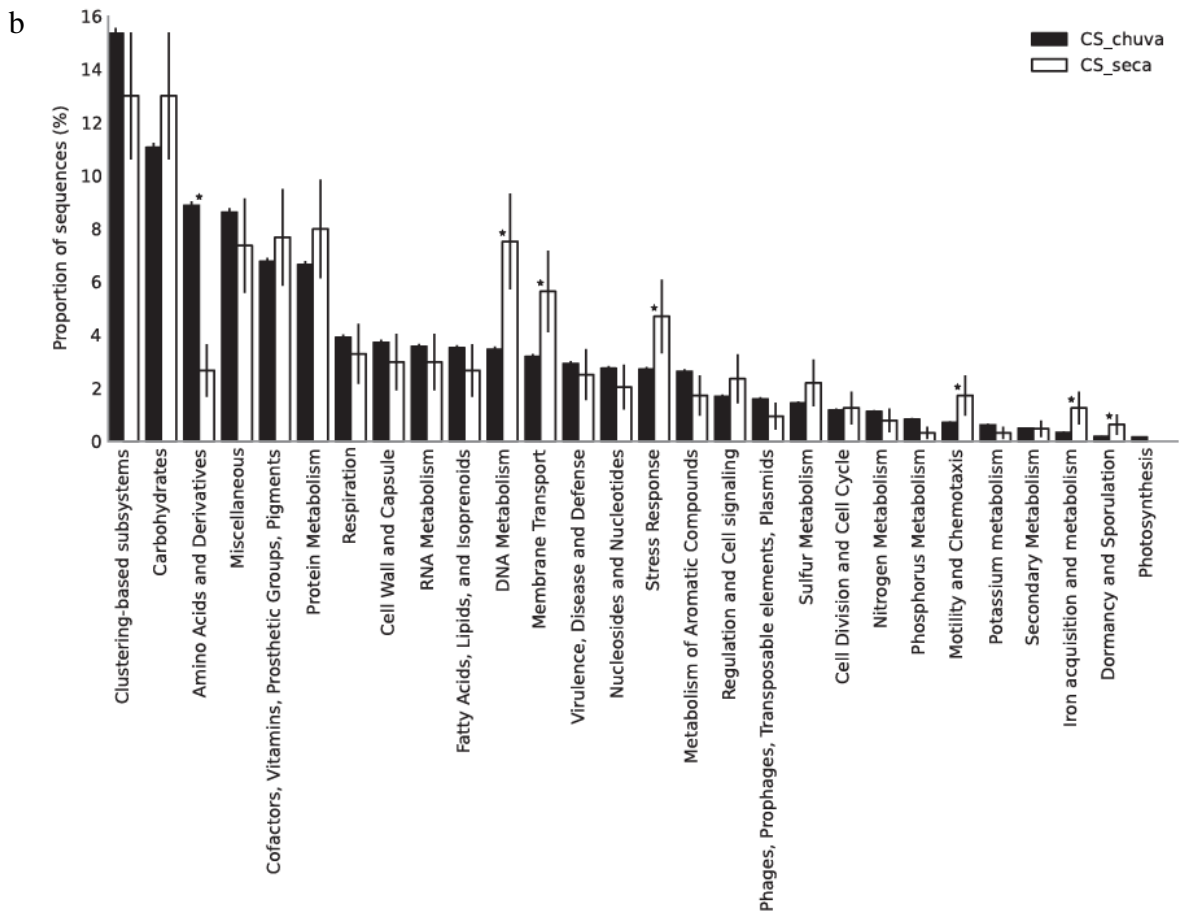
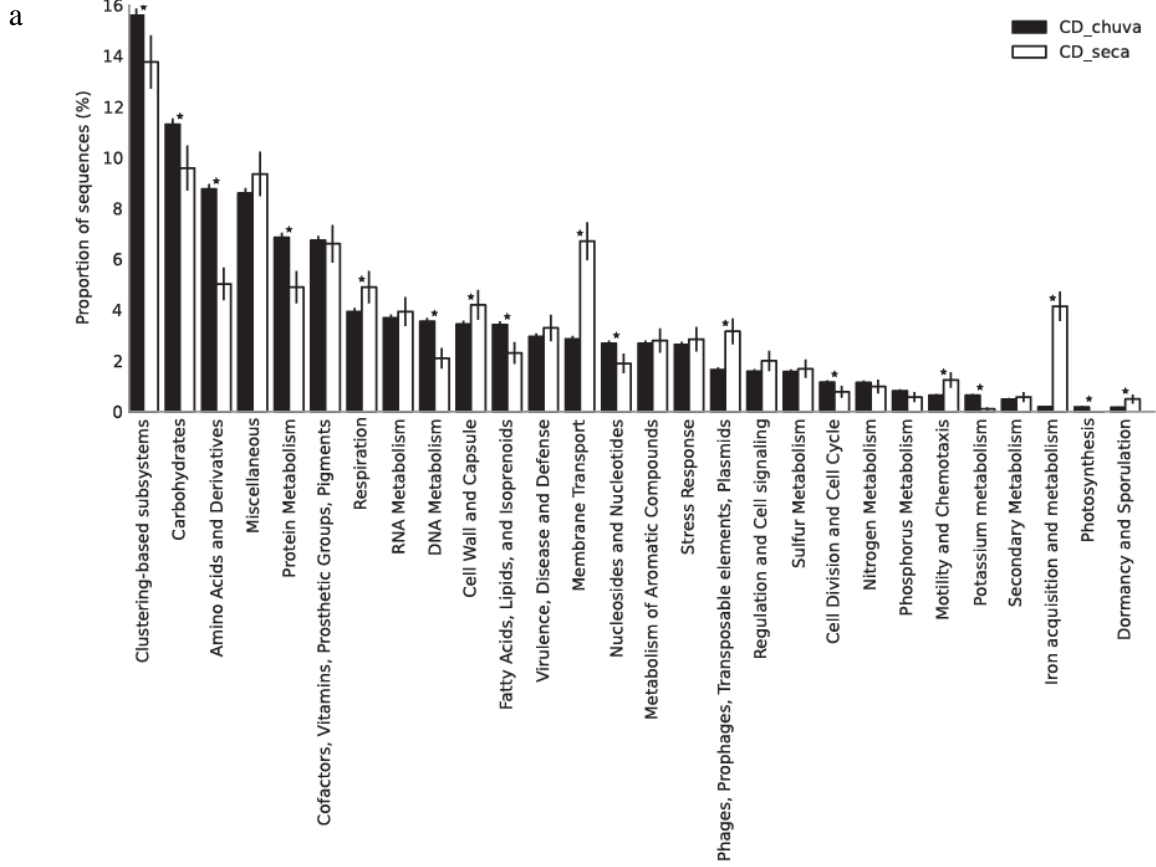
Tal como genes associados à categoria funcional respiração apresentaram representantes em todas as fitofisionomias, indicando que essas amostras de solo do bioma Cerrado são altamente dinâmicas. Entretanto, mata de galeria foi à única fitofisionomia que apresentou alteração significativa ao longo da estação seca para a chuvosa. Onde os níveis de abundância relativa associados aos genes relacionados à Respiração tiveram um aumento durante a estação chuvosa (Figura 29 d).

Era esperado que a fitofisionomia mata de galeria apresentasse altos níveis de genes relacionados a essa categoria funcional, devido principalmente a sua formação florestal onde há uma maior quantidade de raízes superficiais, quantidade de matéria orgânica no solo (Tabela 1) e maior densidade de espécies arbóreas, consequentemente maior disponibilidade de nutrientes (FELFILI *et al.*, 2004).

Em uma análise mais detalhada sobre a categoria funcional respiração foi possível observar que a subcategoria respiração anaeróbica reductase apresentou maior proporção de sequências (*Anaerobic dehydrogenase*, *Arsenate reductase* e *Thiosulfate reductase cytochrome B subunit*) durante a estação chuvosa em relação à estação seca,

indicando que provavelmente durante a estação chuvosa do ano pode ocorrer saturação por água no solo de mata de galeria para a realização de respiração aeróbica pelos micro-organismos.

Também foi observado que a categoria funcional metabolismo de fósforo foi alterada ao longo da estação seca para a chuvosa em solos de mata de galeria, demonstrando maior proporção de sequências durante a estação chuvosa (Figura 29 d).



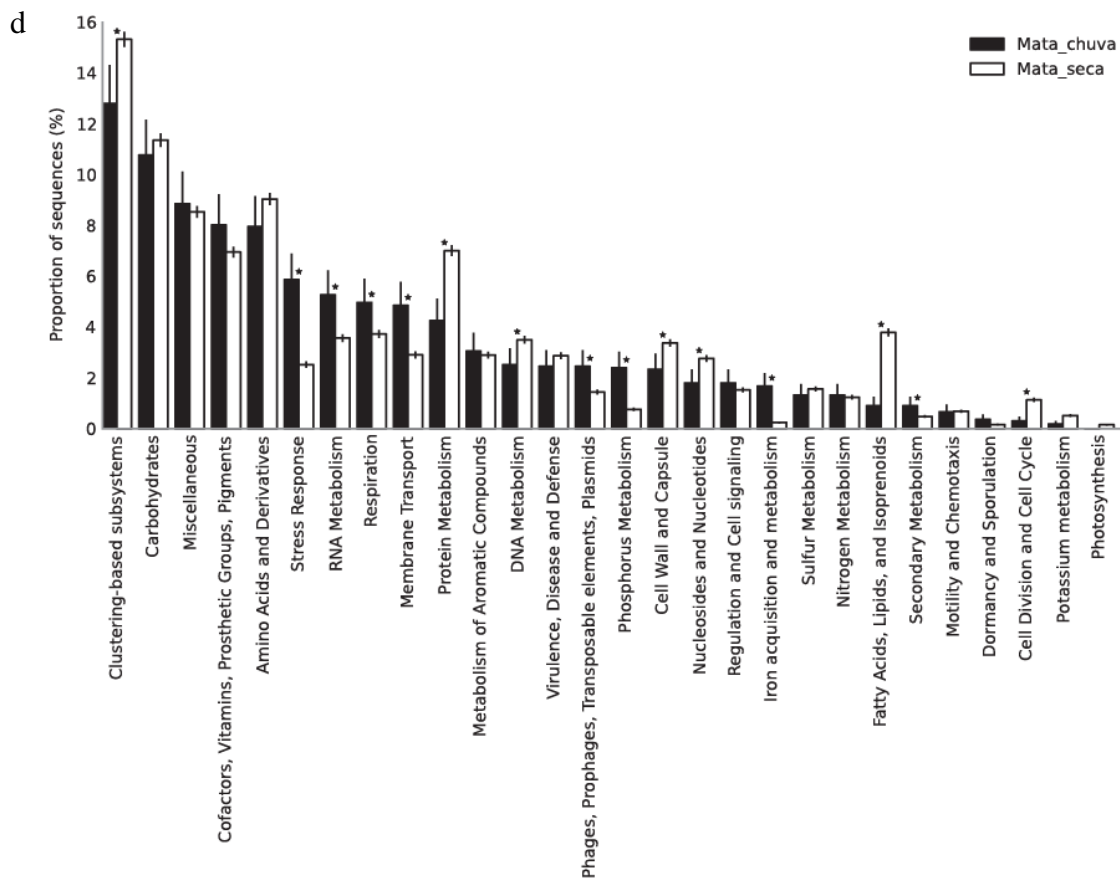
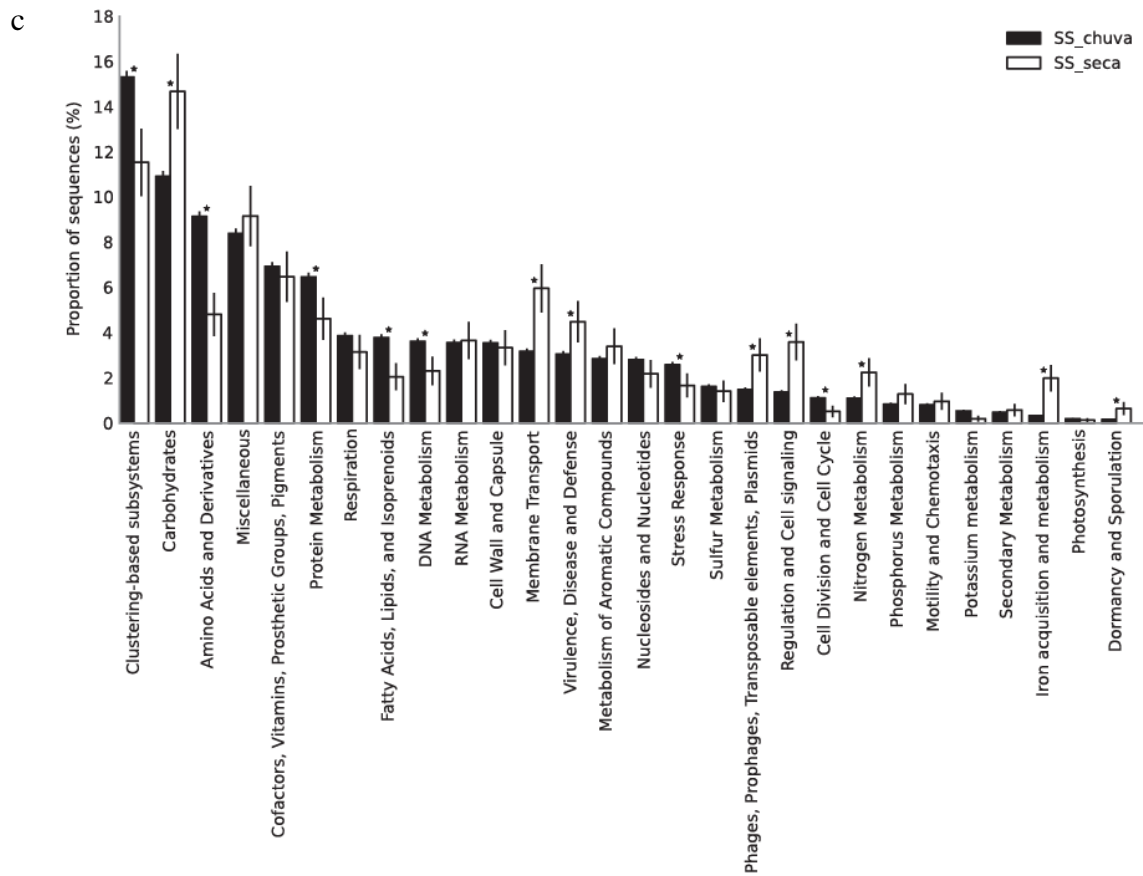


Figura 29: Análise funcional dos 8 metagenomas de solo na estação seca e chuvosa para cerrado denso (a); campo sujo (b); cerrado *sensu stricto* (c) e mata de galeria (d) baseados no banco de dados do MG-RAST. Todos os dados foram normalizados para a quantidade de sequências em cada fitofisionomia. A presença de um asterisco indica significativa diferença ($P < 0,01$) entre as duas estações do ano.⁹¹

Durante a abordagem de análise com montagem dos *contigs* (ver Material e Métodos), as sequências foram unidas conforme a estação amostrada, ou seja, todas as réplicas biológicas realizadas para cada fitofisionomia foram unidas com o intuito de diminuir a complexidade da montagem dos *contigs*. Consequentemente não visualizamos as diferenças em cada fitofisionomia individualmente como demonstrado na Figura 29, mas sim obter um panorama geral das principais diferenças devido apenas à disponibilidade de água entre as amostras de solo do bioma Cerrado em contrastantes estações do ano: seca/ chuva.

O número inicial de sequências para a montagem em *contigs* foi de 798.633,00 e 1.171.001,00 para a estação seca e chuvosa respectivamente. Ao final, 37.703 sequências foram alinhadas formando 6.593 *contigs* para a estação seca, indicando que apenas 4.72% das sequências totais foram alinhadas. Para a estação chuvosa, 91.819 sequências foram alinhadas formando 15.240 *contigs*, ou seja, aproximadamente 92 % das sequências totais não foram alinhadas em *contigs*.

Posteriormente, todos os *contigs* foram submetidos ao programa MetaGeneMark para a predição de genes. Ao total foram atingidos 4.478 e 11.778 genes para a estação seca e chuvosa respectivamente. Finalmente, o banco de dados IMG associados com todos os registros do KEGG ortólogos (KO) foi escolhido para realizar a anotação dos genes por meio BLASTp. Para a estação seca houve 2.012 genes anotados e 4.751 genes para a estação chuvosa.

Quando a abordagem de análise dos dados metagenômicos baseada em montagem de *contigs* foi realizado para a estação seca e chuvosa, e não mais para as fitofisionomias individualmente, foi possível detectar alto grau de similaridade ($R= 0.9$) entre os dois metagenomas analisados (Figura 30). Apesar dos dados de predição de genes durante a estação chuvosa ter sido numericamente maiores em relação ao resultado encontrado para a estação seca.

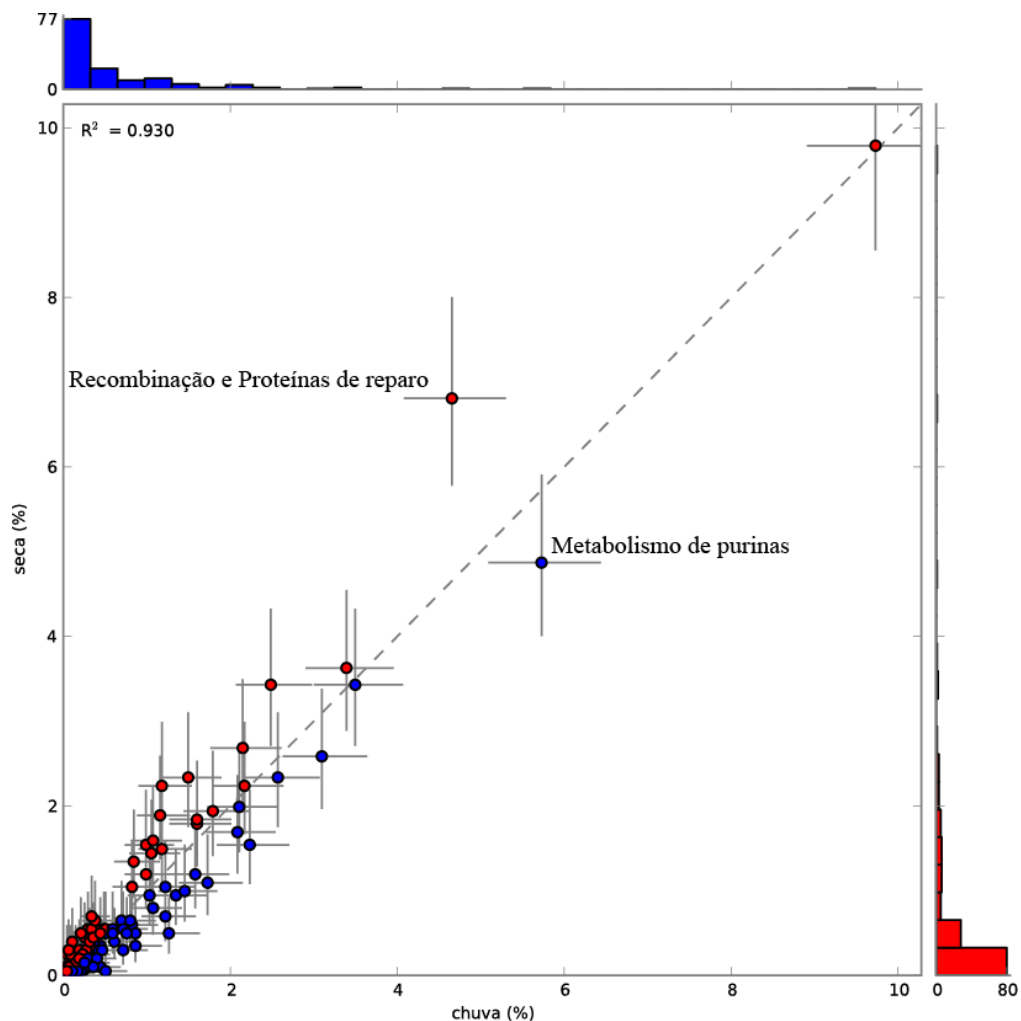


Figura 30: Comparação do perfil metabólico para os metagenomas das amostras combinadas da estação seca (vermelho) e chuvosa (azul). Os pontos nomeados indicam que essas funções tiveram maiores diferenças em relação à proporção de sequências entre os dois metagenomas. O gráfico em azul a esquerda indica a proporção do número de sequências para a estação chuvosa. O gráfico em vermelho a direita indica a proporção do número de sequências para a estação seca.

A razão para realizar a montagem dos dados foi para construir sequências maiores (*contigs*) e a partir desses ter uma maior confiabilidade no momento da predição de genes, anotação e classificação dentro de categorias funcionais (DE FILIPPO *et al.*, 2012).

Com essa abordagem, apesar do alto grau de similaridade, algumas diferenças significativas entre os metagenomas foram observadas (Figura 30).

Para o metagenoma com os *contigs* referente à estação seca (cor vermelho) destacou-se a presença, em alta proporção, para genes com funções relacionadas a recombinação e proteínas de reparo (Figura 30). De acordo com estudo recente, a

sobrevivência de bactérias que habitam os solos de clima seco é altamente dependente de mecanismos que limitam a oxidação das proteínas durante a desidratação (FREDRICKSON *et al.*, 2008). Dessa maneira, a alta proporção de genes relacionados com a função de recombinação e proteínas de reparo, detectados no metagenoma referente à estação seca para o solo do Cerrado (Figura 30) indica que a comunidade microbiana que habitam esses solos durante essas condições possuem robustos mecanismos de resistência ao estresse oxidativo de proteínas e DNA. Pois a proteção antioxidante de reparo de DNA e outras proteínas lhes permite manter a sua atividade catalítica e fornecer uma resposta rápida em condições de estresse oxidativo (POWELL *et al.*, 2007).

Para a comunidade microbiana presente nas amostras coletadas durante a estação chuvosa (cor azul), foi detectado em maior proporção genes relacionado ao metabolismo de purinas (Figura 30). Em particular, a principal utilização das purinas é a síntese do DNA, porém compreende componente indispensável ao organismo como o ATP, NADH, AMPc dentre outros, ou seja estão envolvidas nos processos de armazenamento de energia, transportador de elétrons em reações bioquímicas da célula e transdução de sinais na célula.

Por fim, foi realizada uma sobreposição entre os números de ko para cada gene predito, no intuito de determinar quais eram os ko visualizados unicamente em cada estação amostrada. Dessa maneira, foram encontrados para ambas as estações 611 ko compartilhados, 150 ko visualizados na estação seca e 694 para a estação chuvosa. A lista de ko visualizados unicamente em cada estação foram submetidos ao pathways.embl.de (Dados não mostrados).

8.0. Discussão

Neste estudo, foram apresentadas informações sobre as comunidades de bactérias, archaeas e fungos presentes em amostras de solo de diferentes fitofisionomias do bioma Cerrado durante a estação seca e chuvosa por meio de técnicas metagenômicas. As primeiras diferenças e semelhanças já foram obtidas por meio da análise das propriedades físico-químicas das amostras de solo nas diferentes fitofisionomias na estação seca e chuvosa (Tabela 1). Estas análises corroboram com os

demais estudos de solo no bioma Cerrado (ARAUJO *et al.*, 2012; MENDES *et al.*, 2012; RAMPELOTTO *et al.*, 2013), o qual demonstraram solos ácidos, com pH variando de 4.6 a 5.0 e baixa fertilidade.

De acordo com a Análise de Componentes Principais (PCA) dos parâmetros físico-químicos do solo na estação seca e chuvosa (Figura 6), observou-se que às propriedades físico-químicas do solo cerrado *sensu stricto* e cerrado denso agruparam-se no mesmo quadrante, separando campo sujo e mata de galeria em quadrantes diferentes. Indicando que os solos amostrados foram agrupados de acordo com suas particularidades das propriedades físico-químicas ao invés da disponibilidade de água nessas áreas. Apesar do conteúdo gravimétrico, nas áreas analisadas, ter sido diferente entre a estação seca e chuvosa (Figura 5). Tal variação pode estar ligada ao fato de que a cobertura vegetal nativa pode ser responsável por evitar a perda de água, indicando que possivelmente a fitofisionomia de mata de galeria não seja tão sensível às variações de umidade do solo, tendo em vista que essa fitofisionomia, durante a estação seca, detém de valores próximos de umidade no solo para as demais fitofisionomias quando comparados em relação a estação chuvosa. Essa característica pode ser associada à cobertura arbórea dessa área florestal, a qual é de 70 a 95%, evitando consequentemente a evaporação, durante a estação seca.

Como demonstrado neste e em outros estudos, a análise do DNA metagenômico em amostras de solo fornece uma ferramenta poderosa para o estudo da comunidade microbiana sem prévio cultivo (FIERER *et al.*, 2011; FIERER *et al.*, 2012; STEVEN *et al.*, 2012). No entanto, para comparar comunidade microbiana é aconselhável que se tenha replicação estatística suficiente para confirmar a validade de quaisquer padrões observados.

Nesse ponto, cada decisão sobre tamanho, tempo, escala foi cuidadosamente considerado antes do início do experimento, pois a diversidade microbiana no ambiente pode ser medida por vários índices, como a diversidade filogenética, diversidade de espécies, diversidade genética e diversidade funcional (HUGHES *et al.*, 2001).

Para lidar com os problemas de amostragem e tentar alcançar estimativas confiáveis da diversidade microbiana, a maneira de como será realizada a amostragem de um experimento irá depender da complexidade genética da comunidade microbiana

assim como da heterogeneidade ao longo do tempo e espaço do ambiente a ser analisado (PROSSER, 2010).

Nesse estudo foram analisadas três réplicas biológicas para cada fitofisionomia durante a estação seca e chuvosa. A réplica biológica teve por objetivo confirmar a veracidade dos dados encontrados, mas como se pode observar, ao trabalhar com três réplicas biológicas para cada amostra de solo, foram constatadas proporções diferentes de distribuição de sequências para cada amostra de solo (Figuras 9-19-24), sugerindo um perfil independente para cada réplica biológica.

Esse perfil contrastante entre as réplicas de certo modo já era esperado devido à alta complexidade genética encontrada em amostras de solo, além de cada *micro habitat* poder sofrer variações de acordo com fatores locais, como proximidade a raízes. Portanto a utilização de três réplicas biológicas para estudo de variabilidade genética em amostras de solo talvez não seja o ideal. Mas em contra partida qual seria o número ideal de réplicas biológicas para amostras tão complexas? Sendo que recentemente, foi estimado que para produzir uma amostragem representativa da comunidade microbiana presente em 1 grama de solo seriam necessárias mais de 6.000 corridas de sequenciamento (HiSeq2000) atingindo um custo total ao final de aproximadamente 267 milhões de dólares. Mesmo assim a cobertura sobre toda a composição da comunidade microbiana ainda não seria garantida (DESAI *et al.*, 2012). Ou seja, atualmente seria inviável tanto estruturalmente quanto principalmente financeiramente realizar tamanho experimento amostral.

Contudo, apesar do exposto, foi evidenciado nesse estudo que a disponibilidade de água durante a estação chuvosa afetou o teor gravimétrico de água nas amostras de solo (Figura 4) e conseqüentemente pode ter induzido as alterações visualizadas na composição (Fig. 10-11-12-13-20-25), estrutura (Figuras 15-22-27) e função (Figuras 29 e 30) da comunidade microbiana.

Em geral, comparações na composição da comunidade bacteriana entre as fitofisionomias do Cerrado já tinham sido enfatizadas durante a estação seca por meio de técnicas moleculares (ARAUJO *et al.*, 2012). Contudo, os resultados obtidos nesse estudo vêm a contribuir, em nível maior de detalhes, com o conhecimento de como é o comportamento das comunidades microbianas durante a estação seca e chuvosa simultaneamente.

A distribuição em nível de filo bacteriano para cada conjunto de dados revelou um padrão geral semelhante ao de outros estudos do solo (JANSSEN, 2006; BRUCE *et al.*, 2010; CHU *et al.*, 2010; ARAUJO *et al.*, 2012) o qual *Acidobacteria*, *Proteobacteria*, *AD3*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes* e *Chloroflexi* foram os filios mais abundantes (Figura 9).

Com base no critério da disponibilidade de água nas amostras de solo foi possível avaliar que, independentemente da fitofisionomia analisada, os filios *AD3*, *WPS-2*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* e *Chloroflexi* tiveram sempre suas abundâncias relativas reduzidas durante a estação chuvosa. Ao contrário, os filios *Proteobacteria* e *Cyanobacteria* sempre demonstraram aumento em suas abundâncias relativas em todas as fitofisionomias analisadas.

Os filios *AD3* e *WPS-2* podem ser designados como fazendo parte da rara biosfera dentro das amostras de solo devido ter sido detectado com baixa abundância nessas amostras de solo (Figura 9) e em demais estudos de diversidade de solo (JANSSEN, 2006; SILVA, 2012). Acompanhando o comportamento desses dois filios, observamos que durante a estação chuvosa há um declínio em relação à abundância relativa corroborando com o resultado de correlação de Pearson para o filo *AD3* (Figura 16). As importâncias ecológicas desses membros ainda permanecem desconhecidas. Entretanto uma hipótese é a de que os membros raros podem ser induzidos a entrar em estágio de dormência ou sofrer predação e/ou competição com os demais grupos de microrganismos em resposta a algumas mudanças adversas no ambiente (LENNON *et al.*, 2011). O mesmo pode estar ocorrendo com o solo do bioma Cerrado, onde podemos detectar que os filios *AD3* e *WPS-2* demonstraram alteração na sua abundância relativa logo após a estação seca. Esses dados corroboram com as curvas de abundância relativa, as quais se destacam a estação seca como tendo mais OTUs raros (baixa abundância) para as fitofisionomias de cerrado denso e cerrado *sensu stricto* (Figura 8 a-c).

Em adição, membro do filo *Cyanobacteria* foi geralmente mais abundante durante a estação chuvosa, indicando possivelmente uma preferência desse grupo por ambientes mais úmidos e conseqüentemente com maior disponibilidade de nutrientes.

Em relação à comunidade de archaeas, a alta abundância de *Crenarchaeota* detectada nesse estudo confirma os dados da literatura para solo do Cerrado (CATAO *et*

al., 2013), Amazônia (PAZINATO *et al.*, 2010) ou em outros diferentes tipos de solos (BATES *et al.*, 2010).

Nesse estudo sequências de *Euryarchaeota* também foram presentes nos dados, destacando-se a classe *Thermoplasmata* como a classe mais abundante, mesmo que (BATES *et al.*, 2010) tenha relatado que sequências de *Euryarchaeota* foram raramente encontradas nos solos amostrados em seu trabalho de biogeografia de *Archaea* em ambientes terrestres.

A classificação taxonômica para OTUs referentes ao domínio *Archaea* muitas vezes são indistinguíveis, devido à incorreta ou ausência de informações filogenéticas depositadas em bancos de dados. Um aspecto relevante refere-se à ausência de sequências renomeadas como *Thaumarchaeota* em bancos de dados públicos, observando que todas as sequências desse filo permanecem classificadas como *Crenarchaeota* (KAN *et al.*, 2011). Apesar de *Thaumarchaeota*, venha sendo considerado por vários autores como o novo filo (NUNOURA *et al.*, 2011), nesse atual estudo membros referentes à *Thaumarchaeota* foram anotados como pertencentes ao filo *Crenarchaeota*.

Após o período de seca, foram observadas diferenças significativas na abundância relativa de sequências para a comunidade de archaeas (Figura 20-21). Tal como detectado por (SZUKICS *et al.*, 2010; SZUKICS *et al.*, 2012), onde a comunidade de archaeas oxidantes de amônia foi afetada diretamente pelo conteúdo de água disponível no solo. Adicionalmente, como relatado por (ANGEL *et al.*, 2012), membros pertencentes à *Methanomicrobia* e *Methanobacteria* foram mais representativas quando o solo apresentou maior conteúdo de água (Figura 21) indicando que organismos do filo *Euryarchaeota*, tais como archaeas metanogênicas podem estar em menor número em épocas secas.

Dentro do conjunto de genes rRNA, as regiões comumente escolhidas como alvo para estudos ecológicos para a comunidade de fungo são os genes do 18S ou 28S rRNA e a região interna transcrita (*internal transcribed spacer*: ITS) (MONCHY *et al.*, 2011). Os genes rRNA são amplamente escolhidos para esse tipo de análises, uma vez que estes se apresentam em grande número na maioria das células, apesar de aparentemente, não ter a característica de transferência lateral de genes e possuírem um bom tamanho

de nucleotídeos englobando aproximadamente 1500 pares de base (BORNEMAN *et al.*, 2000).

Entretanto, a identificação taxonômica de fungos baseados no gene do 18S rRNA tem a característica de ser mais problemática quando comparado com a análise do gene do 16S rRNA. Isso se deve primeiramente ao fato da ausência relativa de variações dentro do gene do 18S rRNA entre espécies relativamente próximas, devido ser resultado de um curto período de evolução em comparação com as bactérias (HUGENHOLTZ *et al.*, 1996).

Em relação à comunidade fúngica, apesar de diversos estudos preferirem analisarem a região interna transcrita devido essas regiões conter significativas diferenças tanto em tamanho quanto em sequência de nucleotídeos (BUEE *et al.*, 2009; CREGGER *et al.*, 2012), nesse estudo optou em analisar a região da subunidade do ribossomo de eucariotos (18S rRNA). A escolha em analisar essa região nos proporcionou detectar sequências de todos os principais membros de fungos assim como outros organismos específicos (Figura 24). Demais estudos também optaram em utilizar a informação contida no gene do 18S rRNA para analisar diferenças entre comunidade fúngica presente desde em amostras de solo de floresta (MENG *et al.*, 2013) quanto em ambientes aquáticos (LE CALVEZ *et al.*, 2009).

Para todas as amostras de solo das fitofisionomias analisadas durante esse estudo, o filo mais abundante foi o *Ascomycota*, seguido pelo filo *Basidiomycota* independentemente da estação amostrada. Menor atribuição de sequências foi atribuída para o filo *Glomeromycetes* (Figura 24) corroborando com os resultados encontrados em estudo prévio realizados em solos no bioma Cerrado (CASTRO *et al.*, 2008) e tal como detectado em amostras de solo ao redor do mundo (MENG *et al.*, 2013) (BUEE *et al.*, 2009; MCGUIRE *et al.*, 2012).

Dentro da comunidade fúngica, *Ascomycota* e *Basidiomycota* são mediadores de ciclagem de nutrientes em ecossistemas florestais (TRAPPE *et al.*, 2000). Como esperado, valores com relevância estatística foram observados para o filo *Basidiomycota* na fitofisionomia florestal, o qual detém maior proporção de matéria orgânica, durante a estação seca quando comparada com as demais fitofisionomias (Figura 26b). Estudo recente sugeriu que membros do filo *Basidiomycota* tendem a colonizar solos ricos em matéria orgânica, devido suas habilidades de decompor compostos complexos (HANNULA *et al.*, 2010). Além disso, o filo *Glomeromycota* são

fungos micorrizos arbusculares que podem melhorar aquisição de nutrientes para plantas (SÁINZ *et al.*, 2006).

Devido à importância de interações mutualística descritos entre plantas e microorganismos, é supostamente esperado um forte efeito de espécies de plantas individuais sobre as comunidades de bactérias (KOWALCHUK *et al.*, 2002), archaeas (PEREIRA *et al.*, 2012) e de fungos (VAN DER HEIJDEN *et al.*, 2008), em amostras de solo. Entretanto em alguns casos esse evento nem sempre é observado (SINGH *et al.*, 2009).

De fato, alguns estudos sugerem que os fungos são mais fortemente associados com plantas do que os procariotos, sendo este último mais influenciado pelas propriedades do solo (MILLARD *et al.*, 2010; NIELSEN *et al.*, 2010). Além disso, embora muitos fungos e bactérias possam competir pelos mesmos recursos (ROUSK *et al.*, 2008), os fungos podem degradar moléculas complexas a partir da serapilheira que são inacessíveis para a maioria de bactérias (ROMANI *et al.*, 2006). Essas aparentes contrastantes exigências ecológicas podem afetar os padrões de diversidade beta destes dois domínios microbianos (NIELSEN *et al.*, 2010). No entanto, um estudo abrangente examinando isso em escala sazonal de precipitação não tinha sido feito até agora no bioma Cerrado.

Similarmente com os dados aqui demonstrados, diferenças na comunidade de fungos também foram correlacionadas com cobertura vegetal em solos no Alasca (WALLENSTEIN *et al.*, 2007), em solos de tundras no Canadá (CHU *et al.*, 2011) e em solos em alta altitude na França (ZINGER *et al.*, 2011). Com esses resultados podemos concluir que a composição de espécies de plantas que compõem as diferentes fitofisionomias analisadas nesse estudo, podem afetar as comunidades fúngica através de específicas interações mutualísticas, por ocasionar mudanças na estrutura dos solos devido à existência de uma variedade de arquitetura de diferentes raízes, quantidade e qualidade dos exsudados ou através de diferentes intensidades de competição pelos nutrientes (VAN DER HEIJDEN *et al.*, 2008).

Além disso, o fluxo do carbono da rizosfera fornece grandes quantidades de diversos substratos orgânicos, incluindo moléculas de sinalização que podem regular a densidade populacional da microbiota do solo (STANDING *et al.*, 2007). O efeito combinado das variáveis ambientais em conjunto com a relativa composição de espécies

de plantas notavelmente pode explicar as variações nas comunidades fúngica encontradas ao longo desse estudo.

Entretanto, uma estimativa robusta para o número global de espécies de fungos foi recentemente publicada (HAWKSWORTH, 2012). O qual enfatizou que as novas plataformas de sequenciamento de DNA são as responsáveis em revelar um número surpreendente de espécies de fungos, especialmente em amostras de solo (BUEE *et al.*, 2009; LENTEDNU *et al.*, 2011).

Até o momento, existem poucos estudos utilizando as novas plataformas de sequenciamento de DNA para analisar a diversidade de fungos presentes em amostras de solos tropicais, uma exceção é o estudo de McGuire *et al.* (2011), o qual foi realizado em floresta tropical no Panamá. Esse notável estudo demonstrou que a comunidade fúngica não apresentou correlação com a riqueza de espécies de plantas, mas havendo, no entanto uma forte correlação positiva entre a comunidade fúngica presente em amostras de solo com o regime de precipitação. Similarmente, os resultados aqui demonstrados também indicaram uma correlação da comunidade fúngica com o teor gravimétrico de água nas amostras de solo, o qual ficou claramente evidenciado pelo dendograma (Figura 26 c) o qual indicou que as comunidades fúngica foram separadas devido à disponibilidade de água.

Embora mais estudos sejam necessários, estes resultados em conjunto sugerem que a precipitação pode ser considerada como um fator mais importante para a estrutura da comunidade de fungos do que em relação à diversidade de plantas que habitam os solos em ambientes tropicais.

Diante do exposto, atualmente, a maioria dos estudos que avaliam as comunidades microbianas tem focado principalmente na abundância e diversidade de espécies, mas não nas possíveis interações entre as espécies. No entanto, interações entre espécies podem ser mais importante para o funcionamento do ecossistema do que o conhecimento sobre a riqueza e abundância de espécies, especialmente em ecossistemas complexos (ZHOU *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2011).

Nesse contexto, avanços têm sido alcançados nas análises de interações em rede entre espécies de animais e plantas (BASTOLLA *et al.*, 2009; BASCOMPTE *et al.*, 2007). Entretanto, análises em relação às interações em rede entre comunidades

microbianas ainda permanecem escassos (ARUMUGAM *et al.*, 2011; BARBERAN *et al.*, 2012). Durante esse estudo foi realizado, para a comunidade bacteriana, uma análise de interações em rede, o qual enfatizou a proporção de OTUs que foram compartilhados ou não compartilhados durante a estação seca e chuvosa (Figura 18). Tal como descrito por (BARBERAN *et al.*, 2012) a maior proporção dos OTUs compartilhados encontrado nesse estudo são membros pertencentes aos filós *Acidobacteria* e *Proteobacteria*. Geralmente esses dois filós são ubíquos em amostras de solo (TAMAMES *et al.*, 2010).

Na tabela 6 foi possível observar que os OTUs não compartilhados durante a estação seca foi composta em maioria por famílias pertencente aos filós *Actinobacteria* e *Firmicutes*. Esse resultado vem a corroborar com estudo recente, o qual diversos filós residentes de amostras de solo foram analisados quanto à capacidade de responder a disponibilização de nutrientes após as primeiras chuvas após longo período de seca (PLACELLA *et al.*, 2012). Com essa análise detectou-se que principalmente *Actinobacteria* e *Firmicutes* foram os filós que retomaram suas atividades em um tempo mais rápido (entre 1 a 24 horas) que demais filós como, por exemplo, *Proteobacteria* (alpha, beta e gamma) que responderam em período de tempo entre 24 a 72 horas após a disponibilidade de água (PLACELLA *et al.*, 2012).

A rápida resposta detectada para o filo *Actinobacteria* foi atribuída a maior abundância de moléculas de ribossomos por célula em seu genoma. Dessa maneira, o filo *Actinobacteria* pode ter uma síntese de proteínas mais rápida quando comparados a outros filós (ALAM *et al.*, 2011). Por outro lado, muitos *Actinobacteria* residentes de solo secos são conhecidos pela produção precoce de enzimas extracelulares as quais são capazes de interagir com partícula de solo como argila (GOODFELLOW *et al.*, 1983). Essa característica pode ser uma vantagem para esse filo, pois a hipótese levantada é que essas enzimas extracelulares podem se tornar funcional devida à mudança eletrostática fornecida pela disponibilidade de água nos solos (WALLENSTEIN *et al.*, 2008). Nesse contexto, membros do filo *Actinobacteria* poderiam acessar o substrato com maior rapidez, pois não haveria a necessidade de produzir novas enzimas.

Adicionalmente, os *Firmicutes* são bem conhecidos pela sua capacidade de produzir esporos altamente resistentes (SHARIPOVA *et al.*, 2002). A capacidade de esporulação é um mecanismo bem estudado de proteção contra alguns tipos de stress

incluindo a dessecação. Com base nessas observações e nos dados contidos neste estudo, *Actinobacteria* e *Firmicutes* são filos sensíveis às alterações de umidade no solo, demonstrando mecanismos de resistência a períodos de seca. Entretanto estudos adicionais são necessários para compreender os mecanismos pelo qual esses filos se adaptam às mudanças em seu ambiente.

Essa análise foi importante e interessante a fim de comparar as interações em rede realizadas pela comunidade bacteriana sob duas condições contrastante, e desta forma extrapolar os possíveis mecanismos de estabilidade e resiliência dessa comunidade. Além de contribuir no conhecimento de como seria a reposta da comunidade bacteriana quando há mudança climática em seu ambiente natural.

Devido ao conhecimento que o estoque de água no solo é dependente das diversas características ambientais na quais estão submetidas às amostras de solos incluindo, por exemplo, cobertura vegetal e textura do solo, a hipótese, de que as fitofisionomias de formação savânicas (cerrado denso e cerrado *sensu stricto*) e formação campestre (campo sujo) apresentariam padrões diferentes referentes à composição taxonômica e potencial funcional quando comparado com as comunidades microbianas presente em amostras de solo de formação florestal (mata de galeria) durante a estação seca e chuvosa, foi formulada.

A hipótese foi estabelecida devia ao conhecimento que haja uma conexão entre a composição de espécies de plantas com a diversidade de comunidades microbianas (CHUNG *et al.*, 2007). Este fato ocorre especialmente onde solos pobres de nutrientes e com baixo pH tendem a exibir baixas taxas de nitrificação e mineração. Geralmente devido à disponibilidade limitante de nitrogênio nestes tipos de solos. Dessa maneira a disponibilidade de nutrientes para as carências das plantas é fortemente dependente da atividade microbiana (VAN DER HEIJDEN *et al.*, 2008).

Para avaliar a relação da comunidade microbiana com a heterogeneidade de fitofisionomias combinado com o teor gravimétrico de água nas amostras de solo, neste atual estudo foram utilizados sete diferentes medidas de β -diversidade. Sabe-se que diferentes medidas de β -diversidade podem variar substancialmente seus resultados em relação à sensibilidade para detecção de abundância relativa de OTUs observados ou para raros OTUs, indicando que a utilização de uma única medida de β -diversidade

pode não demonstrar todas as informações sobre a similaridade ou diferença de quaisquer comunidades microbianas (PARKS *et al.*, 2012).

De acordo com as análises de coeficientes de correlação de Pearson, existe uma forte influência do teor gravimétrico de água nas amostras de solo com a composição da comunidade de bactéria, archaeas e fungos na estação seca e chuvosa. Esse resultado ficou evidente a partir dos dados de β -diversidade demonstrado nos gráficos de PCoA (Figura 15-22-27) o qual corroboraram com o resultado do teste de ANOSIM e Mantel. Ou seja, as distâncias filogenéticas das comunidades microbianas foram claramente relacionadas com mudanças na abundância relativa para diferentes níveis hierárquicos de classificação taxonômica (Figura 16-23-28).

A utilização de várias medidas de β -diversidade foi útil para fornecer informações adicionais, as quais têm como objetivo confirmar o mesmo resultado sobre como as comunidades microbianas, presente em amostras de solo do bioma Cerrado, tem sua composição alterada ao longo das variações temporais de teor gravimétrico de água nas amostras de solo.

Além das análises de composição e estrutura taxonômica da comunidade microbiana, análises com abordagem de metagenoma funcional têm sido aplicadas com sucesso em amostras de solo (DELMONT *et al.*, 2012; FIERER *et al.*, 2012). Recentemente, a funcionalidade da comunidade microbiana presente em diferentes fitofisionomias do solo do bioma Cerrado foi analisada conforme a atividade das enzimas fosfatase ácida, β -glucosidase e arilsulfatase durante a estação seca e chuvosa (MENDES *et al.*, 2012). A arilsulfatase foi à enzima que teve sua atividade mais influenciada pela fitofisionomia vegetal o qual independentemente estação e ano, as maiores atividades de arilsulfatase foram observados na amostra de mata de galeria.

Adicionalmente, atividade das enzimas fosfatase ácida e β -glucosidase foram maiores durante a estação chuvosa (MENDES *et al.*, 2012). O aumento da atividade da enzima fosfatase ácida durante a estação chuvosa foi relacionado com a umidade do solo, o qual favorece o crescimento microbiano e de plantas devido maior demanda de P (BELL *et al.*, 2008). No caso da β -glucosidase, a detecção de maior atividade durante a estação chuvosa pode ter sido porque a disponibilidade de substratos é maior devido à decomposição de matéria orgânica acumulada durante a estação seca (CLEVELAND *et al.*, 2011).

Os resultados aqui demonstrados também demonstraram que essa alteração sazonal encontrada no bioma Cerrado afetou o potencial funcional das comunidades microbianas presente nas amostras de solo em todas as fitofisionomias analisadas (Figura 29).

A abundância relativamente alta de *clustering-based subsystems* (baseado no banco de dados do SEED, esse é um agrupamento de genes que possuem funções similares frequentemente encontrados juntos em múltiplos organismos, mas que, no entanto a maioria desses genes ainda possui função putativa ou desconhecida) em todas as fitofisionomias do bioma Cerrado, bem como a outros estudos de metagenoma de solo (DELMONT *et al.*, 2012; FIERER *et al.*, 2012), sugere que esses genes possuem provavelmente papel-chave nos ecossistemas de solo em todo o mundo, o qual deve ser analisado com mais esforços em estudos futuros com a finalidade de compreender melhor o ecossistema solo.

Adicionalmente, genes associados ao metabolismo de compostos aromáticos foram visualizados em todas as fitofisionomias do bioma Cerrado sem alteração significativa entre as estações (Figura 29 a-d). Esse resultado indica que a comunidade microbiana está potencialmente ativa em todas as estações em relação a essa função em específico. Sabe-se que as plantas tipicamente representam a maior fonte de carbono orgânico nos solos, e essa constante entrada de carbono orgânico é geralmente de quantidade e qualidade distintos entre os solos, mas que são geralmente enriquecidos por compostos aromáticos (GRANDY *et al.*, 2008). Por isso, essa frequência constante de genes relacionados ao metabolismo de compostos aromáticos era esperada, tendo em vista que esse estudo foi realizado em áreas nativas compostas por inúmeras diferentes espécies de plantas (MENDONÇA *et al.*, 2008).

Devido essa alta diversidade de espécies de plantas, a comunidade microbiana deve possuir mecanismos especializados a degradação desses compostos orgânicos complexos, semelhante aos aromáticos, liberados pelas plantas nos solos. Diferentemente do perfil encontrado em solos desérticos, o qual há baixa abundância de genes relacionados ao metabolismo de compostos aromáticos, devido à ausência de densa cobertura de vegetação nessas regiões (FIERER *et al.*, 2012).

Por sua vez, genes ligados ao transporte de membranas, dormência, esporulação, parede celular assim como metabolismo e aquisição de ferro demonstraram estar

enriquecidos durante a estação seca (Figura 29 a-b-c). Perfil semelhante foi visualizado ao longo de diferentes locais de coletas de solo desérticos (FIERER *et al.*, 2012). Provavelmente, à exposição frequente às variações no nível de precipitação nas amostras desses solos podem explicar o fato dessa alta abundância desses genes anotados, indicando a presença de uma comunidade microbiana adaptada contra a dessecação. Nesse contexto, o potencial funcional de comunidades microbianas presente em amostras dos Vales secos de McMurdo na Antártica indicou uma maior representatividade de vias metabólicas diretamente relacionadas ao estresse ambiental incluindo respostas a limitação térmica, osmótica e de nutrientes (CHAN *et al.*, 2013). Todas essas informações vêm a expandir nosso conhecimento de como essas comunidades microbianas toleram as condições extremas relacionadas ao estresse ambiental e quais seria sua capacidade de responder às mudanças climáticas futuras.

Outra categoria funcional relevante foi o metabolismo de fósforo ter apresentado maior proporção de sequências durante a estação em solos de mata de galeria. Esse resultado pode ser devido a apenas a maior concentração desse elemento em relação às áreas savânicas e campestre (Tabela 1), pois o fósforo disponível em áreas de mata de galeria encontrado durante a seca apresentou valores superiores às demais fitofisionomias (Tabela 1). Entretanto, esse valor passa a ser aproximadamente cinco vezes maior do que a encontrada no solo das outras áreas durante a estação chuvosa (ARAÚJO *et al.*, 2012). Essa característica corrobora com outro estudo recente realizado também em área de cerrado *sensu stricto*, os quais verificaram que houve um aumento da concentração P microbiano no intervalo de 0-10 cm do solo na estação chuvosa (RESENDE *et al.*, 2010), sugerindo que o mecanismo de conservação do fósforo inclui a imobilização desse elemento pela comunidade microbiana durante a estação chuvosa.

Adicionalmente, em outro importante estudo realizado em parcelas do solo do cerrado *sensu stricto* submetido à adição de nutrientes, demonstrou que a abundância de todos os filos bacterianos teve aumento em sua abundância relativa no tratamento fósforo em relação ao tratamento controle (SILVA, 2012). Com bases nesses resultados, o fósforo tem sido considerado um elemento limitante tanto para as plantas quanto para a comunidade microbiana do solo do bioma Cerrado.

Em relação à abordagem alternativa de análise de dados metagenômicos (Figura 30), o número relativamente baixo de genes preditos é um resultado comum dentro de estudos metagenômicos (GILBERT *et al.*, 2011; FIERER *et al.*, 2012), devido primeiramente ao viés introduzido pelos erros embutidos dentro das plataformas de sequenciamento de alto desempenho e pelo fato de que novos genes detectados não terem sido alocados em corretas categorias funcionais. Dessa maneira, há invariavelmente perda de genes anotados que conseqüentemente podem ter importantes funções ou podem ser os principais responsáveis por diferenças fundamentais em amostras de solo.

Apesar de estarmos longe da obtenção de uma completa compreensão sobre a microbiota do solo, nossa abordagem de combinar pirosequenciamento de genes rRNA e DNA total nos permitiu observar algumas especificidades funcional das comunidades microbianas do solo que habitam o bioma Cerrado. Esses resultados vêm a contribuir com outros importantes dados de metagenoma de solos (DELMONT *et al.*, 2012; FIERER *et al.*, 2012; UROZ *et al.*, 2013). Dessa maneira construindo o conhecimento de como as comunidades microbianas podem ser influenciadas por fatores bióticos e abióticos em sistemas tão complexos.

Nesse contexto, todos os resultados visualizados durante esse estudo nos permitiram concluir que a comunidade de bactérias, archaeas e fungos de solo foram influenciados em termos de diversidade e funcionalidade biológica e sugerimos que as distribuições descontínuas das diferentes fitofisionomias do bioma Cerrado podem servir como um mecanismo de seleção para organismos com alta resistência a oscilações entre solos úmido /seco.

Em resumo, nossos resultados revelaram que as comunidades microbianas em solos coletados em diferentes estações do ano e em diferentes fitofisionomias diferiam claramente na sua resposta à disponibilidade de água. O padrão observado nos processos microbianos refletiu nas adaptações fisiológicas dos microrganismos durante a estação seca da chuvosa.

Até o momento, esse atual estudo é pioneiro na avaliação simultaneamente de comunidades de bactérias, archaeas e fungos em amostras de solo durante a estação seca e chuvosa no bioma Cerrado. Os resultados sugerem que tanto a abundância taxonômica quanto a função biológica dessas comunidades foram influenciadas não apenas pelo de

teor gravimétrico de água nas amostras de solo, mas também a outros fatores, como a cobertura vegetal e textura do solo, o que está de acordo com os relatos da literatura (FIERER *et al.*, 2012). Estes resultados podem ajudar a responder perguntas sobre como as interações entre os diferentes tipos de vegetação e de regimes alterados de precipitação podem interagir para afetar a abundância, estrutura e funções da comunidade microbiana neste ecossistema.

Portanto, o conhecimento sobre a abundância e atividade da comunidade microbiana do solo do Cerrado em diferentes fitofisionomias em áreas nativas pode contribuir na compreensão sobre as mudanças no balanço de carbono e fluxo de gases do efeito estufa, além de poder servir como uma referência para avaliar o nível de conservação do solo em áreas próximas que foram convertidas para pastagem ou agricultura.

9. Considerações finais:

- Para as quatro fitofisionomias aqui estudadas do bioma Cerrado, houve significantes alterações na composição taxonômica e funcionalidade biológica para as comunidades microbianas (bactérias, archaeas e fungos) na estação seca para a chuvosa constatada por ambas as estratégias de análise (pirosequenciamento de genes rRNA e DNA total);
- De acordo com as análises de pirosequenciamento dos genes rRNA, existe clara influência da umidade do solo com a composição da comunidade microbiana, indicando que o teor gravimétrico de água nas amostras de solo pode ser considerado como um dos preditores de variabilidade dentro da diversidade microbiana presente em amostras de solo do bioma Cerrado;
- A cobertura vegetal influenciou nitidamente a composição da comunidade de bactérias, archaeas e fungos do solo das fitofisionomias do Cerrado. Possivelmente, as afinidades entre as comunidades microbianas presente nos solos de cerrado *sensu stricto* e cerrado denso são devido às semelhanças na vegetação e propriedades do solo entre essas áreas, uma vez que é a fitofisionomia cerrado denso pode ser considerado um subtipo da fitofisionomia de cerrado *sensu stricto*. Em relação à fitofisionomia mata de galeria, as

comunidades microbianas do solo foram relativamente menos sensíveis as variações no teor gravimétrico de água nas amostras de solo, provavelmente devido sua densa cobertura vegetal, proporcionando pouca perda e umidade nos solos;

- Com a análise de interação em rede foi possível detectar, com maior nível de detalhes, quais são as famílias bacterianas compartilhadas para a estação seca e chuvosa, assim como as famílias não compartilhadas em ambas as estações para amostras de solo do bioma Cerrado;
- Pela primeira vez o potencial funcional das comunidades microbianas do solo do bioma Cerrado foi caracterizado por meio de técnicas metagenômicas, indicando que genes associados transporte de membranas, dormência, esporulação, parede celular assim como metabolismo e aquisição de ferro demonstraram estar ressaltados durante a estação seca; Durante o período chuvoso, quando as condições tornam-se mais favoráveis, o potencial da comunidade microbiana encontra-se de forma mais abundante e diversa, sendo possível notar a presença genes preditos para as funções de metabolismo de aminoácidos, DNA, proteína e de metabólitos secundários ressaltados.

10. Perspectiva futura

Visto que a abundância, composição e potencial funcional das comunidades microbianas foram influenciados pelo teor gravimétrico de água nas amostras de solo, a perspectiva geral a ser formulada para esse estudo seria a utilização de estratégias promissoras como Metatranscriptoma e Metaproteômica. Pois uma análise integrada dos genes rRNA, RNA mensageiro e proteínas seria o ponto chave para avaliar as interações e adaptações fisiológicas da comunidade microbiana dos solos. Inerentemente, essas relações podem ter implicações importantes para a trajetória futura, influenciando não apenas a comunidade microbiana do solo, como também a comunidade dos macroorganismos que habitam o ambiente dos solos.

11. Referências

- ACINAS, S. G.; MARCELINO, L. A.; KLEPAC-CERAJ, V.; POLZ, M. F. Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operons. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 9, p. 2629-2635, 2004.
- ALAM, M. T.; MEDEMA, M. H.; TAKANO, E.; BREITLING, R. Comparative genome-scale metabolic modeling of actinomycetes: the topology of essential core metabolism. **FEBS Lett**, v. 585, n. 14, p. 2389-2394, 2011.
- ALLAN, R. P.; SODEN, B. J. Atmospheric warming and the amplification of precipitation extremes. **Science**, v. 321, n. 5895, p. 1481-1484, 2008.
- ALLISON, S. D.; MARTINY, J. B. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105 Suppl 1, n., p. 11512-11519, 2008.
- ANDREOTE, F. D.; JIMENEZ, D. J.; CHAVES, D.; DIAS, A. C.; LUVIZOTTO, D. M.; DINI-ANDREOTE, F.; FASANELLA, C. C.; LOPEZ, M. V.; BAENA, S.; TAKETANI, R. G.; DE MELO, I. S. The microbiome of brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38600, 2012.
- ANGEL, R.; CLAUS, P.; CONRAD, R. Methanogenic archaea are globally ubiquitous in aerated soils and become active under wet anoxic conditions. **ISME J**, v. 6, n., p. 847-862, 2012.
- ANSORGE, W. J. Next-generation DNA sequencing techniques. **N Biotechnol**, v. 25, n. 4, p. 195-203, 2009.
- ARAÚJO, J. F.; DE CASTRO, A. P.; COSTA, M. M.; TOGAWA, R. C.; JUNIOR, G. J.; QUIRINO, B. F.; BUSTAMANTE, M. M.; WILLIAMSON, L.; HANDELSMAN, J.; KRUGER, R. H. Characterization of Soil Bacterial Assemblies in Brazilian Savanna-Like Vegetation Reveals Acidobacteria Dominance. **Microb Ecol**, 2012.
- ARMOUGOM, F.; RAOULT, D. Exploring microbial diversity using 16S rRNA high-throughput methods. **J Comput Sci Syst Biol**, v. 2, n. 1, p. 74-92, 2009.
- ARUMUGAM, M.; RAES, J.; PELLETIER, E.; LE PASLIER, D.; YAMADA, T.; MENDE, D. R.; FERNANDES, G. R.; TAP, J.; BRULS, T.; BATTO, J. M.; BERTALAN, M.; BORRUEL, N.; CASELLAS, F.; FERNANDEZ, L.; GAUTIER, L.; HANSEN, T.; HATTORI, M.; HAYASHI, T.; KLEEREBEZEM, M.; KUROKAWA, K.; LECLERC, M.; LEVENEZ, F.; MANICHANH, C.; NIELSEN, H. B.; NIELSEN, T.; PONS, N.; POULAIN, J.; QIN, J.; SICHERITZ-PONTEN, T.; TIMS, S.; TORRENTS, D.; UGARTE, E.; ZOETENDAL, E. G.; WANG, J.; GUARNER, F.; PEDERSEN, O.; DE VOS, W. M.; BRUNAK, S.; DORE, J.; ANTOLIN, M.; ARTIGUENAVE, F.; BLOTTIERE, H. M.; ALMEIDA, M.; BRECHOT, C.; CARA, C.; CHERVAUX, C.; CULTRONE, A.; DELORME, C.; DENARIAZ, G.; DERVYN, R.; FOERSTNER, K. U.; FRISS, C.; VAN DE GUCHTE, M.; GUEDON, E.; HAIMET, F.; HUBER, W.; VAN HYLCKAMA-VLIEG, J.; JAMET, A.; JUSTE, C.; KACI, G.; KNOL, J.; LAKHDARI, O.; LAYEC, S.; LE ROUX, K.; MAGUIN, E.; MERIEUX, A.; MELO MINARDI, R.; M'RINI, C.; MULLER, J.; OOZEER, R.; PARKHILL, J.; RENAULT, P.; RESCIGNO, M.; SANCHEZ, N.; SUNAGAWA, S.; TORREJON, A.; TURNER, K.; VANDEMEULEBROUCK, G.; VARELA, E.;

- WINOGRADSKY, Y.; ZELLER, G.; WEISSENBACH, J.; EHRLICH, S. D.; BORK, P. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, v. 473, n. 7346, p. 174-180, 2011.
- AUGUET, J. C.; BARBERAN, A.; CASAMAYOR, E. O. Global ecological patterns in uncultured Archaea. **ISME J**, v. 4, n. 2, p. 182-190, 2009.
- BAKER, G. C.; SMITH, J. J.; COWAN, D. A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. **J Microbiol Methods**, v. 55, n. 3, p. 541-555, 2003.
- BARBERAN, A.; BATES, S. T.; CASAMAYOR, E. O.; FIERER, N. Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. **ISME J**, v. 6, n. 2, p. 343-351, 2012.
- BASCOMPTE, J.; JORDANO, P. Plant-animal mutualistic networks: The architecture of biodiversity. **Ann Rev Ecol Evol Syst**, v. 38, n., p. 567-593, 2007.
- BASTOLLA, U.; FORTUNA, M. A.; PASCUAL-GARCIA, A.; FERRERA, A.; LUQUE, B.; BASCOMPTE, J. The architecture of mutualistic networks minimizes competition and increases biodiversity. **Nature**, v. 458, n. 7241, p. 1018-1020, 2009.
- 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. **ISME J**, v. 5, n. 5, p. 908-917, 2010.
- BELL, C.; MCINTYRE, N.; COX, S.; TISSUE, D.; ZAK, J. Soil microbial responses to temporal variations of moisture and temperature in a chihuahuan desert grassland. **Microb Ecol**, v. 56, n. 1, p. 153-167, 2008.
- BELL, C. W.; ACOSTA-MARTINEZ, V.; MCINTYRE, N. E.; COX, S.; TISSUE, D. T.; ZAK, J. C. Linking microbial community structure and function to seasonal differences in soil moisture and temperature in a Chihuahuan desert grassland. **Microb Ecol**, v. 58, n. 4, p. 827-842, 2009.
- BELNAP, J.; WELTER, J. R.; GRIMM, N. B.; BARGER, N.; LUDWIG, J. A. Linkage between microbial and hydrologic processes in arid and semiarid watersheds. **Ecology** v. 86, n., p. 298-307., 2005.
- BENEDUZI, A.; PERES, D.; VARGAS, L. K.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; PASSAGLIA, L. M. P. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. **Appl Soil Ecol**, v. 39, n., p. 311-320, 2008.
- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **J Roy Stat Soc B**, v. 57, n., p. 289-300, 1995.
- BINTRIM, S. B.; DONOHUE, T. J.; HANDELSMAN, J.; ROBERTS, G. P.; GOODMAN, R. M. Molecular phylogeny of Archaea from soil. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 1, p. 277-282, 1997.
- BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Appl Environ Microbiol**, v. 63, n. 7, p. 2647-2653, 1997.

BOYD, P. W.; JICKELLS, T.; LAW, C. S.; BLAIN, S.; BOYLE, E. A.; BUESSELER, K. O.; COALE, K. H.; CULLEN, J. J.; DE BAAR, H. J.; FOLLOWS, M.; HARVEY, M.; LANCELOT, C.; LEVASSEUR, M.; OWENS, N. P.; POLLARD, R.; RIVKIN, R. B.; SARMIENTO, J.; SCHOEMANN, V.; SMETACEK, V.; TAKEDA, S.; TSUDA, A.; TURNER, S.; WATSON, A. J. Mesoscale iron enrichment experiments 1993-2005: synthesis and future directions. **Science**, v. 315, n. 5812, p. 612-617, 2007.

BRAGG, L.; STONE, G.; IMELFORT, M.; HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G. W. Fast, accurate error-correction of amplicon pyrosequences using Acacia. **Nat Methods**, v. 9, n. 5, p. 425-426, 2012.

BRESOLIN, J. D.; BUSTAMANTE, M. M. C.; KRÜGER, R. H.; SILVA, M. R. S. S.; PEREZ, K. S. Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian Cerrado. **Braz J Microbiol**, v. 41, n., p. 391-403, 2010.

BRIDGE, P., ROBERTS, P.J., SPOONER, B.M., PANCHAL, G. On the unreliability of published DNA sequences. **New Phytologist**, v. 160 n. 1, p. 43-48., 2003.

BRUCE, T.; MARTINEZ, I. B.; MAIA NETO, O.; VICENTE, A. C.; KRUGER, R. H.; THOMPSON, F. L. Bacterial community diversity in the Brazilian Atlantic forest soils. **Microb Ecol**, v. 60, n. 4, p. 840-849, 2010.

BRUCE, T.; CASTRO, A. P.; KRUGER, R. H.; THOMPSON, C. C.; THOMPSON, F. L. Microbial Diversity of Brazilian Biomes. **Genomics Applications for the Developing World, Advances in Microbial Ecology**, 2012.

BUEE, M.; REICH, M.; MURAT, C.; MORIN, E.; NILSSON, R. H.; UROZ, S.; MARTIN, F. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. **New Phytol**, v. 184, n. 2, p. 449-456, 2009.

BUSTAMANTE, M. M.; NARDOTO, G. B.; PINTO, A. S.; RESENDE, J. C.; TAKAHASHI, F. S.; VIEIRA, L. C. Potential impacts of climate change on biogeochemical functioning of Cerrado ecosystems. **Braz J Biol**, v. 72, n. 3 Suppl, p. 655-671, 2012.

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

CASTRO, A. P.; QUIRINO, B. F.; PAPPAS, G., JR.; KUROKAWA, A. S.; NETO, E. L.; KRUGER, R. H. Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture fields. **Arch Microbiol**, v. 190, n. 2, p. 129-139, 2008.

CASTRO, A. P.; ARAUJO, S. D., JR.; REIS, A. M.; MOURA, R. L.; FRANCINI-FILHO, R. B.; PAPPAS, G., JR.; RODRIGUES, T. B.; THOMPSON, F. L.; KRUGER, R. H. Bacterial community associated with healthy and diseased reef coral *Mussismilia hispida* from eastern Brazil. **Microb Ecol**, v. 59, n. 4, p. 658-667, 2010.

- CASTRO, A. P.; QUIRINO, B. F.; ALLEN, H.; WILLIAMSON, L. L.; HANDELSMAN, J.; KRUGER, R. H. Construction and validation of two metagenomic DNA libraries from Cerrado soil with high clay content. **Biotechnol Lett**, v. 33, n. 11, p. 2169-2175, 2011.
- CATAO, E.; CASTRO, A. P.; BARRETO, C. C.; KRUGER, R. H.; KYAW, C. M. Diversity of Archaea in Brazilian savanna soils. **Arch Microbiol**, 2013.
- CHAN, Y.; VAN NOSTRAND, J. D.; ZHOU, J.; POINTING, S. B.; FARRELL, R. L. Functional ecology of an Antarctic Dry Valley. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 22, p. 8990-8995, 2013.
- CHOU, H. H.; HOLMES, M. H. DNA sequence quality trimming and vector removal. **Bioinformatics**, v. 17, n. 12, p. 1093-1104, 2001.
- CHU, H.; FIERER, N.; LAUBER, C. L.; CAPORASO, J. G.; KNIGHT, R.; GROGAN, P. Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. **Environ Microbiol**, v. 12, n. 11, p. 2998–3006, 2010.
- CHU, H.; NEUFELD, J. D.; WALKER, V. K.; GROGAN, P. The influence of vegetation type on the dominant soil bacteria, archaea, and fungi in a low arctic tundra landscape. **Soil Biol Biochem**, v. 75, n., p. 1756–1765, 2011.
- CHUNG, H.; ZAK, D. R.; REICH, P. B.; ELLSWORTH, D. S. Plant species richness, elevated CO₂, and atmospheric nitrogen deposition alter soil microbial community composition and function. **Global Change Biol** v. 13, n., p. 980–989, 2007.
- CLARKE, K. R. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. **Australian Journal of Ecology**, v. 18, n., p. 117-143, 1993.
- CLEVELAND, C. C.; TOWNSEND, A. R.; TAYLOR, P.; ALVAREZ-CLARE, S.; BUSTAMANTE, M. M.; CHUYONG, G.; DOBROWSKI, S. Z.; GRIERSON, P.; HARMS, K. E.; HOULTON, B. Z.; MARKLEIN, A.; PARTON, W.; PORDER, S.; REED, S. C.; SIERRA, C. A.; SILVER, W. L.; TANNER, E. V.; WIEDER, W. R. Relationships among net primary productivity, nutrients and climate in tropical rain forest: a pan-tropical analysis. **Ecol Lett**, v. 14, n. 9, p. 939-947, 2011.
- COLE, J. R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R. J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A. S.; MCGARRELL, D. M.; MARSH, T.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. suppl 1, p. D141-D145, 2009.
- 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. **Genet Mol Res**, v. 9, n. 1, p. 514-523, 2010.
- CREGGER, M. A.; SCHADT, C. W.; MCDOWELL, N. G.; POCKMAN, W. T.; CLASSEN, A. T. Response of the soil microbial community to changes in precipitation in a semiarid ecosystem. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, n. 24, p. 8587-8594, 2012.
- CUNHA, I. S.; BARRETO, C. C.; COSTA, O. Y.; BOMFIM, M. A.; CASTRO, A. P.; KRUGER, R. H.; QUIRINO, B. F. Bacteria and Archaea community structure in the

rumen microbiome of goats (*Capra hircus*) from the semiarid region of Brazil. **Anaerobe**, v. 17, n. 3, p. 118-124, 2011.

CURY, J. C.; ARAUJO, F. V.; COELHO-SOUZA, S. A.; PEIXOTO, R. S.; OLIVEIRA, J. A.; SANTOS, H. F.; DAVILA, A. M.; ROSADO, A. S. Microbial diversity of a Brazilian coastal region influenced by an upwelling system and anthropogenic activity. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p. e16553, 2011.

DANIEL, R. The Metagenomics of soil. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n., p. 470-478, 2005.

DAWSON, S.; DELONG, E. F.; PACE, N. R. Phylogenetic and ecological perspectives on uncultured Crenarchaeota and Korarchaeota. **In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E, (eds) The prokaryotes, vol 3, 3rd edn. Springer, New York**, v., n., p., 2006.

DE FILIPPO, C.; RAMAZZOTTI, M.; FONTANA, P.; CAVALIERI, D. Bioinformatic approaches for functional annotation and pathway inference in metagenomics data. **Brief Bioinform**, v. 13, n. 6, p. 696-710, 2012.

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. **ISME J**, v. 6, n. 9, p. 1677-1687, 2012.

DESAI, N.; ANTONOPOULOS, D.; GILBERT, J. A.; GLASS, E. M.; MEYER, F. From genomics to metagenomics. **Curr Opin Biotechnol**, v. 23, n. 1, p. 72-76, 2012.

DEWAR, R. C.; CANNELL, M. G. Carbon sequestration in the trees, products and soils of forest plantations: an analysis using UK examples. **Tree Physiol**, v. 11, n. 1, p. 49-71, 1992.

DINSDALE, E. A.; EDWARDS, R. A.; HALL, D.; ANGLY, F.; BREITBART, M.; BRULC, J. M.; FURLAN, M.; DESNUES, C.; HAYNES, M.; LI, L.; MCDANIEL, L.; MORAN, M. A.; NELSON, K. E.; NILSSON, C.; OLSON, R.; PAUL, J.; BRITO, B. R.; RUAN, Y.; SWAN, B. K.; STEVENS, R.; VALENTINE, D. L.; THURBER, R. V.; WEGLEY, L.; WHITE, B. A.; ROHWER, F. Functional metagenomic profiling of nine biomes. **Nature**, v. 452, n. 7187, p. 629-632, 2008.

DUMBRELL, A. J.; ASHTON, P. D.; AZIZ, N.; FENG, G.; NELSON, M.; DYTHAM, C.; FITTER, A. H.; HELGASON, T. Distinct seasonal assemblages of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by massively parallel pyrosequencing. **New Phytol**, v. 190, n. 3, p. 794-804, 2011.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2460-2461, 2010.

EDGAR, R. C.; HAAS, B. J.; CLEMENTE, J. C.; QUINCE, C.; KNIGHT, R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, v. 27, n. 16, p. 2194-2200, 2011.

EDWARDS, R. A.; RODRIGUEZ-BRITO, B.; WEGLEY, L.; HAYNES, M.; BREITBART, M.; PETERSON, D. M.; SAAR, M. O.; ALEXANDER, S.; ALEXANDER, E. C., JR.; ROHWER, F. Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. **BMC Genomics**, v. 7, n., p. 57, 2006.

EITEN, G. Vegetação do Cerrado. In: Novaes-Pinto, M. (Ed.). **Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, p.17-73, 1994,

EMBRAPA- Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de métodos de análise de solo/ Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **2. ed. ver. Atual- Rio de Janeiro**, p.212, 1997.

FAORO, H.; ALVES, A. C.; SOUZA, E. M.; RIGO, L. U.; CRUZ, L. M.; AL-JANABI, S. M.; MONTEIRO, R. A.; BAURA, V. A.; PEDROSA, F. O. Influence of soil characteristics on the diversity of bacteria in the Southern Brazilian Atlantic Forest. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, n. 14, p. 4744-4749, 2010.

FAORO, H.; GLOGAUER, A.; COUTO, G. H.; DE SOUZA, E. M.; RIGO, L. U.; CRUZ, L. M.; MONTEIRO, R. A.; DE OLIVEIRA PEDROSA, F. Characterization of a new Acidobacteria-derived moderately thermostable lipase from a Brazilian Atlantic Forest soil metagenome. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 81, n. 2, p. 386-394, 2012.

FELFILI, J. M.; JÚNIOR, M. C. D. S.; SEVILHA, A. C.; FAGG, C. W.; WALTER, B. M. T.; NOGUEIRA, P. E.; REZENDE, A. V. Diversity, floristic and structural patterns of cerrado vegetation in Central Brazil. **Plant Ecology**, v. 175, n., p. 37–46, 2004.

FIERER, N.; BREITBART, M.; NULTON, J.; SALAMON, P.; LOZUPONE, C.; JONES, R.; ROBESON, M.; EDWARDS, R. A.; FELTS, B.; RAYHAWK, S.; KNIGHT, R.; ROHWER, F.; JACKSON, R. B. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 21, p. 7059-7066, 2007.

FIERER, N.; STRICKLAND, M. S.; LIPTZIN, D.; BRADFORD, M. A.; CLEVELAND, C. C. Global patterns in belowground communities. **Ecol Lett**, v. 12, n. 11, p. 1238-1249, 2009.

FIERER, N.; LAUBER, C. L.; RAMIREZ, K. S.; ZANEVELD, J.; BRADFORD, M. A.; KNIGHT, R. Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. **ISME J**, v. 6, n. 5, p. 1007-1017, 2011.

FIERER, N.; LEFF, J. W.; ADAMS, B. J.; NIELSEN, U. N.; BATES, S. T.; LAUBER, C. L.; OWENS, S.; GILBERT, J. A.; WALL, D. H.; CAPORASO, J. G. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 52, p. 21390-21395, 2012.

FONTES, M. L.; SUZUKI, M. T.; COTTRELL, M. T.; ABREU, P. C. Primary production in a subtropical stratified coastal lagoon--contribution of anoxygenic phototrophic bacteria. **Microb Ecol**, v. 61, n. 1, p. 223-237, 2010.

FREDRICKSON, J. K.; LI, S. M.; GAIDAMAKOVA, E. K.; MATROSOVA, V. Y.; ZHAI, M.; SULLOWAY, H. M.; SCHOLTEN, J. C.; BROWN, M. G.; BALKWILL, D. L.; DALY, M. J. Protein oxidation: key to bacterial desiccation resistance? **ISME J**, v. 2, n. 4, p. 393-403, 2008.

- GILBERT, J. A.; MEYER, F.; BAILEY, M. J. The future of microbial metagenomics (or is ignorance bliss?). **ISME J**, v. 5, n. 5, p. 777-779, 2011.
- GIONGO, A.; CRABB, D. B.; DAVIS-RICHARDSON, A. G.; CHAULIAC, D.; MOBBERLEY, J. M.; GANO, K. A.; MUKHERJEE, N.; CASELLA, G.; ROESCH, L. F.; WALTERS, B.; RIVA, A.; KING, G.; TRIPLETT, E. W. PANGEA: pipeline for analysis of next generation amplicons. **ISME J**, v. 4, n. 7, p. 852-861, 2010.
- GOEDERT, W. J. Solos dos Cerrados. . **Ed. Nobel, São Paulo e EMBRAPA, CPAC, Brasília.**, v., n., p., 1985.
- GOMEZ-ALVAREZ, V.; TEAL, T. K.; SCHMIDT, T. M. Systematic artifacts in metagenomes from complex microbial communities. **ISME J**, v. 3, n. 11, p. 1314-1317, 2009.
- GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T. Ecology of actinomycetes. **Annu Rev Microbiol**, v. 37, n., p. 189-216, 1983.
- GOYA, R.; IRMTRAUD, M. M.; MARRA, M. A. Applications of High-Throughput Sequencing **Bioinformatics for High Throughput Sequencing**, © Springer Science+Business Media, LLC v. Chapter 3, n., p. 27-53, 2012.
- GRANDY, A. S.; NEFF, J. C. Molecular C dynamics downstream: the biochemical decomposition sequence and its impact on soil organic matter structure and function. **Sci Total Environ**, v. 404, n. 2-3, p. 297-307, 2008.
- GROFFMAN, P. M.; BOHLEN, P. J. Soil and sediment biodiversity: cross-system comparisons and large scale effects. **BioScience**, v. 49, n., p. 139–148, 1999.
- GROSSMAN, J. M.; O'NEILL, B. E.; LIANG, B.; LEHMANN, J.; THIES, J. E. Amazonian Anthrosols support similar microbial communities that differ distinctly from those extant in adjacent, unmodified soils of the same mineralogy. **Microb Ecol**, v. 60, n. 1, p. 192-205, 2010.
- HAAS, B. J.; GEVERS, D.; EARL, A. M.; FELDGARDEN, M.; WARD, D. V.; GIANNOUKOS, G.; CIULLA, D.; TABBAA, D.; HIGHLANDER, S. K.; SODERGREN, E.; METHE, B.; DESANTIS, T. Z.; PETROSINO, J. F.; KNIGHT, R.; BIRREN, B. W. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. **Genome Res**, v. 21, n. 3, p. 494-504, 2011.
- HANNULA, S. E.; DE BOER, W.; VAN VEEN, J. A. In situ dynamics of soil fungal communities under different genotypes of potato, including a genetically modified cultivar. **Soil Biol Biochem**, v. 42, n., p. 2211–2223, 2010.
- HARIDASAN, M. Solos do Distrito Federal. In: Novaes-Pinto, M. (Ed.). **Cerrado: Caracterização, ocupação e perspectivas - O caso do Distrito Federal**. Brasília: Editora Universidade de Brasília/SEMATEC, 1994, p.321-344.
- HARRIS, R. F. Effect of water potential on microbial growth and activity. In: **Parr JF, Gardner WR, Elliott LF (eds) Water potential relations in soil microbiology**. Soil Science Society of America, Madison, v., n., p. 23–95, 1981.

- HASHIMOTO, S. A new estimation of global soil greenhouse gas fluxes using a simple data-oriented model. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e41962, 2012.
- HAWKSWORTH, D. L. Global species numbers of fungi: are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate? **Biodivers Conserv**, v. 21, n., p. 2425-2433, 2012.
- HE, Z.; PICENO, Y.; DENG, Y.; XU, M.; LU, Z.; DESANTIS, T.; ANDERSEN, G.; HOBBIE, S. E.; REICH, P. B.; ZHOU, J. The phylogenetic composition and structure of soil microbial communities shifts in response to elevated carbon dioxide. **ISME J**, v. 6, n. 2, p. 259-272, 2012.
- HUGHES, J. B.; HELLMANN, J. J.; RICKETTS, T. H.; BOHANNAN, B. J. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, n. 10, p. 4399-4406, 2001.
- JANSSEN, P. H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, n. 3, p. 1719-1728, 2006.
- JESUS, E. D.; MARSH, T. L.; TIEDJE, J. M.; MOREIRA, F. M. D. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **ISME J**, v. 3, n., p. 1004–1011, 2009.
- JURGENS, G.; LINDSTROM, K.; SAANO, A. Novel group within the kingdom Crenarchaeota from boreal forest soil. **Appl Environ Microbiol**, v. 63, n. 2, p. 803-805, 1997.
- KAN, J.; CLINGENPEEL, S.; MACUR, R. E.; INSKEEP, W. P.; LOVALVO, D.; VARLEY, J.; GORBY, Y.; MCDERMOTT, T. R.; NEALSON, K. Archaea in Yellowstone Lake. **ISME J**, v. 5, n. 11, p. 1784-1795, 2011.
- KIEFT, T. L.; SOROKER, E.; FIRESTONE, M. K. Microbial biomass response to a rapid increase in water potential when dry soil is wetted. **Soil Biol Biochem**, v. 19, n., p. 119–126, 1987.
- KLAPPENBACH, J. A.; DUNBAR, J. M.; SCHMIDT, T. M. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, n. 4, p. 1328-1333, 2000.
- KNAPP, A. K.; BEIBER, C.; BRISKE, D. D.; CLASSEN, A. T.; LUO, Y.; REICHSTEIN, M.; SMITH, M. D.; SMITH, S. D.; BELL, J. E.; FAY, P. A.; HEISLER, J. L.; LEAVITT, S. W.; SHERRY, R.; SMITH, B.; WENG, E. Consequences of More Extreme Precipitation Regimes for Terrestrial Ecosystems. **BioScience**, v. 58 n., p., 2008.
- KOIDE, R. T.; SHUMWAY, D. L.; XU, B.; SHARDA, J. N. On temporal partitioning of a community of ectomycorrhizal fungi. **New Phytol**, v. 174, n. 2, p. 420-429, 2007.
- KOWALCHUK, G. A.; BUMA, D. S.; DE BOER, W.; KLINKHAMER, P. G.; VAN VEEN, J. A. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 81, n. 1-4, p. 509-520, 2002.

KUCZYNSKI, J.; LIU, Z.; LOZUPONE, C.; MCDONALD, D.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Microbial community resemblance methods differ in their ability to detect biologically relevant patterns. **Nat Methods**, v. 7, n. 10, p. 813-819, 2010.

KUNIN, V.; ENGELBREKTSON, A.; OCHMAN, H.; HUGENHOLTZ, P. Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. **Environ Microbiol**, v. 12, n. 1, p. 118-123, 2010.

LADD, J. N.; FOSTER, R. C.; NANNIPIERI, P.; OADES, J. M. Soil structure and biological activity v. Vol. 9, n. In: G. Stotzky and J.-M. Bollag (eds) *Soil Biochemistry*, Marcel Dekker, New York., p. 23–78, 1996.

LAUBER, C. L.; HAMADY, M.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 15, p. 5111-5120, 2009.

LE CALVEZ, T.; BURGAUD, G.; MAHE, S.; BARBIER, G.; VANDENKOORNHUYSE, P. Fungal diversity in deep-sea hydrothermal ecosystems. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, n. 20, p. 6415-6421, 2009.

LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. *Numerical Ecology* 2nd edn. **Elsevier**, v. Amsterdam, The Netherlands.,1998.

LEININGER, S.; URICH, T.; SCHLOTTER, M.; SCHWARK, L.; QI, J.; NICOL, G. W.; PROSSER, J. I.; SCHUSTER, S. C.; SCHLEPER, C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. **Nature**, v. 442, n. 7104, p. 806-809, 2006.

LENNON, J. T.; JONES, S. E. Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 2, p. 119-130, 2011.

LENTEDNU, G.; ZINGER, L.; MANEL, S.; COISSAC, E.; CHOLER, P.; GEREMIA, R. A.; MELODELIMA, C. Assessment of soil fungal diversity in different alpine tundra habitats by means of pyrosequencing. **Fungal Divers** v. 49 n., p. 113–123, 2011.

LINS-DE-BARROS, M. M.; VIEIRA, R. P.; CARDOSO, A. M.; MONTEIRO, V. A.; TURQUE, A. S.; SILVEIRA, C. B.; ALBANO, R. M.; CLEMENTINO, M. M.; MARTINS, O. B. Archaea, Bacteria, and algal plastids associated with the reef-building corals *Siderastrea stellata* and *Mussismilia hispida* from Buzios, South Atlantic Ocean, Brazil. **Microb Ecol**, v. 59, n. 3, p. 523-532, 2010.

LIU, Z.; DESANTIS, T. Z.; ANDERSEN, G. L.; KNIGHT, R. Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. **Nucleic Acids Res**, v. 36, n. 18, p. e120, 2008.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n., p. 8228–8235, 2005.

LUMINI, E.; ORGIAZZI, A.; BORRIELLO, R.; BONFANTE, P.; BIANCIOTTO, V. Disclosing arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach. **Environ Microbiol**, v. 12, n. 8, p. 2165-2179, 2010.

MAGURRAN, A. E. **Measuring biological diversity**. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd, 2004. 256 p.

MANZONI, S.; SCHIMEL, J. P.; PORPORATO, A. Responses of soil microbial communities to water stress: results from a meta-analysis. **Ecology**, v. 93, n. 4, p. 930-938, 2012.

MARGESIN, R.; JUD, M.; TSCHERKO, D.; SCHINNER, F. Microbial communities and activities in alpine and subalpine soils. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 67, n. 2, p. 208-218, 2009.

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.; 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**, v. 437, n. 7057, p. 376-380, 2005.

MARKOWITZ, V. M.; IVANOVA, N. N.; SZETO, E.; PALANIAPPAN, K.; CHU, K.; DALEVI, D.; CHEN, I. M.; GRECHKIN, Y.; DUBCHAK, I.; ANDERSON, I.; LYKIDIS, A.; MAVROMATIS, K.; HUGENHOLTZ, P.; KYRPIDES, N. C. IMG/M: a data management and analysis system for metagenomes. **Nucleic Acids Res**, v. 36, n. Database issue, p. D534-538, 2008.

MCGUIRE, K. L.; FIERER, N.; BATEMAN, C.; TRESEDER, K. K.; TURNER, B. L. Fungal community composition in neotropical rain forests: the influence of tree diversity and precipitation. **Microb Ecol**, v. 63, n. 4, p. 804-812, 2012.

MENDES, I. C.; FERNANDES, M. F.; CHAER, G. M.; REIS, F. B. Biological functioning of Brazilian Cerrado soils under different vegetation types. **Plant Soil**, v. Online First™, n., p. 1-13, 2012.

MENDES, L. W.; TAKETANI, R. G.; NAVARRETE, A. A.; TSAI, S. M. Shifts in phylogenetic diversity of archaeal communities in mangrove sediments at different sites and depths in southeastern Brazil. **Res Microbiol**, v. 163, n. 5, p. 366-377, 2012.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JUNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E.; FAGG, C. W. Flora vascular do bioma Cerrado - um checklist com 12356 espécies. In: Sano, S. M., Almeida, S. P., *et al* (Ed.). **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2008. v.2, p.423-1279.

MENEZES, C. B.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; MIQUELETTA, P. B.; PASSARINI, M. R.; SILVA, C. H.; JUSTO, M. R.; LEAL, R. R.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V. M.; BERLINCK, R. G.; SETTE, L. D. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of Sao Paulo state, Brazil. **Microbiol Res**, v. 165, n. 6, p. 466-482, 2009.

MENG, H.; LI, K.; NIE, M.; WAN, J. R.; QUAN, Z. X.; FANG, C. M.; CHEN, J. K.; GU, J. D.; LI, B. Responses of bacterial and fungal communities to an elevation gradient in a subtropical montane forest of China. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, n. 5, p. 2219-2230, 2013.

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., p. 386, 2008.

MILLARD, P.; SINGH, B. K. Does grassland vegetation drive soil microbial diversity? **Nutr Cycl Agroecosys**, v. 88, n., p. 147-158, 2010.

MITTERMEIER, R. A.; ROBLES-GIL, P.; HOFFMANN, M.; PILGRIM, J. D.; BROOKS, T. M.; MITTERMEIER, C. G.; LAMOREUX, J. L.; FONSECA, G. Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. CEMEX, Mexico City, 2004.

MONCHY, S.; SANCIU, G.; JOBARD, M.; RASCONI, S.; GERPHAGNON, M.; CHABE, M.; CIAN, A.; MELONI, D.; NIQUIL, N.; CHRISTAKI, U.; VISCOGLIOSI, E.; SIME-NGANDO, T. Exploring and quantifying fungal diversity in freshwater lake ecosystems using rDNA cloning/sequencing and SSU tag pyrosequencing. **Environ Microbiol**, v. 13, n. 6, p. 1433-1453, 2011.

MONTEIRO, J. M.; VOLLU, R. E.; COELHO, M. R.; ALVIANO, C. S.; BLANK, A. F.; SELDIN, L. Comparison of the bacterial community and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from different genotypes of *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty (vetiver) rhizospheres. **J Microbiol**, v. 47, n. 4, p. 363-370, 2009.

MONTOYA, J. M.; PIMM, S. L.; SOLE, R. V. Ecological networks and their fragility. **Nature**, v. 442, n. 7100, p. 259-264, 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do solo. . **Lavras: Editora UFLA.**, v., n., p. 729, 2006.

MUELLER, G. M.; SCHMIT, J. P.; LEACOCK, P. R.; BUYCK, B.; CIFUENTES, J.; DESJARDIN, D. E.; HALLING, R. E.; HJORTSTMAN, K.; ITURRIAGA, T.; LARSSON, K.; . Global diversity and distribution of macrofungi. **Biodiversity Conservation** v. 16, n., p. 37-48., 2007.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B. D.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n., p. 853-858, 2000.

NEMERGUT, D. R.; COSTELLO, E. K.; HAMADY, M.; LOZUPONE, C.; JIANG, L.; SCHMIDT, S. K.; FIERER, N.; TOWNSEND, A. R.; CLEVELAND, C. C.; STANISH, L.; KNIGHT, R. Global patterns in the biogeography of bacterial taxa. **Environmental Microbiology** v. 13 n., p. 135–144, 2011.

NICOL, G. W.; GLOVER, L. A.; PROSSER, J. I. Spatial analysis of archaeal community structure in grassland soil. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, n. 12, p. 7420-7429, 2003.

NIELSEN, U. N.; OSLER, G. H. R.; CAMPBELL, C. D.; BURSLEM, D. F. R. P.; VAN DER WAL, R. The influence of vegetation type, soil properties and precipitation on the composition of soil mite and microbial communities at the landscape scale. **J Biogeogr** v. 37, n., p. 1317–1328., 2010.

NIKLAUS, P. A.; ALPHEI, J.; KAMPICHLER, C.; KANDELER, E.; KORNER, C.; TSCHERKO, D.; WOHLFENDER, M. Interactive effects of plant species diversity and elevated CO₂ on soil biota and nutrient cycling. **Ecology**, v. 88, n. 12, p. 3153-3163, 2007.

NOLTE, V.; PANDEY, R. V.; JOST, S.; MEDINGER, R.; OTTENWALDER, B.; BOENIGK, J.; SCHLOTTERER, C. Contrasting seasonal niche separation between rare and abundant taxa conceals the extent of protist diversity. **Mol Ecol**, v. 19, n. 14, p. 2908-2915, 2010.

NUBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; KUHL, M.; MUYZER, G. Quantifying microbial diversity: morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. **Appl Environ Microbiol**, v. 65, n. 2, p. 422-430, 1999.

NUNOURA, T.; TAKAKI, Y.; KAKUTA, J.; NISHI, S.; SUGAHARA, J.; KAZAMA, H.; CHEE, G. J.; HATTORI, M.; KANAI, A.; ATOMI, H.; TAKAI, K.; TAKAMI, H. Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. **Nucleic Acids Res**, v. 39, n. 8, p. 3204-3223, 2011.

PACE, N. R. Microbial ecology and diversity. . **ASM News**, v. 65, n., p. 328–333., 1999.

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

PARKS, D. H.; BEIKO, R. G. Measures of phylogenetic differentiation provide robust and complementary insights into microbial communities. **ISME J**, v. 7, n. 1, p. 173-183, 2012.

PAZINATO, J.; PAULO, E.; MENDES, L. W.; VAZOLLER, R.; TSAI, S. M. Molecular Characterization of the Archaeal Community in an Amazonian Wetland Soil and Culture-Dependent Isolation of Methanogenic Archaea. **Diversity**, v. 2, n., p. 1026-1010, 2010.

PEIXOTO, R. S.; VAN ELSA, J. D.; ROSADO, A. S. Soil aggregation and bacterial community structure as affected by tillage and cover cropping in the Brazilian Cerrados. **Soil & Tillage Research**, v. 90, n., p. 16-28, 2006.

- PEIXOTO, R. S.; CHAER, G. M.; FRANCO, N.; JUNIOR, F. B. R.; MENDES, I. C.; ROSADO, A. S. A decade of land use contributes to changes in the chemistry, biochemistry and bacterial community structures of soils in the Cerrado. **Anton Leeuw Int J G**, v. 98, n. 3, p. 403-413, 2010.
- PEREIRA, M. C.; DIAS, A. C.; VAN ELSAS, J. D.; SALLES, J. F. Spatial and temporal variation of archaeal, bacterial and fungal communities in agricultural soils. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e51554, 2012.
- PIRES, E. C. C. Riqueza Do Domínio Archaea No Solo Do Bioma Cerrado. **Dissertação de mestrado, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.**, v., n., p., 2012.
- PLACELLA, S. A.; BRODIE, E. L.; FIRESTONE, M. K. Rainfall-induced carbon dioxide pulses result from sequential resuscitation of phylogenetically clustered microbial groups. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 27, p. 10931-10936, 2012.
- PONTES, D. S.; LIMA-BITTENCOURT, C. I.; CHARTONE-SOUZA, E.; AMARAL NASCIMENTO, A. M. Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 34, n. 7, p. 463-473, 2007.
- POWELL, J. R.; GULDEN, R. H.; HART, M. M.; CAMPBELL, R. G.; LEVY-BOOTH, D. J.; DUNFIELD, K. E.; PAULS, K. P.; SWANTON, C. J.; TREVORS, J. T.; KLIRONOMOS, J. N. Mycorrhizal and rhizobial colonization of genetically modified and conventional soybeans. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 13, p. 4365-4367, 2007.
- PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments. **PLoS One**, v. 5, n. 3, p. e9490, 2010.
- PROSSER, J. I. Replicate or lie. **Environ Microbiol**, v. 12, n. 7, p. 1806-1810, 2010.
- 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.; LE PASLIER, D.; LINNEBERG, A.; NIELSEN, H. B.; PELLETIER, E.; RENAULT, P.; SICHERITZ-PONTEN, T.; TURNER, K.; ZHU, H.; YU, C.; JIAN, M.; ZHOU, Y.; LI, Y.; ZHANG, X.; QIN, N.; YANG, H.; WANG, J.; BRUNAK, S.; DORE, J.; GUARNER, F.; KRISTIANSEN, K.; PEDERSEN, O.; PARKHILL, J.; WEISSENBACH, J.; BORK, P.; EHRLICH, S. D. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v. 464, n. 7285, p. 59-65, 2010.
- QIU, X.; WU, L.; HUANG, H.; MCDONEL, P. E.; PALUMBO, A. V.; TIEDJE, J. M.; ZHOU, J. Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, n. 2, p. 880-887, 2001.
- QUINCE, C.; LANZÉN, A.; CURTIS, T. P.; DAVENPORT, R. J.; HALL, N.; HEAD, I. M.; READ, L. F.; SLOAN, W. T. Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. **Nat Methods**, v. 6, n. 9, p. 639-644, 2009.
- QUINCE, C.; LANZEN, A.; DAVENPORT, R. J.; TURNBAUGH, P. J. Removing noise from pyrosequenced amplicons. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n., p. 38, 2011.

- QUIRINO, B. F.; PAPPAS, G. J.; TAGLIAFERRO, A. C.; COLLEVATTI, R. G.; NETO, E. L.; DA SILVA, M. R.; BUSTAMANTE, M. M.; KRUGER, R. H. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. **Microbiol Res**, v. 164, n., p. 59-70, 2009.
- RAMPELOTTO, P. H.; FERREIRA, A. S.; BARBOZA, A. M.; ROESCH, L. W. Changes in diversity, abundance, and structure of soil bacterial communities in Brazilian savanna under different land use systems. **Microb Ecol**, v., n., p., 2013.
- RANJARD, L.; POLY, F.; COMBRISSE, J.; RICHAUME, A.; GOURBIERE, F.; THIOULOUSE, J.; NAZARET, S. Heterogeneous Cell Density and Genetic Structure of Bacterial Pools Associated with Various Soil Microenvironments as Determined by Enumeration and DNA Fingerprinting Approach (RISA). **Microb Ecol**, v. 39, n. 4, p. 263-272, 2000.
- REEDER, J.; KNIGHT, R. Rapidly denoising pyrosequencing amplicon reads by exploiting rank-abundance distributions. **Nat Methods**, v. 7, n. 9, p. 668-669, 2010.
- REIS, A. M.; ARAUJO, S. D., JR.; MOURA, R. L.; FRANCINI-FILHO, R. B.; PAPPAS, G., JR.; COELHO, A. M.; KRUGER, R. H.; THOMPSON, F. L. Bacterial diversity associated with the Brazilian endemic reef coral *Mussismilia braziliensis*. **J Appl Microbiol**, v. 106, n. 4, p. 1378-1387, 2009.
- RESENDE, J.; MARKEWITZ, D.; KLINK, C.; BUSTAMANTE, M.; DAVIDSON, E. Phosphorus cycling in a small watershed in the Brazilian Cerrado: impacts of frequent burning. **Biogeochemistry**, 2010.
- RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: Sano, S. M. e Almeida, S. P. (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina-DF: EMBRAPA-CPAC, 1998, p.89-166.
- RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitosionomias do Bioma Cerrado. In: Sano, S. M. A., S. P. (Ed.). **Cerrado: ecologia e flora**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008, p.89-166.
- ROESCH, L. F. W.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M.; TRIPLETT, E. W. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. **Plant Soil** v. 302, n., p. 91-104, 2008.
- ROMANI, A. M.; FISCHER, H.; MILLE-LINDBLOM, C.; TRANVIK, L. J. Interactions of bacteria and fungi on decomposing litter: differential extracellular enzyme activities. **Ecology**, v. 87, n. 10, p. 2559-2569, 2006.
- ROUSK, J.; DEMOLING, L. A.; BAHR, A.; BAATH, E. Examining the fungal and bacterial niche overlap using selective inhibitors in soil. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 63, n. 3, p. 350-358, 2008.
- ROUSK, J.; BAATH, E.; BROOKES, P. C.; LAUBER, C. L.; LOZUPONE, C.; CAPORASO, J. G.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **ISME J**, v. 4, n. 10, p. 1340-1351, 2010.

- SÁINZ, M. J.; GONZÁLEZ-PENALTA, B.; VILARIÑO, A. Effects of hexachlorocyclohexane on rhizosphere fungal propagules and root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in *Plantago lanceolata*. v. **Eur J Soil Sci** n. 57, p. 83–90, 2006.
- SANO, E. E.; ROSA, R.; BRITO, J. L.; FERREIRA, L. G. Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. **Environ Monit Assess**, v. 166, n. 1-4, p. 113-124, 2010.
- SANTANA, P. B.; JUNIOR, R. G.; ALVES, C. N.; SILVA, J. L.; MCCULLOCH, J. A.; SCHNEIDER, M. P.; DA COSTA DA SILVA, A. Diversity and three-dimensional structures of the alpha Mcr of the methanogenic Archaea from the anoxic region of Tucuruí Lake, in Eastern Brazilian Amazonia. **Genet Mol Biol**, v. 35, n. 1, p. 126-133, 2012.
- SCHLOSS, P. The effects of alignment quality, distance calculation method, sequence filtering, and region on the analysis of 16S rRNA gene-based studies. **PLoS Comput Biol**, v. 6, n. 7, p. 1-16, 2010.
- SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D. H.; ROBINSON, C. J.; SAHL, J. W.; STRES, B.; THALLINGER, G. G.; VAN HORN, D. J.; WEBER, C. F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009.
- SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L. Assessing and improving methods used in operational taxonomic unit-based approaches for 16S rRNA gene sequence analysis. **Appl Environ Microbiol**, v. 77, n. 10, p. 3219-3226, 2011a.
- SCHLOSS, P. D.; GEVERS, D.; WESTCOTT, S. L. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e27310, 2011b.
- SERGEANT, M. J.; CONSTANTINIDOU, C.; COGAN, T.; PENN, C. W.; PALLEN, M. J. High-throughput sequencing of 16S rRNA gene amplicons: effects of extraction procedure, primer length and annealing temperature. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e38094, 2012.
- SESHADRI, R.; KRAVITZ, S. A.; SMARR, L.; GILNA, P.; FRAZIER, M. CAMERA: a community resource for metagenomics. **PLoS Biol**, v. 5, n. 3, p. e75, 2007.
- SESSITSCH, A.; WEILHARTER, A.; GERZABEK, M. H.; KIRCHMANN, H.; KANDELER, E. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, n. 9, p. 4215-4224, 2001.
- SHARIPOVA, M. R.; BALABAN, N. P.; GABDRAKHMANOVA, L. A.; SHILOVA, M. A.; KADYROVA IU, M.; RUDENSKAIA, G. N.; LESHCHINSKAIA, I. B. Hydrolytic enzymes and spore formation in *Bacillus intermedius*. **Microbiologia**, v. 71, n. 4, p. 494-499, 2002.

- SHAW, A. K.; HALPERN, A. L.; BEESON, K.; TRAN, B.; VENTER, J. C.; MARTINY, J. B. It's all relative: ranking the diversity of aquatic bacterial communities. **Environ Microbiol**, v. 10, n. 9, p. 2200-2210, 2008.
- SHEIK, C. S.; BEASLEY, W. H.; ELSHAHED, M. S.; ZHOU, X.; LUO, Y.; KRUMHOLZ, L. R. Effect of warming and drought on grassland microbial communities. **ISME J**, v. 5, n. 10, p. 1692-1700, 2011.
- SILVA, M. R. S. Diversidade de comunidades bacterianas de solo de Cerrado em resposta a diferentes alterações dos ecossistemas. **Brasília: Universidade de Brasília. 154 p. Tese de Doutorado em Ecologia**, v., n., p., 2012.
- SINGH, B. K.; DAWSON, L. A.; MACDONALD, C. A.; BUCKLAND, S. M. Impact of biotic and abiotic interaction on soil microbial communities and functions: A field study. **Appl Soil Ecol** v. 41, n., p. 239–248., 2009.
- SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GLANDORF, B.; VAN ELSAS, J. D.; WERNARS, K. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. **Appl Environ Microbiol**, v. 65, n. 6, p. 2614-2621, 1999.
- SMOOT, M. E.; ONO, K.; RUSCHEINSKI, J.; WANG, P.; IDEKER, T. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization **Bioinformatics**, v. 27, n., p. 431-432, 2011.
- SONG, B.; NIU, S.; ZHANG, Z.; YANG, H.; LI, L.; WAN, S. Light and heavy fractions of soil organic matter in response to climate warming and increased precipitation in a temperate steppe. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33217, 2012.
- STANDING, D.; KILLHAM, K. The soil environment. In: Elsas, J. D. V., Jansson, J. K., *et al* (Ed.). **Modern Soil Microbiology**. Boca Raton: CRC Press, 2007. v.2, p.1-22.
- STEVEN, B.; GALLEGOS-GRAVES, L. V.; STARKENBURG, S. R.; CHAIN, P. S.; KUSKE, C. R. Targeted and shotgun metagenomic approaches provide different descriptions of dryland soil microbial communities in a manipulated field study. **Environ Microbiol Rep**, v. 4, n. 2, p. 248-256, 2012.
- SUGIYAMA, M.; SHIOGAMA, H.; EMORI, S. Precipitation extreme changes exceeding moisture content increases in MIROC and IPCC climate models. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 2, p. 571-575, 2010.
- SUZUKI, M. T.; GIOVANNONI, S. J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. **Appl Environ Microbiol**, v. 62, n. 2, p. 625-630, 1996.
- SZUKICS, U.; ABELL, G. C.; HODL, V.; MITTER, B.; SESSITSCH, A.; HACKL, E.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S. Nitrifiers and denitrifiers respond rapidly to changed moisture and increasing temperature in a pristine forest soil. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 72, n. 3, p. 395-406, 2010.
- SZUKICS, U.; HACKL, E.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S.; SESSITSCH, A. Rapid and dissimilar response of ammonia oxidizing archaea and bacteria to nitrogen

- and water amendment in two temperate forest soils. **Microbiol Res**, v. 167, n. 2, p. 103-109, 2012.
- TAKETANI, R. G.; TSAI, S. M. The influence of different land uses on the structure of archaeal communities in Amazonian anthrosols based on 16S rRNA and amoA genes. **Microb Ecol**, v. 59, n. 4, p. 734-743, 2010.
- TAMAMES, J.; ABELLAN, J. J.; PIGNATELLI, M.; CAMACHO, A.; MOYA, A. Environmental distribution of prokaryotic taxa. **BMC Microbiol**, v. 10, n., p. 85, 2010.
- TEDERSOO, L.; JAIRUS, T.; HORTON, B. M.; ABARENKOV, K.; SUVI, T.; SAAR, I.; KOLJALG, U. Strong host preference of ectomycorrhizal fungi in a Tasmanian wet sclerophyll forest as revealed by DNA barcoding and taxon-specific primers. **New Phytol**, v. 180, n. 2, p. 479-490, 2008.
- THOMPSON, C. C.; DA FONSECA, E. L.; VICENTE, A. C.; DE OLIVEIRA PEDROSA, F.; MALTEMPI DE SOUZA, E.; FAORO, H. Verrucomicrobia in Brazilian Atlantic forest soil. **Appl Environ Microbiol**, v. 77, n. 11, p. 3903-3904, 2011.
- THOMPSON, F. L.; BRUCE, T.; GONZALEZ, A.; CARDOSO, A.; CLEMENTINO, M.; COSTAGLIOLA, M.; HOZBOR, C.; OTERO, E.; PICCINI, C.; PERESSUTTI, S.; SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R.; SMITH, M.; TAKIYAMA, L. R.; VIEIRA, R.; PARANHOS, R.; ARTIGAS, L. F. Coastal bacterioplankton community diversity along a latitudinal gradient in Latin America by means of V6 tag pyrosequencing. **Arch Microbiol**, v. 193, n. 2, p. 105-114, 2010.
- THORN, G. The fungi in soil. . **Modern Soil Microbiology**, v. van Elsas JD, Trevors JT & Wellington EMH (Eds),. Marcel Decker, ISBN 978-0824794361, New York, USA, n., p. 63-127, 1997.
- TIEDJE, J. M.; CHO, J. C.; MURRAY, A.; TREVES, D.; XIA, B.; ZHOU, J. **Soil teeming with life: new frontiers for soil science.**: CAB International, 2001. 393-412 p. (Sustainable Management of Soil Organic Matter)
- TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Curr Opin Microbiol**, v. 5, n. 3, p. 240-245, 2002.
- TRAPPE, J. M.; CASTELLANO, M. A. New sequestrate Ascomycota and Basidiomycota covered by the Northwest Forest Plan. **Mycotaxon**, v. 75, n., p. 153-179, 2000.
- 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, n. 6978, p. 37-43, 2004.
- UROZ, S.; IOANNIDIS, P.; LENGELLE, J.; CEBRON, A.; MORIN, E.; BUEE, M.; MARTIN, F. Functional assays and metagenomic analyses reveals differences between the microbial communities inhabiting the soil horizons of a Norway spruce plantation. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e55929, 2013.

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

VARGAS, M. A.; HUNGRIA, M. Biologia dos solos dos Cerrados. **Planaltina: Embrapa- CPAC**, v., n., p. 524, 1997.

VENTER, J. C.; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J. F.; HALPERN, A. L.; RUSCH, D.; EISEN, J. A.; WU, D.; PAULSEN, I.; 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.; PFANNKUCH, C.; ROGERS, Y. H.; SMITH, H. O. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. **Science**, v. 304, n. 5667, p. 66-74, 2004.

WALLENSTEIN, M. D.; WEINTRAUB, M. N. Emerging tools for measuring and modeling the in situ activity of soil extracellular enzymes. **Soil Biol Biochem**, v. 40, n., p. 2098-2106, 2008.

WALLENSTEIN, M. D.; MCMAHON, S.; SCHIMEL, J. Bacterial and fungal community structure in Arctic tundra tussock and shrub soils. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 59, n., p. 428-435, 2007.

WANG, Q.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M.; COLE, J. R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 16, p. 5261-5267, 2007.

WARD, D. M. A natural species concept for prokaryotes. **Curr Opin Microbiol**, v. 1, n. 3, p. 271-277, 1998.

WHITE, J. R.; NAVLAKHA, S.; NAGARAJAN, N.; GHODSI, M. R.; KINGSFORD, C.; POP, M. Alignment and clustering of phylogenetic markers--implications for microbial diversity studies. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n., p. 152, 2010.

ZHOU, J.; XIA, B.; TREVES, D. S.; WU, L. Y.; MARSH, T. L.; O'NEILL, R. V.; PALUMBO, A. V.; TIEDJE, J. M. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 1, p. 326-334, 2002.

ZHOU, J.; DENG, Y.; LUO, F.; HE, Z.; TU, Q.; ZHI, X. Functional molecular ecological networks. **MBio**, v. 1, n. 4, p., 2010.

ZHOU, J.; DENG, Y.; LUO, F.; HE, Z.; YANG, Y. Phylogenetic molecular ecological network of soil microbial communities in response to elevated CO₂. **MBio**, v. 2, n. 4, p., 2011.

ZHU, W.; LOMSADZE, A.; BORODOVSKY, M. Ab initio gene identification in metagenomic sequences. **Nucleic Acids Res**, v. 38, n. 12, p. e132, 2010.