

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**DIVERSIDADE E COMPOSIÇÃO DE COMUNIDADES MICROBIANAS DE
SOLOS CONSTRUIDOS E DE SOLOS
SOB DIFERENTES MANEJOS AGRICOLAS**

**Patrícia Dörr de Quadros
(Tese de doutorado)**

Porto Alegre (RS) Brasil
Fevereiro de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**DIVERSIDADE E COMPOSIÇÃO DE COMUNIDADES MICROBIANAS DE
SOLOS CONSTRUIDOS E DE SOLOS
SOB DIFERENTES MANEJOS AGRICOLAS**

PATRICIA DÖRR DE QUADROS
Engenheira Agrônoma (UFRGS)
M. Sc. Ciência do Solo (UFRGS)

Tese apresentada como
um dos requisitos a obtenção do
Grau de Doutor em Ciência do Solo

Porto Alegre (RS) Brasil
Fevereiro de 2013

Eu dedico esta tese a minha filha amada, Camille.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Flávio Camargo pelo apoio, orientação, confiança e amizade.

Ao professor Eric Triplett pela oportunidade de trabalho na UF e orientação.

Ao prof. Cimélio Bayer pela disponibilidade e apoio durante a realização desta pesquisa.

À profa. Fátima Bento, pela amizade e encorajamento nos momentos difíceis.

Aos meus colegas de laboratório (UF) Kateryna, Jennie, Lexi, Raquel, Kaisa, Austin, Connor, Kevin e Ken, pela amizade e auxílio.

À minha amiga Ana Paula Luz pela amizade incondicional e auxílio na confecção do mapa de Candiota.

À todos os professores da UFRGS e UF que contribuíram para a minha formação.

À minha filha Camille, a qual é meu porto seguro, pela paciência, compreensão, companheirismo, ajuda, amor e alegrias.

Aos meus pais Nilse e Valdir pelo amor, carinho e estímulo.

Ao meu esposo Urubitan pelo carinho, compreensão, e encorajamento.

À Deus, por nunca me deixar perder a autoconfiança e por proporcionar tão rica experiência em minha vida.

Ao CNPq, ao Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo da UFRGS e ao Departamento de Microbiologia e Ciência Celular da UF pelo apoio financeiro.

Finalmente, agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram com esta pesquisa.

DIVERSIDADE E COMPOSIÇÃO DE COMUNIDADES MICROBIANAS DE SOLOS CONSTRUÍDOS E DE SOLOS SOB DIFERENTES MANEJOS AGRÍCOLAS^{1/}

Autor: Patrícia Dörr de Quadros

Orientador: Prof. Flávio Anastácio de Oliveira Camargo

Este estudo avaliou as comunidades microbianas do solo de dois ecossistemas para tentar encontrar particularidades e relações entre os microrganismos e as características do solo. Para isto, foram estudadas a diversidade, a abundância relativa e a composição microbiana do solo, utilizando-se sequenciamento Illumina do gene de rRNA 16S. Foram avaliadas 5 áreas de solo construído após a mineração de carvão, uma área de floresta e uma de campo-nativo em Candiota/RS, assim como uma área experimental agrícola sob diferentes sistemas de manejo e rotação de culturas, na Estação Experimental Agrônômica da UFRGS, em Eldorado do Sul/RS. Foi observada uma redução drástica na diversidade microbiana nos solos construídos comparando-se com solos de mata ou pastagem nativa. Os gêneros mais abundantes nos solos construídos foram *Thiobacillus*, *Sphingomonas*, *Novosphingobium*, *Acinetobacter*, e *Variovorax*. *Bradyrhizobium* foi o gênero mais abundante na área de floresta (6,4% do total de sequências) e *Bacillus* no site pastagens (4,8% do total de sequências). A diversidade microbiana nos solos construídos aumentou com o tempo, porém mesmo 20 anos após o processo de construção do solo, a diversidade, composição e abundância de microrganismos não retornou aos níveis originais, indicando que os solos construídos não foram recuperados adequadamente com o manejo de solo que foi aplicado. A comunidade microbiana dos solos agrícolas foi significativamente diferente comparando-se os sistemas de plantio convencional e de plantio direto. A diversidade microbiana foi maior nas parcelas em pousio ou onde foram cultivadas apenas gramíneas. O gênero mais abundante nos sistemas convencional e de plantio direto foi *Sphingomonas*. A bactéria anaeróbia *Clostridium* demonstrou ser dominante nos solos sob sistema de plantio direto e também onde foram cultivadas gramíneas. A população de *Burkholderia* foi dominante nos solos onde havia o cultivo da leguminosa Lablab. Os teores de P, Mg, carbono orgânico total, N total e N mineral foram significativamente maiores no sistema de plantio direto. Os resultados confirmaram que tanto o distúrbio causado pela mineração e construção do solo, quanto o manejo agrícola, interferem na diversidade, abundância e composição da comunidade microbiana. Este trabalho sugere a utilização do gênero *Bradyrhizobium* como um microrganismo “assinatura” em solos naturais, tais como florestas, pastagens ou em locais onde a agricultura cessou há várias décadas, assim como, o gênero *Clostridium* como um microrganismo “assinatura” do solo agrícola estudado sob plantio direto. A diversidade microbiana demonstrou neste estudo estar totalmente relacionada com a diversidade de plantas. Ambos os solos estudados demonstraram que as características do solo selecionam a comunidade microbiana.

1/ Tese de Doutorado em Ciência Do Solo. Programa de pós-graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. (112 p). Fevereiro, 2013.

DIVERSITY AND COMPOSITION OF SOIL MICROBIAL COMMUNITIES OF CONSTRUCTED SOILS, AND SOILS UNDER DIFFERENT AGRICULTURAL MANAGEMENT^{1/}

Author: Patrícia Dörr de Quadros

Adviser: Prof. Flávio Anastácio de Oliveira Camargo

This study examined the soil microbial communities from disturbed ecosystems in order to find particularities and relationships between microorganisms and their specific habitat's soil features. For this study, the soil features were analyzed, as well as the microbial communities relative abundance, diversity, and composition using Illumina high throughput sequencing of the 16S rRNA gene. Five post-mined sites under restoration, and two sites in an agricultural long-term experiment under different treatments were studied in South Brazil. A drastic decrease in microbial diversity was observed in the post-mined soils when compared to native forest or grassland regional soils. The most abundant genera in the constructed soils were *Thiobacillus*, *Sphingomonas*, *Novosphingobium*, *Acinetobacter*, and *Variovorax*. *Bradyrhizobium* was the most abundant genus in the forest soil (6.4% of total reads) and *Bacillus* in the grassland soil (4.8 % of total reads). The microbial diversity in constructed soil increased over time, but even twenty years after soil construction, the diversity, composition and abundance of microorganisms did not return to the original levels. The findings indicate that constructed soils were not recovered after the soil management applied. When compared in tillage and no-tillage systems, the microbial community in the studied agricultural sites greatly differed. The microbial diversity was higher in fallow plots, and where only grasses were grown. The most abundant genus in tilled and in no-tilled soil was *Sphingomonas*. The anaerobe bacteria *Clostridium* was very abundant in no-tilled soil, and also dominated the microbial population in soils where grasses were grown. *Burkholderia* dominated in plots containing the legume Lablab bean. The P, Mg, total organic carbon, total N, and mineral N levels were significantly higher in the no-tillage system. The results confirmed that those environmental disturbances from coal mining and agricultural, led to changes in the nutrition level, switching the abundance of some functional groups responsible for the degradation of compounds as well as for the biogeochemical cycle. Also, it was found that the genus *Bradyrhizobium* can be used as a signature microorganism in natural soils, such as forest and grassland or in sites where the agriculture had been stopped many decades ago. Similarly, *Clostridium* can be used as a signature in the studied no-tilled soils. The microbial diversity is higher in natural soils and is reduced in constructed soils after coal mining as well as soils under agricultural management. Both soil environments that were studied had a particular microbial community where a few genera dominates the niche. The environmental niche occupied by each group of microorganisms also had particular soil features that changed according to the soil management.

^{1/} Doctorate Thesis in Soil Science. Post-graduate program of Soil Science, Department of Agronomy, Federal University of Rio Grande do Sul. (112 p). February, 2013.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	0
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 A origem da vida e a evolução microbiana	2
2.2 A importância da ecologia microbiana do solo	4
2.3 Sucessão microbiana e estratégias de vida	5
2.4 Biodiversidade do solo	6
2.5 Perturbação antrópica através da agricultura e mineração.....	7
2.5.1 Agricultura e os microrganismos	8
2.5.2 Solos construídos após mineração de carvão	9
2.6 Matéria orgânica do solo, agricultura e microrganismos.....	11
2.7 Identificando os microrganismos do solo: técnicas disponíveis	12
3. CAPÍTULO I	17
ALTERAÇÕES NA DIVERSIDADE E COMPOSIÇÃO MICROBIANA EM SOLOS CONSTRUÍDOS APOS MINERAÇÃO DE CARVÃO.....	17
3.1 RESUMO.....	32
3.2 INTRODUÇÃO	19
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.3.1 Caracterização ambiental.....	21
3.3.2 Amostragem	21
3.3.3 Caracterização química e física	22
3.3.4 C-Biomassa microbiana, C-respiração e atividade enzimática do solo.....	23
3.3.5 Isolamento do DNA e PCR.....	24
3.3.6 Sequenciamento de alto rendimento Illumina do gene 16S rRNA	25
3.3.7 Análises estatísticas	26
3.4 RESULTADOS	28
3.4.1 Caracterização física e química do solo.....	28
3.4.2 Caracterização biológica do solo	29
3.4.3 Diversidade da comunidade microbiana	32
3.4.4 Composição da comunidade microbiana	34
3.5 DISCUSSÃO	40
3.6 CONCLUSÃO	44
4. CAPÍTULO II	45
*TILLAGE SYSTEM AND CROP ROTATION EFFECT ON SOIL MICROBIAL DIVERSITY AND COMPOSITION IN A SUBTROPICAL ACRISOL.....	45
4.1 ABSTRACT	46
4.2 INTRODUCTION.....	47
4.3 MATERIAL AND METHODS.....	49
4.3.1 Site description	49

4.3.2	Experimental design and treatments	49
4.3.3	Soil sampling	50
4.3.4	Chemical analysis	50
4.3.5	DNA extraction and PCR.....	50
4.3.5	Illumina high-throughput sequencing of 16S rRNA genes	51
4.3.6	Statistical analysis	51
4.4	RESULTS.....	53
4.5	DISCUSSION.....	63
4.6	CONCLUSIONS.....	68
4.7	REFERENCES.....	69
5.	CAPÍTULO III	75
	DIVERSIDADE E COMPOSIÇÃO MICROBIANA DE SOLO CULTIVADO COM DIFERENTES COMPOSIÇÕES DE GRAMÍNEAS E LEGUMINOSAS, SOB PLANTIO DIRETO	75
5.1	RESUMO	76
5.2	INTRODUÇÃO	77
5.3	MATERIAIS E MÉTODOS	79
5.3.1	Descrição do local de estudo	79
5.3.2	Desenho experimental, tratamentos e amostragem do solo.....	79
5.3.3	Análises químicas	80
5.3.4	Isolamento do DNA, PCR e sequenciamento	80
5.3.5	Análises estatísticas	80
5.4	RESULTADOS	81
5.5	DISCUSSÃO	93
5.5.1	Ocorrência e distribuição dos filos microbianos nos locais estudados	93
5.5.2	Ocorrência de Archaea no solo estudado	94
5.5.3	Os gêneros mais abundantes	95
5.6	CONCLUSÕES	98
6.	REFERÊNCIAS.....	99
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	110
8.	BIOGRAFIA.....	112

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

TABELA 3.1. Caracterização química e física dos solos construídos, e solos de floresta e campo nativo. Os números 3, 4, 5, 6, e 19, representam o numero de anos decorridos apos a construção dos solos.	29
TABELA 3.2. Correlação de Spearman entre índices de diversidade de Shannon (H), C-respiração, C-biomassa microbiana, atividade das as enzimas do solo desidrogenase e β -glicosidase, qCO ₂ e matéria orgânica (MO).	34

CAPITULO II

TABELA 3.3. Tabela mostrando os 20 gêneros mais abundantes de cada solo estudado.....	37
TABLE 4.1. Shannon diversity index to phylum, class, order, family, genus and species level, to each treatment. Numbers followed by the same letters on the columns, are not different by Tukey test, under p-value ≤ 0.01 . The numbers in bold, indicate the highest significant SDI values from each taxonomy level.	54
TABLE 4.2. Soil features measured on samples from the different treatments. Asterisk indicates significant difference between the correspondent treatments on the line, by qui-square test. Numbers followed by the same letter are not statistically different by Tukey test under p-value ≤ 0.01	55
TABLE 4.3. Spearman correlations (p-value ≤ 0.01) of the most correlated organisms with conventional tillage and no-tillage. The correlated microorganisms are within the colorful boxes. The names in gray color represent the correlated microorganism's related taxa.....	58
TABLE 4.4. Spearman correlations (p ≤ 0.01) of the most correlated organisms, with phosphorus (P), potassium (K), aluminum (Al), calcium (Ca) and magnesium (Mg). The correlated microorganisms are within the colorful boxes.	

The names in gray color represent the correlated
microorganism's related taxa..... 60

CAPITULO III

TABELA 5.1. Número de leituras (após limpeza) detectadas em cada sistema de rotação de culturas, para as bactérias e archaea.....	81
TABELA 5.2 Características do solo dos nove tratamentos.....	88

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- FIGURA 2.1. Esquema de “barcodes utilizados no sequenciamento Illumina. As sequências adaptadoras P5 e P7 permitem a ligação do fragmento amplificado na superfície da célula de fluxo Illumina. A sequência de 7 bases do barcode liga o oligonucleotideo reverso, permitindo que a sequência resultante possa ser combinada com a amostra original. SBS3 e SBS12 são sítios de ligação para a enzima polimerase durante o sequenciamento. Figura extraída da Revista Microbiology Journal (Characterization of the Relative Abundance of the Citrus Pathogen *Ca. Liberibacter Asiaticus* in the Microbiome of Its Insect Vector, *Diaphorina citri*, using High Throughput 16S rRNA Sequencing - Fagen et al., 2012)..... 13
- FIGURA 2.2. Ilustração do gene 16S rRNA mostrando as regiões conservadas (verde) e variáveis (cinza). As regiões conservadas do gene são idênticas para todas as bactérias, enquanto as regiões variáveis contêm sítios específicos únicos para cada bactéria. Figura extraída do site www.alimetrics.net. 15

CAPITULO I

- FIGURA 3.3. Vantagens e limitações da técnica de sequenciamento do DNA de uma célula, comparando-se ao sequenciamento metagenômico (Ramunas Stepanauskas, 2012)..... 16
- FIGURA 3.1. A área de coleta situada no município de Candiota, na CRM empresa de mineração (Rio Grande do Sul, Brasil). As áreas em rosa, representam solo descoberto; áreas de cor verde significam locais com vegetação (agricultura verde claro, e floresta nativa em verde escuro); a cor azul representa cursos d'água; e marrom significa áreas de campo..... 22

FIGURA 3.2. Esquema representando o progresso do fluxo de trabalho para obtenção das sequências e das unidades taxonômicas operacionais (UTOs) utilizadas na pesquisa.	25
FIGURA 3.3. Boxplot representando diferenças entre o C-respiração microbiana (3a), C-biomassa microbiana (3b), e coeficiente metabólico (3c) dos solos construídos com 3, 4, 5, 6, e 19 anos de idade, em comparação com áreas de floresta e campo nativo.....	31
FIGURA 3.4. Boxplot representando a concentração das enzimas β -glicosidase e desidrogenase (enzimas por grama de solo seco) dos solos construídos com 3, 4, 5, 6, e 19 anos de idade, em comparação com áreas de floresta e campo nativo.	32
FIGURA 3.5. Índice de diversidade de Shannon (H) para gênero em todos os solos estudados (a), relação entre H, MO (matéria orgânica) e pH (b).....	33
FIGURA 3.6. Filos detectados nos solos de 3 a 19 anos de idade após construção, em floresta controles e em campo nativo.	35
FIGURA 3.7. Análise dos componentes principais / PCA. Plotagem representando os solos com 3 a 19 anos após a construção, floresta e campo nativo, agrupados de acordo com as semelhanças entre as comunidades microbianas.	36
FIGURA 3.8. Diagrama de Venn que mostra a distribuição dos 20 principais gêneros mais abundantes de cada local - solos construídos, florestas e pastagens.....	38

CAPITULO II

FIGURE 4.1. Relative abundance of 16S rRNA gene (% of total reads) to phylum level, in an Acrisol under conventional tillage and no-tillage soil management. Asterisk expresses that the average differs statistically by Tukey test, at p-value ≤ 0.01 . The archaeal phyla are underlined.	56
FIGURE 4.2. Heatmap illustrating the 20 most abundant genera, in the three treatments. Different gradient color on the line represents significant difference (p-value ≤ 0.01) by Tukey test.	57
FIGURE 4.3. Principal component analysis (correlation-based PCA), between the 30 most abundant families (a), and genera (b). The treatments were used as supplementary variables.	61

CAPITULO III

FIGURA 5.1. Índice de diversidade de Shannon para cada tratamento.	82
---	----

FIGURA 5.2. Abundância relativa (média entre repetições) do gene 16S rRNA nos 18 filios mais abundantes nos solos estudados.	83
FIGURA 5.3 Correlação (Spearman) entre os filios, os tratamentos e as características do solo. A cor vermelha significa que o valor rho é significativamente positivo, e cor azul que o valor rho é significativamente negativo, utilizando $p \leq 0,001$	85
FIGURA 5.4. Abundância relativa (média entre repetições) do gene 16S rRNA nos 18 gêneros mais abundantes nos solos estudados.	86
FIGURA 5.5 Representação gráfica em três dimensões da abundância relativa dos oito gêneros mais abundantes em cada tratamento estudado.	87
FIGURA 5.6 Correlação (Spearman) entre os gêneros, os tratamentos e as características do solo. A cor vermelha significa que o valor rho é significativamente positivo, e cor azul que o valor rho é significativamente negativo, utilizando $p \leq 0,001$	89
FIGURA 5.7 Correlação (Spearman) entre as espécies, os tratamentos e as características do solo. A cor vermelha significa que o valor rho é significativamente positivo, e cor azul que o valor rho é significativamente negativo, utilizando $p \leq 0,001$	90
FIGURA 5.8 Análise de componentes principais (PCA) agrupando os tratamentos de acordo com a comunidade microbiana e características de solo de cada parcela.	92

1. INTRODUÇÃO

As comunidades microbianas do solo são dinâmicas e sensíveis a alterações ambientais como temperatura, concentração de gases, pH, relação C:N, umidade, etc. Processos antropogênicos de manejo do solo (agricultura, mineração, indústria, aterro sanitário, biorremediação, etc.) promovem alterações físicas e químicas, tendo um efeito imediato sobre os microrganismos do solo. O monitoramento da diversidade e composição dos microrganismos em solos modificados por atividades humanas, ajuda muito na padronização dos princípios da ecologia microbiana.

Nos últimos 10 anos, os bancos de sequências do gene 16S e de sequências genômicas têm aumentado substancialmente, assim como pesquisas revelando inúmeras relações entre os microrganismos e seu ambiente de origem. Atualizações nas áreas de biologia molecular e bioinformática são constantes, e a cada ano novos genomas procarióticos são depositados no NCBI. Solos de diferentes ambientes têm sido estudados, permitindo a previsão do comportamento de alguns grupos de microrganismos em relação a características de solo e clima. No entanto, várias questões surgem e a falta de consistência nos estudos sobre a composição e a diversidade microbiana têm impedido a compreensão completa da dinâmica dos microrganismos no solo. Assim, a relação entre os microrganismos e as mudanças ambientais que ocorrem na agricultura e na mineração, permanece indefinida. Adicionalmente, é comum encontrar estudos sobre ecologia microbiana em nível de filo, mas estudos comparando gêneros e espécies relacionados com a atividade agrícola ou mineração, são escassos.

Tendo em vista a compreensão das relações microrganismo e ambiente, surgem muitas questões: Como o preparo de solos agrícolas afeta a ecologia microbiana? Que grupos de microrganismos são influenciados pelos

sistemas de plantio direto ou convencional? Como a adubação influencia as comunidades microbianas nos solos agrícolas? Quanto tempo demora para uma comunidade microbiana voltar ao seu estado original após a construção de um solo que foi minerado? Quais são as semelhanças entre as comunidades microbianas de solos perturbados? Qual o efeito de plantas de cobertura como leguminosas e/ou gramíneas sobre os microrganismos do solo? Com base nestes questionamentos formulou-se uma hipótese. Atividades antropogênicas como agricultura e processos de mineração, alteram as características físicas e químicas do solo, assim como as comunidades microbianas. Isto acaba favorecendo alguns grupos de microrganismos em restrição a outros. Técnicas de biologia molecular, bioinformática e análises estatísticas como correlações ou análise de componentes principais, podem revelar quais os microrganismos são dominantes em cada sistema de manejo, incluindo alterações relacionadas com adubação e plantas de cobertura. Outra hipótese foi que quando o manejo dos solos construídos após mineração é realizado adequadamente, o solo pode readquirir estrutura física, química e biológica, assim como ter restaurada a diversidade de plantas e de organismos após certo período de tempo.

Esta pesquisa utilizou métodos de biologia molecular e análises de bioinformática, assim como análises tradicionais (química, física e biologia do solo), para avaliar a diversidade e composição microbiana em: a) áreas recuperadas após mineração de carvão em Candiota/RS; b) áreas de floresta e campo nativo de Candiota; c) um experimento agrícola de longo prazo (EALP) sob sistemas plantio direto e convencional em Eldorado do Sul / RS; d) um EALP sob plantio direto, com 9 diferentes combinações de plantas de cobertura, em Eldorado do Sul / RS.

Nos solos construídos foram analisadas áreas com cinco diferentes idades de recuperação, bem como solos de pastagem e floresta, para comparar sua diversidade, abundância e composição microbiana. Nos solos sob experimentação agrícola, buscou-se encontrar unidades taxonômicas microbianas específicas para cada tratamento e condição do solo. Neste trabalho, também buscou-se encontrar microrganismos que possam ser utilizados como indicadores biológicos de qualidade do solo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A origem da vida e a evolução microbiana

Por cerca de 3,8 bilhões de anos, a superfície da Terra tem sido palco para o fenômeno mais fascinante: a vida. Apesar de no início ter tido uma temperatura de centenas de graus Celsius e uma atmosfera composta por gases tóxicos, a Terra facilitou o desenvolvimento e evolução dos microrganismos. Isto levanta uma questão ainda não resolvida: Qual foi a primeira forma de vida a habitar o planeta Terra? Cientistas trabalhando com avançados programas de bioinformática estão tentando encontrar a resposta. Estudar a vida microbiana, no entanto, é uma tarefa complexa que envolve estudo multidisciplinar e utilização de análises de informática, biologia molecular, ecologia e fisiologia microbiana, biofísica, bioquímica, entre outros. A fim de entenderem as relações entre as áreas citadas, cientistas desenvolveram computadores inteligentes, processos biológicos sintéticos e redes neurais de informática, em uma tentativa de integrar conhecimento, intuição e ciência. Outra questão levantada nesta investigação é: Qual foi o primeiro habitat microbiano? Foi no gelo, na água, nas pedras, ou no solo? As respostas destas perguntas estão provavelmente relacionadas, e para respondermos, faz-se necessário o estudo das relações entre organismos e as características ambientais.

Microrganismos extremófilos são capazes de sobreviver em ambientes radioativos, assim como se adaptarem a com extremas variações químicas, físicas, geográficas e climáticas. Lord Kelvin em 1870 sugeriu que microrganismos poderiam ter chegado ao planeta Terra em um cometa ou meteoro vindo do espaço (teoria da panspermia). A teoria da panspermia propõe que microrganismos podem ter ficado presos nos escombros ejetados

para o espaço após as colisões entre planetas que abrigavam vida e, depois disso, os detritos poderiam ter caído na Terra, semeando a vida no nosso planeta. Outra teoria que está aumentando o interesse dos cientistas é a teoria necropanspermia, que investiga a possibilidade de que os microrganismos teriam atingido a Terra em um estado morto, mas que resíduos virais contidos nesses microrganismos ainda poderiam conter informação genética suficiente para gerar uma nova vida (ressurreição).

Desde o início do século 17, os microrganismos têm sido objeto de estudo. Willian Dallinger em 1900, cultivava protozoários em sua casa sob variações de temperatura a fim de observar o fenômeno da evolução. Na segunda metade do século 17, embora alguns biólogos evolucionistas preferiam estudar borboletas e insetos em vez de "coisas que não poderiam mesmo ver", outros pesquisadores como M. Delbruck, Luria S. e C. Woese, sentiram-se motivados a estudar microbiologia, genética, e mutações no DNA. No início dos anos 50 Francis Crick juntamente com James Watson, propuseram a estrutura de DNA em "dupla hélice". Também sugeriram que a informação genética flui do DNA para a proteína através do RNA. Com a confirmação destas teorias, numerosos estudos e avanços notáveis foram realizados no campo da microbiologia.

Os microrganismos são encontrados em toda a parte, e são mais abundantes na Terra do que as estrelas no céu. Membros dos domínios Bactéria e Archaea ajudam a regular a composição da atmosfera, reciclam os nutrientes no solo, decompõe poluentes, e por bilhões anos vem sofrendo mutações, o que levou a uma enorme diversidade genética e variação fenotípica (Sogin, 2006). Microrganismos possibilitam a vida na Terra. Em associação com plantas e animais, podem tanto causar como evitar doenças. O isolamento e cultivo de algumas espécies de microrganismos facilita muito o estudo de suas características bioquímicas e fisiológicas. Hoje em dia, não é possível o cultivo da maioria microrganismos, mas se pode sequenciar de seus genomas. Tecnologias avançadas, como sequenciamento de alto rendimento aliado a bioinformática tem gerado muitos terabites de dados em bancos de sequencias como o NCBI, RDP, Greengenes e outros. Para estudiosos de ecologia microbiana, o desafio agora é conectar esses dados de sequenciamento dos microrganismos, com as características ambientais de

origem e tentar encontrar relações que possam ser utilizadas na prática para o monitoramento e conservação do solo, água e ambiente. Prever o comportamento dos microrganismos em relação a mudanças ambientais ou vice-versa está longe de ser uma tarefa fácil, mas é um processo que está em andamento. A globalização permite que pesquisadores do mundo todo trabalhem como uma grande equipe. Mega-clusters estão disponíveis para se trabalhar com bancos de dados enormes e através da Internet, a informação está disponível à distância de um clique de mouse.

2.2 A importância da ecologia microbiana do solo

Ecologia microbiana envolve o estudo dos domínios Eucarya, Archaea e Bacteria e também vírus, analisando as interações entre a população microbiana e seu ambiente. Konopa (2009) listou alguns elementos importantes na pesquisa de ecologia de comunidades microbianas, tais como a análise de vias metabólicas funcionais para utilização de nutrientes e energia, bem como o entendimento das interações entre populações microbianas e seu meio ambiente e as propriedades emergentes da comunidade.

Alguns processos desencadeados por microrganismos no solo podem ser previsíveis, devido a diversidade de fatores bióticos e abióticos, que influenciam o ecossistema subterrâneo (Fierer et al., 2009). Infelizmente a ecologia microbiana do solo raramente tem sido considerada nas previsões sobre mudança climática, apesar da evidência do papel que os microrganismos desempenham nos processos biogeoquímicos. Como comunidades microbianas são de primordial importância nas transformações biogeoquímicas, uma compreensão mais profunda de sua dinâmica será fundamental para aperfeiçoar previsões de como a biosfera modula e responde a condições ambientais (Konopa, 2009). Fierer et al. (2009) explorou princípios que podem ser usados para a previsão da ecologia do solo e em modelos estatísticos para prever alterações globais, o que pode mudar o dogma de que o solo é uma "caixa preta". Bradford e Fierer (2012) sugerem que os ecologistas microbianos trabalhem diligentemente para incluir a ecologia do solo em modelos de previsão de mudanças climáticas e ambientais, uma vez que a biologia deve ser considerada na gestão de ecossistemas e do clima. Processos relacionados com a ecologia microbiana do solo podem ser tanto a causa como

a consequência das mudanças climáticas: o manejo do solo tem implicações diretas sobre os microrganismos do solo e na liberação de gases de efeito estufa, como o CO₂ e N₂O (causa); mudanças ambientais podem alterar disponibilidade de nutrientes relacionados com os ciclos de C e N (consequência).

Os solos são ambientes extremamente complexos que exibem heterogeneidade espacial e temporal (Fierer, 2009). Além disso, seus processos biológicos e composição variam de acordo com o clima, manejo e geografia. Sob temperaturas tropicais, os processos biológicos e as taxas de reação são mais dinâmicas, no entanto, as comunidades de solos são frequentemente qualitativamente similares (Six et al., 2002, Janssen et al., 2006.). Com o avanço recente no sequenciamento de DNA, bioinformática e microscopia avançada, pesquisadores podem desvendar o enigmático ecossistema do solo e criar um modelo de ocorrência e abundância de microrganismos. Para isto, é necessário conectar a informação geográfica e climática e as características físicas e químicas do solo, com os microrganismos relacionados.

2.3 Sucessão microbiana e estratégias de vida

O que pode ser considerado atualmente um solo não perturbado ou nativo? Não sabemos se ainda ha alguma área no mundo que não tenha sido afetado por poluição, queimadas, efluentes industriais e gases, chuva ácida, etc. Seria possível que depois de um tempo decorrido da cessação do distúrbio, o solo possa alcançar o equilíbrio físico e químico novamente, em comparação ao seu estado natural (antes de perturbação)? É incerto que as comunidades microbianas alcancem um "clímax" ou equilíbrio (Fierer, 2010). Portanto, a sucessão microbiana pode ser avaliada em escalas de tempo muito diferentes em diferentes sistemas.

Há muitos estudos relacionados aos padrões de sucessão microbiana em plantas (Osono, 2005; Redford e Fierer, 2009), no intestino humano (Palmer et al., 2007; Balamurugan et al., 2008), em alimentos (Ercolini et al., 2004, Haruta et al., 2006) em dentes (Kolenbrander et al., 2006), tubos com corrosão (Okabe et al., 2007), em biofilmes (Martiny et al., 2003) etc. Fierer et al. (2010) divide os padrões de sucessão microbiana em três

categorias baseadas na assimilação de fontes de carbono: a) autotróficos: uso de luz ou oxidação de compostos inorgânicos para gerar energia, b) heterotrófica endógena: respiração e fermentação de compostos orgânicos derivados do próprio substrato; e c) heterotrófica exógena: respiração e fermentação de compostos orgânicos derivados a partir de entradas externas. Dada a importância do carbono para a sucessão e desenvolvimento de comunidades microbianas, é fácil de compreender a importância da matéria orgânica para os microrganismos. Perturbações antropogênicas afetam a relação C:N do solo, alterando os níveis de nutrição dos microrganismos, e modificando os padrões de sucessão e estratégias microbianas.

Entre as estratégias de vida de um microrganismo, podemos citar: competição por nutrientes [superfície celular: transportadores de nutrientes (Sowell et al., 2009), enzimas extracelulares (Alisson, 2005), sideróforos (Miethke e Marahiel, 2007)], interações metabólicas [sintrofia (Dolfing, 2001), alimentação cruzada (Overmann e van Gemerden, 2000), utilização sequencial e modificação química de xenobióticos (Villarreal et al., 1991)], alelopatia [produção de substâncias químicas (Berlin et al., 2003; Gillor et al., 2008; Riley, e Wertz, 2002)], sinalização/quorum sensing (Gonzales e Keshavan, 2006; Ryan e Dow, 2008; Cooper, 2007), estrutural [biofilmes e consórcios (Wanner et al., 2008)], interações tróficas (simbiose, parasitismo, etc), transferência horizontal de genes [vírus, fagos (Suttle, 2007; Juhas et al., 2009)], co-evolução (Moran et al., 2008). A variedade conhecida de estratégias de sobrevivência dos microrganismos, bem como a diversidade de vias metabólicas que as tornam possíveis, é enorme. Além disso, o ambiente é extremamente heterogêneo. Porém, mesmo assim, é possível encontrar parâmetros em comum entre diferentes ambientes, pois a natureza da vida é fractal e os padrões são repetitivos.

2.4 Biodiversidade do solo

Biodiversidade do solo refere-se a todos os organismos que vivem no solo, e pode ser medida através dos índices de diversidade. A riqueza de espécies (S) é a contagem do número de espécies ou genótipos numa comunidade solo, e depende do tamanho da amostra e não considera a abundância de cada espécie. A abundância relativa ou equitabilidade é a

regularidade com que os indivíduos estão espalhados entre as espécies em uma comunidade. Mas, quando este índice é utilizado sozinho, perdem-se as informações sobre a riqueza de espécies. O índice de diversidade de Shannon (H) considera tanto a riqueza de espécies quanto a abundância relativa, e tem sido muito utilizado, através da seguinte fórmula:

$$H' = - \sum_{i=1}^R p_i \ln p_i$$

Para a diversidade de Shannon (H) ser representativa, deve-se utilizar tanto as sequências de unidades taxonômicas (UTs) classificadas quanto as não classificadas. A utilização deste índice considerando apenas as sequências de UTs classificadas é um erro comum encontrado na literatura. No entanto, o H também tem limitações, como por exemplo, comunidades muito diferentes podem ter o mesmo índice H, uma vez que não se considera a composição microbiana. Neste caso, os valores individuais de abundância, riqueza, e diversidade podem juntamente ser considerados, a fim de se obter uma adequada avaliação da estrutura da comunidade (Pankhurst, 1997). O estudo da biodiversidade do solo deve compreender os níveis taxonômico, funcional e ecológico. Análises estatísticas de rarefação podem testar mudanças em S sobre diferentes localidades ou a mudança na abundância em um organismo ou um grupo de espécies. Como não há um método estatístico que retém todas as informações necessárias para determinar a exata biodiversidade do solo, então, o uso de análises multivariadas pode fornecer informações muito valiosas sobre a comunidade microbiana (Barrantes, 2009).

2.5 Perturbação antrópica através da agricultura e mineração

Distúrbios do solo, tais como a agricultura e a mineração, afetam as comunidades microbianas do solo alterando diretamente os seus níveis de nutrição. Em locais agrícolas, a aplicação de fertilizantes pode estimular a atividade e proliferação de microrganismos copiotróficos. Após a mineração, compostos ácidos são liberados no solo, o que pode estimular a proliferação de microrganismos normalmente considerados raros com funções de degradação de compostos poluentes ou tóxicos, restringindo o desenvolvimento de microrganismos que seriam normalmente abundantes em solo não perturbado.

Fatores como as relações entre plantas e microrganismos, a dinâmica do ciclo de C e N, a estrutura física e a estabilidade química, estão relacionadas ao manejo do solo, o que demanda a consideração de engenheiros agrônomos e ambientais quando propuserem a perturbação do solo, como preparo do solo, adubação, tratamento fitossanitário, mineração, etc. Estes profissionais desempenham um papel na redução do impacto do manejo antropogênico do solo sobre as comunidades microbianas, e isto pode reduzir indiretamente o impacto sobre o ambiente.

2.5.1 Agricultura e os microrganismos

Um solo saudável é a base do sistema agrícola (Bot e Benites, 2005). A atividade agrícola é a base do sistema alimentar e essencial para os seres humanos. Dado que esta perturbação ambiental é absolutamente necessária para a vida humana, o manejo adequado do solo é essencial para se manter a fertilidade do solo, a capacidade de produtividade, bem como a qualidade do solo, do ar e da água.

O sistema de plantio direto combina técnicas conservacionistas diversas para produzir-se alimento com mínimo impacto ao ambiente. O sistema de plantio direto conserva a matéria orgânica, a estrutura física do solo, assim como preserva a macro, meso e microfauna. Os microrganismos desempenham um papel importante na funcionalidade do solo, e atuam diretamente na decomposição de resíduos e na regulação dos ciclos de carbono (C) e do nitrogênio (N), promovendo a fertilidade e aumentando a qualidade do solo. Microrganismos executam importantes processos no solo, tais como decomposição, mineralização, imobilização e transformação mineral. Eles estão intimamente relacionados com as raízes das plantas, as quais podem proporcionar fontes de carbono e nutrientes necessários para a realização destes processos. O sistema radicular de leguminosas e gramíneas são bastante diferentes, proporcionando habitats distintos para os microrganismos.

Microrganismos diferem significativamente quanto a utilização de vias metabólicas para conversão de nutrientes em energia. Dependendo do tipo de nutrientes disponíveis, certos grupos de microrganismos podem ser estimulados enquanto outros são restringidos. Em um sistema agrícola, os

microrganismos estão fortemente relacionadas com as raízes das plantas, que estão concentradas nos primeiros 50 cm de profundidade, e liberam exsudados e compostos mucilaginosos que estimulam o crescimento dos microrganismos. Processos fisiológicos que ocorrem nas plantas tem influência sobre a concentração de nutrientes em torno das raízes. Por outro lado, os microrganismos também têm um efeito sobre as plantas, aumentando ou diminuindo o seu crescimento através de liberação de substâncias promotoras do crescimento de plantas, de simbiose, patogenicidade, etc. Algumas funções das raízes, tais como absorção de água e de nutrientes pode ser modificada pela presença de microrganismos.

2.5.2 Solos construídos após mineração de carvão

O carvão que temos na Terra hoje foi formado há cerca de 250 milhões de anos atrás a partir de restos de plantas que se acumularam em condições pantanosas e turfeiras. As reservas de carvão da Terra podem durar pelo menos mais 200 anos. Mesmo com alternativas de produção de energia "limpa" como energia eólica e solar, o carvão ainda é a fonte de energia mais utilizada no mundo depois do petróleo, por causa de sua eficiência calorífica. A mineração de carvão promove impactos físicos, químicos e biológicos, aumentando assim a possibilidade de degradação do solo e da água e a poluição do ar.

Com os processos de mineração, o solo e o ecossistema passam por uma modificação estrutural. Entre as preocupações relacionadas com a mineração de carvão, podem ser citadas: a perturbação física da paisagem, erosão, escoamento superficial, inundações, redução da qualidade da água, liberação de metano, dispersão de poeira, drenagem ácida, etc. Os impactos ambientais da mineração variam dependendo dos métodos de mineração empregados, das características específicas dos depósitos, da química do carvão e da rocha e da geografia da região. O carvão pode ser extraído por métodos subterrâneos ou de superfície, dependendo da profundidade e da espessura do depósito. No Sul do Brasil (RS), o carvão é extraído do subsolo em um processo chamado de poço aberto ou mineração em tiras. Neste processo, a escavação para a extração do carvão atinge profundidades entre 25 e 50 metros.

Após a retirada do carvão, as áreas mineradas devem ser reconstruídas, e o solo passa então a ser chamado de solo construído. Em geral, o processo de mineração e recuperação das áreas consta dos seguintes passos: 1) remoção da camada superficial do solo e seu armazenamento em um local pré-determinado; 2) remoção da argila e das camadas de regolito que recobrem o carvão 3) remoção do carvão; 4) enchimento do poço com arenito ("estéril") piritoso, 5) recolocação do solo argiloso; 6) recolocação da camada superior do solo previamente armazenada; 7) calagem e fertilização do solo; e 8) semeadura ou plantio de espécies para a fixação da estrutura do solo.

As características dos solos construídos após mineração de carvão dependem do material de origem e dos processos de construção, o que vai determinar o grau de compactação das camadas de solo (Kämpf et al., 1997). As operações de mineração tendem a misturar os materiais de diferentes partes da coluna geológica, reduzindo drasticamente os níveis de matéria orgânica do solo, a qual está intimamente relacionada com microrganismos do solo, uma vez que serve de substrato. A perda da matéria orgânica reduz significativamente a biomassa microbiana destes solos.

A perda da estrutura do solo com o processo de mineração promove a redução da matéria orgânica, o aumento da densidade do solo ($DS > 1,6 \text{ g cm}^{-3}$), a redução da taxa de infiltração de água no solo ($I < 5 \text{ cm h}^{-1}$) (Kämpf et al., 1997; Guebert & Gardner, 2001), favorecendo o escoamento superficial e a erosão. A erosão da superfície do solo de solos construídos é muito comum, e geralmente expõe resíduos de carvão contendo pirita (FeS_2), que em contato com o oxigênio do ar e da água, se oxida e forma ácido sulfúrico (Fanning & Fanning, 1989), acelerando a solubilização de metais pesados, trazendo serias consequências ambientais.

A principal etapa no processo de construção do solo é a preservação do horizonte A, o qual contém maior parte da matéria orgânica, a qual é essencial para os microrganismos do solo e para as plantas. A semeadura e/ou plantio de espécies adequadas de acordo com o solo e clima, assim como o monitoramento do desenvolvimento das plantas, é essencial para estabilização da estrutura e das propriedades do solo e para o restabelecimento da micro, meso e macro fauna, permitindo assim o uso do solo após a mineração.

2.6 Matéria orgânica do solo, agricultura e microrganismos

O ciclo do carbono compreende a transformação contínua de compostos orgânicos e inorgânicos, pelas plantas, microrganismos e atmosfera (Bot e Benites, 2005). Globalmente, a matéria orgânica do solo (MOS) contém três vezes mais carbono do que a atmosfera ou do que a vegetação terrestre (Schmidt et al., 2011).

O solo é um sistema complexo que compreende uma variedade de diferentes microambientes, com propriedades físico-químicas e gradientes descontínuos, além de ser um ecossistema vivo e dinâmico. A matéria orgânica é a ligação entre os processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem no solo. A MOS aumenta a porosidade do solo, a infiltração de água, a capacidade de retenção de umidade, a diversidade e atividade biológica dos organismos, a disponibilidade de nutrientes para as plantas, além de promover a fertilidade do solo. Além disso, melhora a estrutura do solo por meio da agregação de partículas, que promove estabilidade física.

A MOS pode ser dividida em diferentes frações, mas basicamente é dividida em matéria orgânica da parte aérea (resíduos vegetais e animais) e do interior do solo (micro flora e fauna do interior do solo, resíduos de origem animal e vegetal parcialmente decompostos, substâncias húmicas) (Theng, 1987). Muitos fatores estão envolvidos na produção da matéria orgânica do solo, tais como substrato, temperatura, textura, pH, umidade, aeração, mineralogia e biologia. O preparo do solo agrícola influencia esses fatores e também as taxas de degradação microbiana, podendo assim acelerar a decomposição da MO. Perdas da MOS pode ser reduzidas tomando-se medidas para reduzir a erosão e, ainda mais significativamente, reduzindo o preparo de solo com grade e arado.

Microrganismos vivem juntos em consórcios em micro habitats, interagindo entre si e com outras partes da biota do solo (Torvisk e Ovreas, 2002). São também executores da decomposição de compostos orgânicos, regulando o ciclo biogeoquímico. Sendo assim, as taxas de decomposição de MOS não podem ser simplesmente preditas a partir das características químicas da serapilheira (Keiser et al., 2011), mas a comunidade microbiana deve também ser considerada (Strickland et al., 2009). Processos de manejo agrícola do solo como o sistema de preparo convencional que inverte o solo,

liberam C sob a forma de CO₂, bem como estimula os microrganismos quimiotróficos aeróbios a oxidarem os compostos C.

Em áreas agrícolas, uma das diferenças entre plantio convencional e plantio direto está em como a MOS é distribuída no perfil. No sistema de preparo convencional do solo, resíduos de culturas e raízes são triturados misturados de maneira uniforme na camada arável, não havendo muita diferença entre os teores de MOS de 1 a 20 cm de profundidade. No sistema de plantio direto, os resíduos agrícolas e adubos são deixados na superfície do solo e só são misturados por vermes e outros macro artrópodes do solo. A adição contínua de resíduos de plantas e sua decomposição na superfície do solo contribui para a atividade biológica e para a ciclagem carbono no solo. Consequentemente, a MOS fica concentrada nos primeiros 5 cm e decresce com a profundidade.

Ao contrário da fração mineral do solo que é estática, a MOS é dinâmica e sofre mudanças constantes na composição e concentração. Práticas de manejo que maximizam a MOS devem ser vistas como essenciais para a sustentabilidade dos sistemas de cultivo.

2.7 Identificando os microrganismos do solo: técnicas disponíveis

Na década de 70 em Cambridge, Frederick Sanger desenvolveu o método de sequenciamento de DNA (sequenciamento Sanger) e essa metodologia tem sido muito utilizado até hoje. A limitação do uso desta técnica é que pode ser sequenciada apenas uma seção de DNA por reação, e o DNA a ser sequenciado deve ser de uma colônia microbiana obtida por clonagem ou cultura purificada. No estudo de comunidades ambientais, o sequenciamento Sanger exige um grande número de clones a serem analisados para que o resultado seja representativo. Para isso pode ser criada uma biblioteca de fragmentos de DNA ambiental clonados em um tipo de vetor, usualmente *Escherichia coli*. O tamanho da amostra deve ser suficientemente grande para representar a comunidade microbiana, e métodos estatísticos como curvas de rarefação podem avaliar a confiabilidade e representatividade do tamanho da amostra. No entanto, para o estudo de comunidades microbianas complexas, atualmente existem novas tecnologias de sequenciamento disponíveis, as

quais estão sendo constantemente melhoradas proporcionam maior precisão e consistência aos resultados. Cada tipo de sequenciamento tem peculiaridades e deve ser usado de acordo com os objetivos. Pirosequenciamento, sequenciamento Illumina, Ion Turrent, e Solid são alguns exemplos.

O pirosequenciamento utiliza tecnologia Roche (454 FLX Titanium genome analyser) e fornece um perfil filogenético composta sequência longas. A companhia Illumina/Solexa fornece sequenciadores de ultima geração como o GA II (sequenciamento menos profundo) e Hi-Seq 2000 (sequenciamento mais profundo), provendo sequencias mais curtas que as do pirosequenciamento, porem bem mais numerosas. Este tipo de sequenciamento utiliza sequencias código (barcodes) adaptadas ao final das sequencias pareadas (Figura 2.1) e tem um custo bem menor que o pirosequenciamento.



FIGURA 2.1. Esquema de “barcodes utilizados no sequenciamento Illumina. As seqüências adaptadoras P5 e P7 permitem a ligação do fragmento amplificado na superfície da célula de fluxo Illumina. A seqüência de 7 bases do barcode liga o oligonucleotideo reverso, permitindo que a seqüência resultante possa ser combinada com a amostra original. SBS3 e SBS12 são sítios de ligação para a enzima polimerase durante o sequenciamento. Figura extraída da Revista Microbiology Journal (Characterization of the Relative Abundance of the Citrus Pathogen *Ca. Liberibacter Asiaticus* in the Microbiome of Its Insect Vector, *Diaphorina citri*, using High Throughput 16S rRNA Sequencing - Fagen et al., 2012).

A plataforma de pirosequenciamento Roche 454 produz uma taxa de erro elevada em regiões de homopolímeros (três ou mais bases consecutivas de DNA idênticas) causada pela variação acumulada da intensidade de luz (Margulies et al., 2005, Quince et al., 2009), e até 15% de as seqüências resultantes são muitas vezes produtos de amplificação artificial (*in vitro*) (Gomes Alvarez et al., 2009). Luo et al. (2012) avaliaram o tipo e a frequência

de erros em sequencias metagenomicas utilizando as plataformas de sequenciamento Roche 454 e Illumina / Solexa e concluíram que a tecnologia Illumina seria mais adequada para estudos de metagenoma, pois produziu sequencias mais precisas e em maior numero, apesar do menor comprimento de leitura em relação ao Roche 454. A Roche 454 recuperou 14% menos genes completos que Illumina. Outro fator importante citado por estes autores e que o sequenciamento utilizando plataforma Illumina custa um quarto do custo da Roche 454.

As últimas versões do Roche 454 e Illumina oferecem maior resolução em comparação com suas versões anteriores. Porem, a versão atualizada do Illumina (Illumina Hiseq) oferece resultados de sequencias mais longas e cobertura muito maior do genoma, trazendo vantagens nas analise de comunidades microbianas complexas como o solo e o intestino humano (Martin, 2011). Outra tecnologia de sequenciamento que tem sido utilizada é a plataforma Ion Torrent. É uma nova plataforma, ideal para o sequenciamento de genomas pequenos ou regiões-alvo de genomas maiores, bem como para a detecção de mutações em genes. O Ion Torrent detecta a mudança de pH produzida pela libertação de íons de hidrogénio quando o nucleotídeo novo é incorporado na sequencia.

O gene 16S rRNA tem regiões que são idênticas para todas as espécies procarióticas, bem como regiões que são únicas para cada espécie (Figura 2.2). Esta peculiaridade facilita a utilização de regiões deste gene para distinguir e descobrir a filogenia de microrganismos. Também proporciona uma impressão digital (fingerprint) da comunidade microbiana.

Abordagens metagenomicas permitem o sequenciamento do genoma de comunidades microbianas inteiras em vez de microrganismos individuais (Cavicchioli et al., 2006). Para isso, em vez de usar um gene (por exemplo o 16S), ou de sequenciar um genoma, todos os genes de todos os microrganismos de um determinado ambiente são sequenciados. Apos o sequenciamento, técnicas de bioinformática limpam, filtram e agrupam as sequencias, remontando os genes. Através da metagenômica é possível se acessar as vias metabólicas e funções utilizadas por microrganismos de um bioma, porem, não e possível ainda se saber "quem" executa cada função. O desafio da metagenômica é descobrir as sequências de cada organismo sem

misturar as partes de genes que compõem cada organismo, separando os genes que pertencem a organismos diferentes.

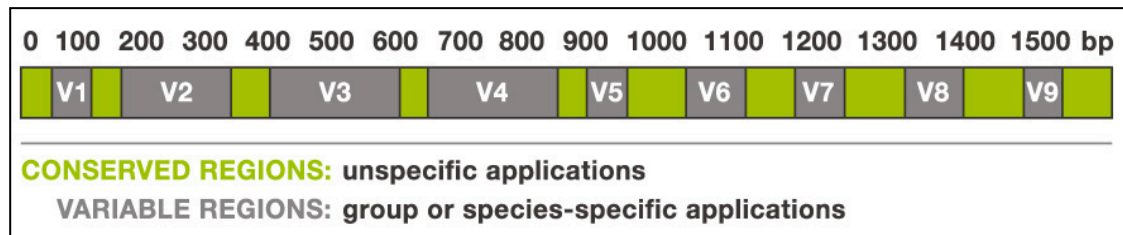


FIGURA 2.2. Ilustração do gene 16S rRNA mostrando as regiões conservadas (verde) e variáveis (cinza). As regiões conservadas do gene são idênticas para todas as bactérias, enquanto as regiões variáveis contêm sítios específicos únicos para cada bactéria. Figura extraída do site www.alimetrics.net.

Devido a dificuldade de separação do conjunto de genes de cada organismo quando se sequenciam amostras de comunidades inteiras, surgiu uma nova tecnologia de sequenciamento chamada sequenciamento de célula única (single cell sequencing). Esta abordagem tornou-se uma poderosa ferramenta para sequenciamento do genoma de células individuais, favorecendo o estudo de microrganismos que não podem ser cultivados (Yilmaz, 2012). O sequenciamento de célula única tem sido fundamental para o acesso de todas as sequências de um microrganismo, incluindo cromossomos, organelas, plasmídeos, vírus e fagos, utilizando uma única célula. Esta técnica tem sido usada para recuperar genomas completos de bactérias e archaea (Woyke et al., 2009; Swan et al., 2011; Blaney et al., 2011; Chitsaz et al., 2011; Ghai et al., 2011) e protistas (Yoon et al., 2011; Heywood et al., 2011). Yoon et al. (2011) utilizaram uma célula única de protista marinho para recuperar o seu genoma completo, e acabaram descobrindo o genoma completo de um nanovírus que provavelmente infecta os protistas. A técnica consiste em isolar uma única célula a partir do ambiente, por meio de citometria de fluxo (o mais utilizado), micro fluídos, diluição ou micromanipulação com pinças. Após, a célula sofre lise e o DNA total é extraído (Figura 2.3). Depois disso, o material genético pode ser amplificado através de PCR (utilizando iniciadores aleatórios; amplificação múltipla; múltiplo anelamento, etc.), e utilizados em microarrays, bibliotecas de expressão e sequenciamento genômico (Stepanauskas, 2012).

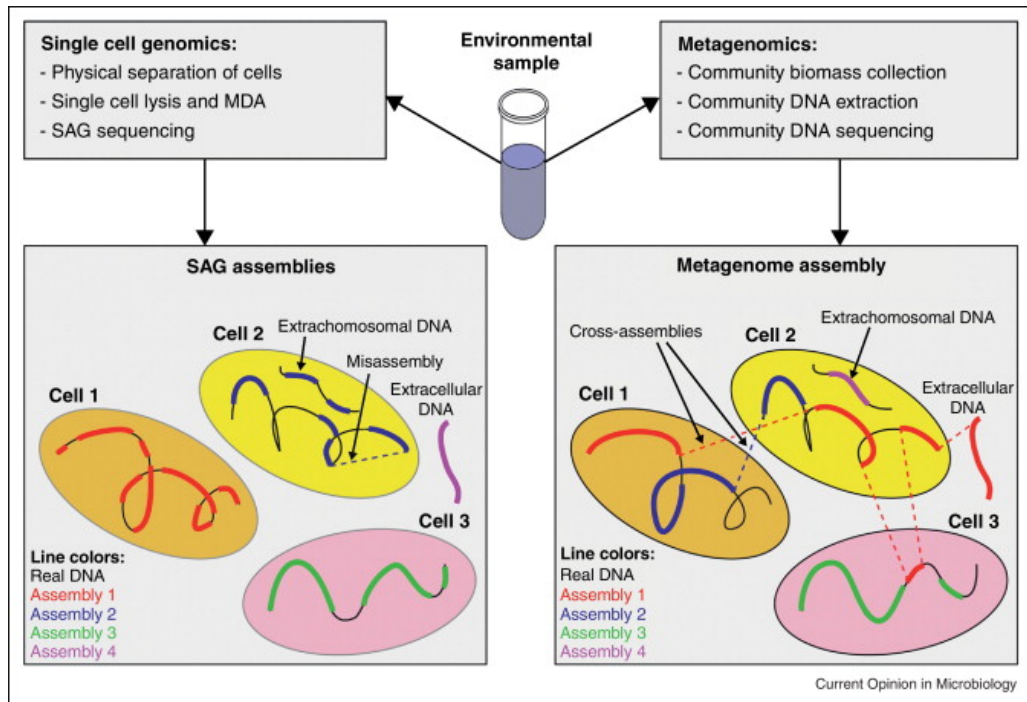


FIGURA 3.3. Vantagens e limitações da técnica de sequenciamento do DNA de uma única célula, comparando-se ao sequenciamento metagenômico (Ramunas Stepanauskas, 2012).

3. CAPITULO I

ALTERAÇÕES NA DIVERSIDADE E COMPOSIÇÃO MICROBIANA EM SOLOS CONSTRUÍDOS APOS MINERAÇÃO DE CARVÃO

3.1 RESUMO

O processo de mineração de carvão geralmente resulta na contaminação das camadas de solo, com pirita, que é posteriormente oxidada em compostos ácidos. Além disso, mineração de carvão leva a distúrbios ambientais, incluindo a compactação do solo, erosão, poluição da água, alterando a biodiversidade local. Os objetivos deste estudo foram avaliar as alterações na diversidade, abundância e composição microbiana do solo, na área da maior mina de carvão da América Latina. Áreas em cinco diferentes fases de recuperação foram amostradas, analisadas e comparadas com solos não perturbados (floresta e campo nativo). O gene 16S rRNA foi sequenciado, e as características do solo, incluindo compostos químicos, teor de metais pesados, a biomassa microbiana e concentrações de enzimas foram analisados. Através do sequenciamento Illumina, 455.759 sequências do gene 16S rRNA foram obtidas após a limpeza, e foram classificadas em 24 filos, 46 classes, 95 ordens, 191 famílias, 525 gêneros e 2.005 espécies de bactérias e archaea. Solos reconstruídos recentemente (de três a 6 anos de idade) apresentaram menor diversidade, biomassa microbiana, e concentrações das enzimas glucosidase e beta-glucosidase no solo em comparação aos solos de 19 anos após a construção, de floresta e campo nativo. Uma redução drástica na diversidade microbiana foi observada em solos reconstruídos, em comparação com os solos de floresta e campo. Os gêneros mais abundantes nos solos construídos foram *Thiobacillus*, *Sphingomonas*, *Novosphingobium*, *Acinetobacter* e *Variovorax*. *Bradyrhizobium* foi o gênero mais abundante na área de floresta (6,4% do total de leituras), e *Bacillus* no site pastagem (4,8% do total de leituras). A presença de Actinobacteria foi positivamente correlacionada com a concentração de cobre do solo. A diversidade microbiana em locais recuperados aumenta com os anos após a construção do solo, mas mesmo 20 anos após a construção do solo não retornou aos níveis originais, indicando que os solos construídos não foram recuperados adequadamente com o manejo de solo aplicado.

3.2 INTRODUÇÃO

A mina de Candiota, localizada no Sul do Brasil, é a maior mina de carvão na América Latina. A cada ano, 1,7 milhões de toneladas de carvão são extraídas de sua reserva de 3 bilhões toneladas, gerando 350 megawatts de energia (CGTE, 2012). A exploração do carvão contribui para o desenvolvimento social e econômico da região (Koppe et al., 2002), no entanto, a mineração de grandes áreas de terra pode resultar em alterações drásticas na estrutura e na biologia do solo, conduzindo a uma série de preocupações ambientais (Potter et al., 1988; Kampf et al., 2000). Na tentativa de corrigir essas alterações, e também de restaurar a paisagem, ocorre um processo reabilitação das áreas pós-mineradas, formando os chamados "solos construídos" (Koppe et al., 2002; Gaivizzo et al., 2002).

Minimizar os danos ambientais no processo de construção do solo é de extrema importância. O processo ideal inclui manter a ordem original de horizontes do solo e realocação do horizonte A na superfície, seguido por correção do pH, fertilização e re-vegetação. No entanto, devido à falhas no cumprimento rigoroso do processo acima descrito e a variações nos processos de extração de carvão, existem serias deficiências no processo de construção do solo. Tipicamente ocorre que o horizonte superficial é contaminado com resíduos de carvão que contem pirita (FeS_2). A pirita, pode ser oxidada tanto por microrganismos do gênero *Thiobacillus*, quanto em contato com o oxigênio do ar e da água, gerando ácido sulfúrico, o que resulta em elevação dos níveis de acidificação do solo (Fanning e Fanning, 1989). Isto acelera a dissolução das rochas, aumentando também a concentração de metais como Al, Fe, Mn, Cu, Ni e Zn a níveis tóxicos (Barnhisel e Bertshch, 1982). Isto por sua vez acelera também perdas de Ca e Mg através da lixiviação dos sais de sulfato (Pitchel et al., 1994) e podem também contribuir para a insuficiências de P, N, B e Mo, prejudicando o curso da re-vegetação terrestre (Tabatatai, 1987;

Nordstrom, 1982). A perda da estrutura do solo, a perturbação de matéria orgânica, o aumento da densidade do solo ($D > 1,6 \text{ g cm}^{-3}$), e baixa taxa de infiltração de água no solo ($I < 5 \text{ cm h}^{-1}$), conduzem ao escoamento superficial e erosão do solo (Kampf et al., 1997; Guebert e Gardner, 2001). Combinados, esses fatores interferem na ecologia microbiana do solo.

A matéria orgânica do solo (MOS) melhora as propriedades físicas e químicas do solo, promovendo a atividade biológica e mantendo a qualidade ambiental (Astaraei, 2008). Plantas e microrganismos são peças chave dentro do ecossistema do solo e são responsáveis por processos importantes de ciclagem de nutrientes, mobilização e mineralização de C e de N no solo (Zak et al., 2003;. Barget e Shine 1999). No entanto, o seu estabelecimento e diversidade depende de muitos fatores, incluindo interações entre plantas e microrganismos (Danfi et al., 2010) e da disponibilidade de material orgânico. Depois de perturbações como mineração, tanto plantas como microrganismos são drasticamente reduzidos. Além disso, as mudanças ambientais resultantes podem exercer pressão de seleção sobre as comunidades microbianas presentes afetando os processos de ciclagem de nutrientes. A fim de normalizar o ciclo biológico perturbado, re-vegetação é essencial para a adição de resíduos e matéria orgânica nos solos construídos.

A diversidade e a composição de comunidades microbianas podem ser utilizados como bioindicadores do reestabelecimento de interações biológicas na comunidade, bem como da restauração da função de ecossistemas degradados (Holt e Miller, 2011). Abordagens integradas como medições da biomassa microbiana e atividade enzimática, análise da comunidade microbiana e determinação das características químicas do solo, podem ajudar a visualizar processos globais que ocorrem no solo. O objetivo deste estudo foi analisar as alterações das comunidades microbianas perturbadas após o processo de restauração do solo após mineração de carvão em Candiota/RS.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Caracterização ambiental

A área de mineração estudada, é utilizada pela empresa de mineração Rio Grande do Sul (CRM), e está localizada em Candiota, a $-31^{\circ}33'55''\text{S}$ e $-53^{\circ}43'30''\text{W}$, com uma altitude de 230m. Acordo Köppen Wilhelm, a região tem um clima subtropical úmido. A temperatura média anual é de $17,2^{\circ}\text{C}$, e o solo é classificado como um Argissolo (Embrapa, 1999). Após a extração do carvão e de construção do solo, o solo foi corrigido para aumentar o pH, e a área foi re-vegetação com uma mistura de gramíneas. A solo construído com 19 anos de idade, não foi corrigido (não foi realizada calagem nem adubação), e árvores de eucalipto foram plantadas após a construção do solo. Áreas de floresta e de pastagem foram utilizadas como tratamento controle de solo não perturbado para comparação com os solos construídos.

3.3.2 Amostragem

Em cada local, três locais de amostragem separados foram estabelecidos em cada categoria solo (Figura 3.1). As amostras foram coletadas sob temperatura amena para atenuar os efeitos de extremos de temperatura, em sítios topográficos representativos, evitando-se elevações e declives. Para coletar as amostras de solo, a vegetação superficial foi removida. Três parcelas de um metro quadrado, foram pré-delimitadas e amostradas em cada local. Dez amostras de solo de 1-10 centímetros de profundidade foram tomadas e reunidas para formar uma única amostra composta por metro quadrado. As amostras foram retiradas com espátulas estéreis, colocadas em tubos falcon de 50 ml estéreis com tampa, e

armazenadas em caixas térmicas contendo gelo seco até a chegada ao laboratório, onde foram congeladas em freezer a -20°C .

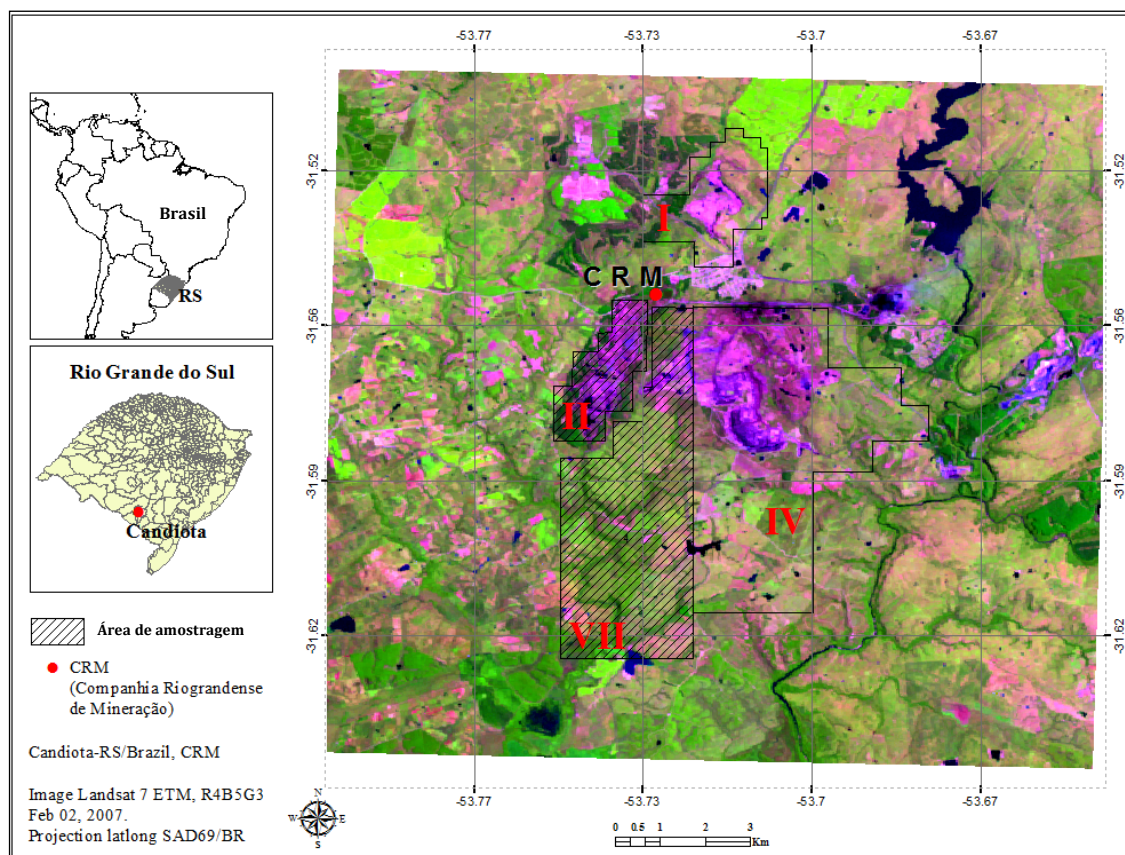


FIGURA 3.1. A área de coleta situada no município de Candiotá, na CRM empresa de mineração (Rio Grande do Sul, Brasil). As áreas em rosa, representam solo descoberto; áreas de cor verde significam locais com vegetação (agricultura verde claro, e floresta nativa em verde escuro); a cor azul representa cursos d'água; e marrom significa áreas de campo.

3.3.3 Caracterização química e física

Uma solução neutra de KCl mol L^{-1} foi usada para extrair o Ca , Mg e Al . Níveis de Ca e Mg foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica e a concentração de Al por neutralização com titulação de NaOH (Tedesco et al., 1995). O potássio foi extraído com a solução de H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ + HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e determinado por fotometria de chama (Tedesco et al., 1995). A acidez total ($\text{H} + \text{Al}$) foi extraída com solução de acetato de cálcio ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) tamponado a pH 7,0, e quantificada por neutralização e titulação com NaOH (EMBRAPA, 2006). A soma de bases (S), a saturação de bases ($\text{V}\%$), e a capacidade de troca de cátions (CTC) a pH 7,0, foram calculados de acordo com a EMBRAPA (2006). Carbono orgânico foi analisado de acordo

com Tedesco et al. (1995). Cádmio (Cd), Cobre (Cu), níquel (Ni) e chumbo (Pb), foram extraídas com H_2SO_4 0,05 mol L^{-1} + HCl 0,05 mol L^{-1} de solução, e as suas concentrações foram determinadas por espectrometria de plasma de acordo com Tedesco et al. (1995). Os níveis de pH foram determinados em água e KCl mol L^{-1} por potenciometria.

3.3.4 C-Biomassa microbiana, C-respiração e atividade enzimática do solo

O carbono da biomassa microbiana foi extraído utilizando-se o método de fumigação e extração com clorofórmio (Vance et al., 1995). Para isto, alíquotas de 25 g de solo (peso em base seca) foram sujeitos a fumigação por 48h com clorofórmio em um dessecador de vidro. Após aeração, triplicatas de cada amostra de solo fumigado e não fumigado foram agitadas durante 1 hora a 180 rotações por minuto com 0,5 M de K_2SO_4 em uma proporção de 5:1 (peso do extrator para o peso de solo seco) e filtrada. Os níveis de carbono solúveis foram determinados para ambos os solos fumigado e não-fumigado. O C solúvel foi extraído da solução do solo por digestão com dicromato de potássio, seguindo-se a metodologia de Jenkinson e Polson (1976). A quantidade de C solúvel a partir dos extratos de solo fumigado e não fumigado foram calculados utilizando a seguinte equação:

$$[\text{C-Biomassa} = (\text{C}_f - \text{C}_{nf})/\text{K}_{ec}]$$

onde C_f é C em extrato fumigado, C_{nf} é C em extrato não-fumigado, e K_{ec} é a proporção de C microbiano que é extraído do solo.

O C da respiração microbiana foi estimado medindo-se a quantidade de CO_2 libertada do solo durante 40 dias de incubação, em conformidade com metodologia de Stotzky e Pramer (1972). Três replicatas de 200 g cada foram tomadas de cada amostra de solo (peso em base seca) e incubadas durante 40 dias a 25°C em recipientes de vidro hermeticamente fechadas com pequenos copos contendo NaOH 0,5 N solução, a qual retém o CO_2 resultante da atividade biológica microbiana, através da formação de Na_2CO_3 em solução. A cada 5 dias (num total de oito medições), o CO_2 foi medido em cada solução. Para isto, 10 ml de 0,2 N de BaCl_2 foram adicionados aos copos contendo NaOH, a fim de precipitar o carbonato e evitar a sua interferência com a

titulação. A titulação com HCl foi realizada utilizando fenolftaleína como indicador.

A concentração das enzimas β -glicosidase e desidrogenase foram avaliadas nas amostras de solo, de acordo com Tabatabai (1994). Para cada ensaio de enzima, 15 g de solo por amostra foram misturados com 100 mL de de tampão de acetato 0,05 M.

3.3.5 Isolamento do DNA e PCR

Para cada amostra, o DNA foi isolado do solo utilizando o PowerSoil MoBio™ DNA Isolation Kit (Carlsbad, CA, EUA), com as seguintes modificações no passo nº 1 do kit: em vez de se utilizar 0,5g (conforme protocolo do fabricante), utilizou-se 3g de solo, o qual foi incubado em banho-maria com 5 ml de solução SDS a 60°C por 10 min. Após homogeneização em vortex por 5 segundos, os tubos foram centrifugados por 2 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi utilizado com a solução numero dois do kit para os passos seguintes conforme protocolo do fabricante. As concentrações de DNA genômico e a pureza foram determinados por espectrofotometria NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). Os oligonucleotídeos iniciadores usados para a reação de PCR, foram o 515F e o 806R (Caporaso et al., 2010). Foram utilizados como alvo a região V4 do gene 16S rRNA com a adição de uma sequência de código de barras (barcodes) e os adaptadores requeridos para sequenciamento Illumina. O PCR foi realizado a uma temperatura de desnaturação inicial de 94°C durante 3 min, seguido por 20 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 53°C durante 30 segundos, e 65°C durante 90 segundos. A etapa de alongamento final a 65 ° C foi realizada durante 10 minutos. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o Qiagen™ kit de purificação de PCR, seguindo o protocolo do fabricante (Qiagen, Valencia, CA, EUA) com exceção do passo de eluição, onde foi utilizada água estéril em vez da solução do kit. Apos, a concentração final do produto foi quantificada por fluorometria no aparelho Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, NY, EUA).

3.3.6 Sequenciamento de alto rendimento Illumina do gene 16S rRNA

A análise das sequências foi realizada de acordo com o protocolo da Figura 3.2. O sequenciamento foi realizado em um sequenciador Illumina (Illumina, Inc., CA, EUA) com 101 ciclos de leitura das sequencias emparelhadas. A análise das sequências e a identificação das unidades taxonômicas baseou-se nos métodos de Giongo et al., 2010, e Fagen et al. 2012.

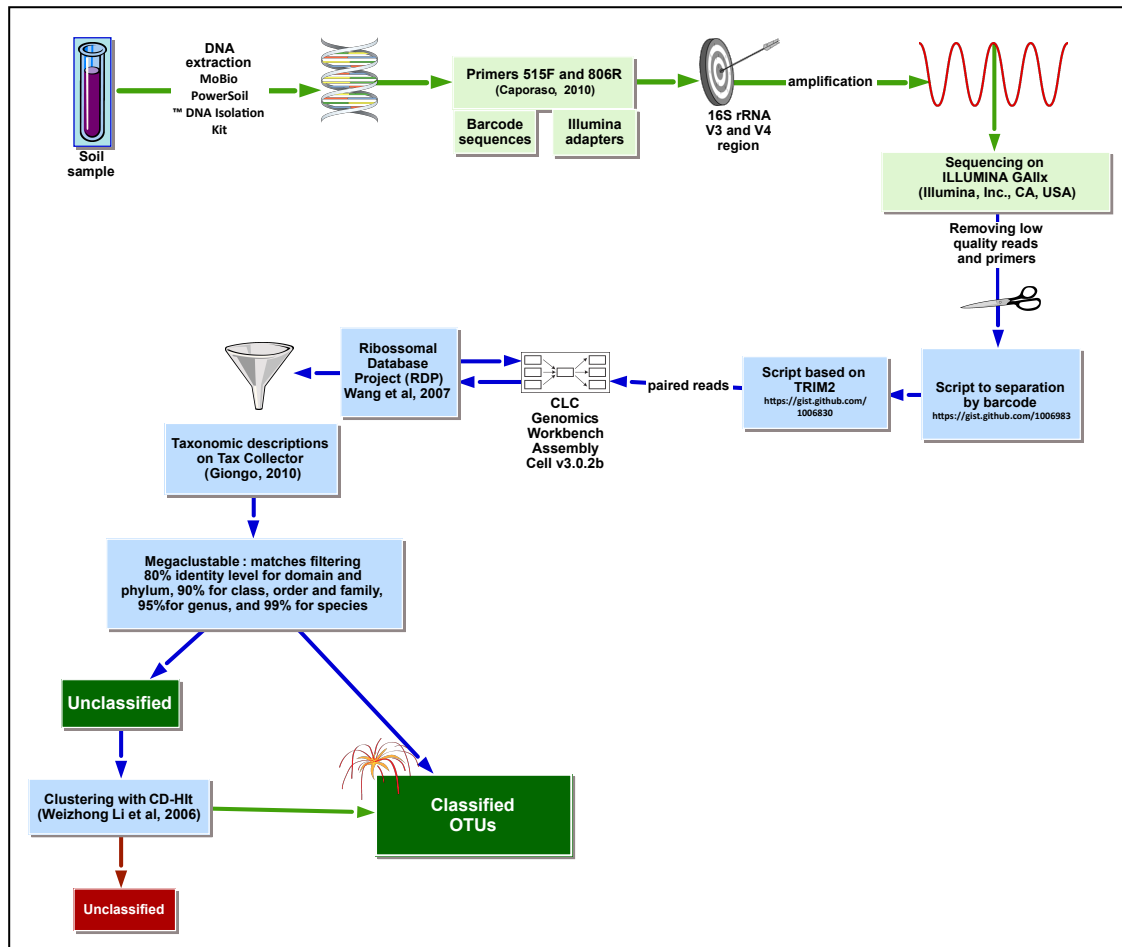


FIGURA 3.2. Esquema representando o progresso do fluxo de trabalho para obtenção das sequências e das unidades taxonômicas operacionais (UTOs) utilizadas na pesquisa.

As sequencias foram aparadas para remover as bases de baixa qualidade, assim como para remover as primeiras 11 bases correspondentes à região do primer, utilizando-se um script baseado no programa Trim2 (Huang et al., 2003) (Fonte disponível em: <https://gist.github.com/1006830>) e, em

seguida, as leituras foram separados por barcodes (cada barcode representa uma amostra de solo individual) (fonte disponível em: <https://gist.github.com/1006983>).

As sequencias emparelhadas obtidas no, foram montadas usando o software CLC v3.0.2b e o banco dados do gene 16S RDP (Cole et al., 2009) Descrições taxonômicas com base no banco de dados NCBI taxonomy (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) foram gerados para as entradas da base de dados RDP utilizando o conjunto de scripts listado em TaxCollector pipeline (Giongo et al., 2010). As sequencias foram filtrados e classificadas de acordo com a similaridade. Considerou-se um mínimo de 80% de similaridade para identificação do domínio e filo, de 90% para identificar a ordem e a classe, 90% para família, 95% para gênero, e 99% de similaridade para identificação de espécies. Com as sequencias pareadas geradas que corresponderam as sequências do RDP para cada nível de similaridade, foi criada uma matriz de abundância de unidades taxonômicas, para cada nível de taxonomia entre amostras. Pares que não corresponderam às sequências no banco de dados RDP foram anotados de acordo com seu último ancestral comum (LCA - last common ancestor), e os pares que não emparelharam com um LCA, ou qualquer alternativa no banco de dados RDP, foram considerados não classificados. Para normalizar as diferentes profundidades do sequenciamento das amostras, as matrizes de abundância de unidades taxonômicas de cada amostra foram divididas pelo número total de emparelhamentos após o corte.

3.3.7 Análises estatísticas

T-teste, teste de Tukey, análise das componentes principais (PCA), e correlações de Spearman foram realizadas utilizando o software XLSTAT-Pro 2011 (Addinsoft). Para integrar análise de correlações Spearman, apenas as UTOs com abundância relativa igual ou superior a 0,05% foram utilizados, e o restante foi descartado para esta análise (corte). Para executar a análise de componentes principais PCA ($p \leq 0,01$), os dados foram normalizados para terem a variância = 1. Para isso, utilizou-se a seguinte formula: [(abundancia relativa da UTO – média da abundancia relativa) / desvio padrão]. O índice de diversidade de Shannon (H) foi estimado para cada amostra, considerando as

sequencias classificadas e as não classificadas, utilizando-se para isto o script encontrado em <https://gist.github.com/3078251>.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Caracterização física e química do solo

As amostras de solo foram analisadas para determinação do pH, da porcentagem de argila, para a quantificação dos macro nutrientes, micronutrientes e da concentração de metais pesados (Tabela 3.1). Considerando-se que as amostras foram oriundas do mesmo tipo de solo e situação geográfica, as análises mostraram grande variação nas características químicas, refletindo a heterogeneidade dos processos de construção de solo.

As amostras de solo de floresta obtiveram o maior teor de argila de todos os solos amostrados, além de duas vezes mais matéria orgânica e sete vezes mais capacidade de troca de cátions (CEC) do que as áreas de pastagem. O pH das áreas variou de 4,1 (floresta, e solos com 6 e 19 anos de construção), a 5,6 (4 e 5 anos após construção). O pH mais elevado em áreas mais jovens pode ser explicado pela recente adição de calcário, uma vez que antes de calagem, o pH das áreas recém construídas é geralmente muito ácido (entre 0 e 3,0 - dados não apresentados). O solo com 19 anos de idade e a área de floresta obtiveram a maior CTC, porém a maior parte da CTC é saturada por Al, e não por bases. Nenhum dos solos amostrados teores excessivos de metais pesados (Cu, Cd, Ni, Cr, Zn e Pb) de acordo com o Centro Tecnológico de Saneamento de São Paulo, Brasil (CETESB) (Tabela 3.1). Observou-se quanto mais novo o solo construído, menor conteúdo da MO, evidenciando a perda de MO no processo de construção do solo.

TABELA 3.1. Caracterização química e física dos solos construídos, e solos de floresta e campo nativo. Os números 3, 4, 5, 6, e 19, representam o numero de anos decorridos apos a construção dos solos.

Amostra de solo*	Argila	pH	Al ³⁺ + H ⁺	P	K	MO	CTC	Sat bases	Sat Al ³⁺
	%		cmolc/dm ³	mg/dm ³	mg/dm ³	%	cmolc/dm ³	%	%
3	35	4.7	13.7	7.4	82	1.9	16.2	15	51.6
4	29	5.6	3.9	4.4	85	2.3	11.1	65	0
5	25	5.6	3.1	4.1	119	2.6	18.1	83	0
6	18	4.1	21.8	6.8	79	2.4	22.7	4	85.6
19	21	4.1	30.7	15.0	98	4.9	33.2	7	63.6
Floresta	48	4.1	61.2	2.8	92	5.4	63.1	3	78.9
Campo Nativo	22	4.9	6.2	4.5	127	2.9	9.2	33	24.5

Amostra de solo	S	Zn	Cu	B	Mn	Cd	Ni	Cr	Pb
	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
3	226	1.9	0.9	0.7	29	< 0.2	8	8	4
4	18	0.7	0.1	1	15	< 0.2	6	7	11
5	66	3.6	0.7	0.6	5	< 0.2	14	21	11
6	96	1.6	1.2	0.4	4	< 0.2	7	10	11
19	34	5.5	0.1	0.6	8	< 0.2	4	6	9
Floresta	40	2.2	4.4	1.2	12	< 0.2	4	4	8
Campo Nativo	13	1.7	0.8	0.6	28	< 0.2	5	4	10
**VRQ	-	60	35	-	-	< 0.5	13	40	17
**VP	-	300	60	-	-	1.3	30	75	72
**IA	-	450	200	-	-	3	70	150	180

* Números nesta coluna representam anos após a construção do solo.

** Valores de referência (VRQ: Valor de Referência de Qualidade; VP: Valor Prevenção; IA: intervenção para agricultura) para metais pesados de acordo com o Centro Tecnológico de Saneamento do Estado de São Paulo (CETESB), Brasil.

- Al₃⁺ + H⁺ = acidez potencial do solo

- MO = teor de matéria orgânica

- CTC = capacidade de troca de cátions ((Ca₂⁺ + Mg₂⁺ + K⁺ + Na⁺) + H⁺ + Al₃⁺)

- Sat CTC bases = saturação por bases da CTC (Ca₂⁺ + Mg₂⁺ + K⁺ + Na⁺)

- Sat CTC Al = saturação da CTC por alumínio (m), em que: m < 1 = muito baixa; m entre 1 e 10% = baixo; m entre 10,1 e 20%, média =; m > 20% = alta.

3.4.2 Caracterização biológica do solo

A biomassa microbiana é considerada a parte viva da matéria orgânica e é composta por micro-organismos que participam em diversos processos no solo. No processo mecânico de redistribuição das camadas de solo após a extração do carvão, os horizontes do solo são geralmente invertidos ou misturados uns aos outros, reduzindo-se consideravelmente o horizonte A que contém a matéria orgânica. O solo construído com três anos de idade, apresentou o menor teor de matéria orgânica, assim como as menores taxas de respiração e biomassa microbiana, bem como o maior coeficiente metabólico (Figura 3.3 abc), indicando uma drástica redução dos microrganismos do solo neste solo após o distúrbio.

A área de floresta representa o solo original desta região, e apresentou teores elevados de C-respiração e de C-biomassa microbiana, assim como o mais baixo coeficiente metabólico. Em solos construídos, a biomassa microbiana apresentou comportamento de aumento gradual ao longo do tempo, no entanto, mesmo nos solos de 19 anos não retornaram aos níveis originais (encontrados em solos de floresta), sugerindo uma perda irreversível de biomassa microbiana.

O coeficiente metabólico (qCO_2) expressa a taxa de respiração por unidade de biomassa microbiana (Anderson e Domsch, 1985). Quanto menor for a perda de C- CO_2 para a incorporação de C nos tecidos, maior a eficiência em utilização de C, e por consequência, menor o qCO_2 . A figura 3c mostra que, os solos de três e cinco anos de construção apresentaram o maior qCO_2 , indicando uma menor eficiência do metabolismo de C pelos microrganismos deste solo. Os solos com quatro, seis e 19 anos de construção, bem como as áreas de floresta e campo nativo, apresentaram os menores qCO_2 , indicando uma alta eficiência no metabolismo do C.

As enzimas do solo β -glicosidase e desidrogenase foram avaliadas, e os resultados estão representados nas figuras 3.4a e 3.4b. Os resultados apresentaram comportamento semelhante aos resultados encontrados na quantificação do C-biomassa e C-respiração microbiana. A concentração da enzima beta-glicosidase foi maior no solo de floresta em comparação com os outros locais. A atividade da enzima desidrogenase no solo reflete a atividade oxidativa total dos microrganismos, e a sua concentração foi igualmente elevada nos solos de seis e 19 anos de idade, bem como nos solos de floresta e campo nativo, indicando que a atividade microbiana aumenta com o tempo após o distúrbio. A estabilidade física do solo (estrutura) contribui para o desenvolvimento de uma comunidade microbiana estável, e isto depende da textura e do tempo sem perturbação física. Isso pode ser observado no solo de 19 anos e nos solos naturais de floresta e de pastagem, os quais estão muitos anos sem sofrerem preparo do solo e apresentaram indicativos de uma comunidade microbiana mais consistente e estável.

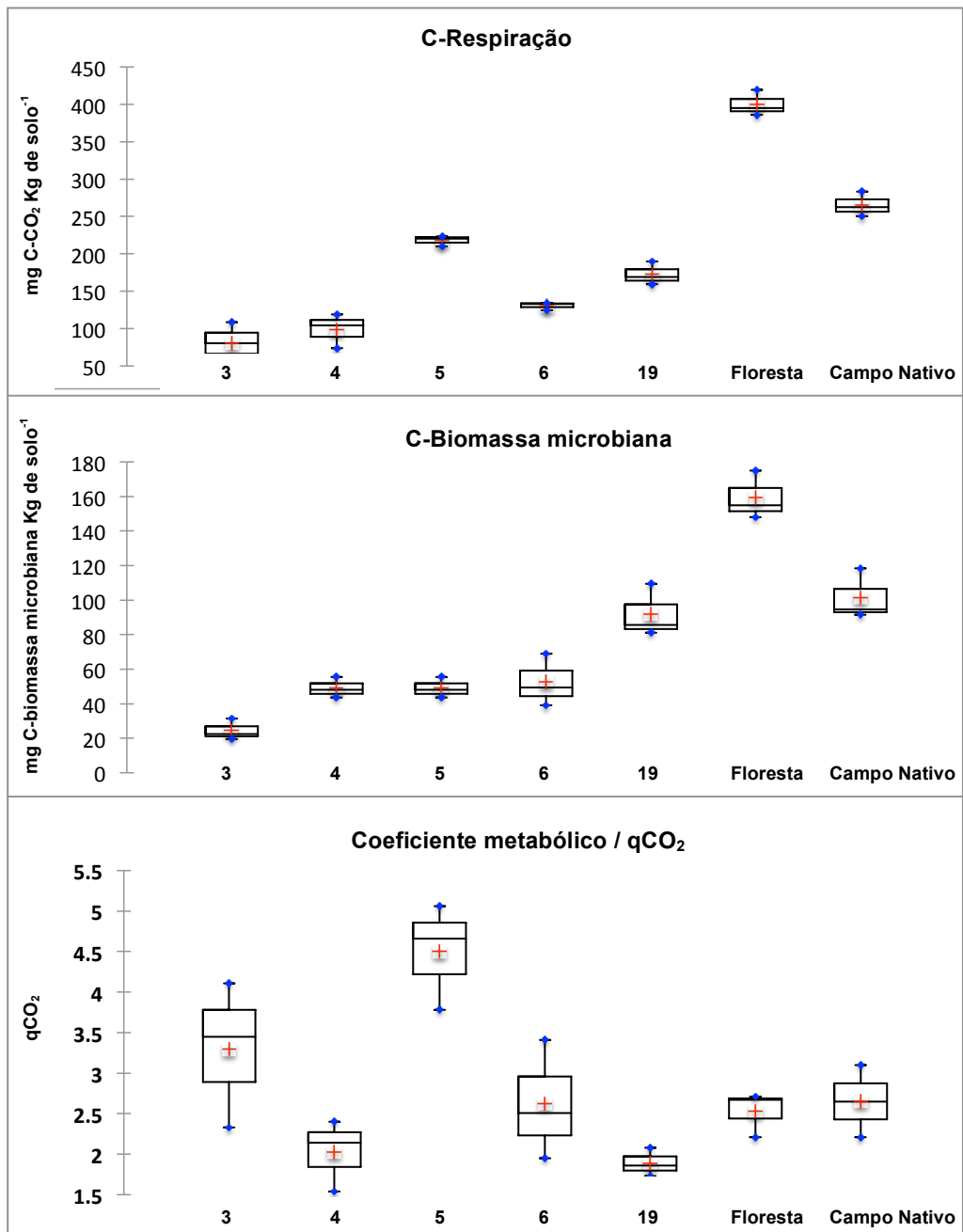


FIGURA 3.3. Boxplot representando diferenças entre o C-respiração microbiana (3a), C-biomassa microbiana (3b), e coeficiente metabólico (3c) dos solos construídos com 3, 4, 5, 6, e 19 anos de idade, em comparação com áreas de floresta e campo nativo. Valores representam a média entre 6 repetições.

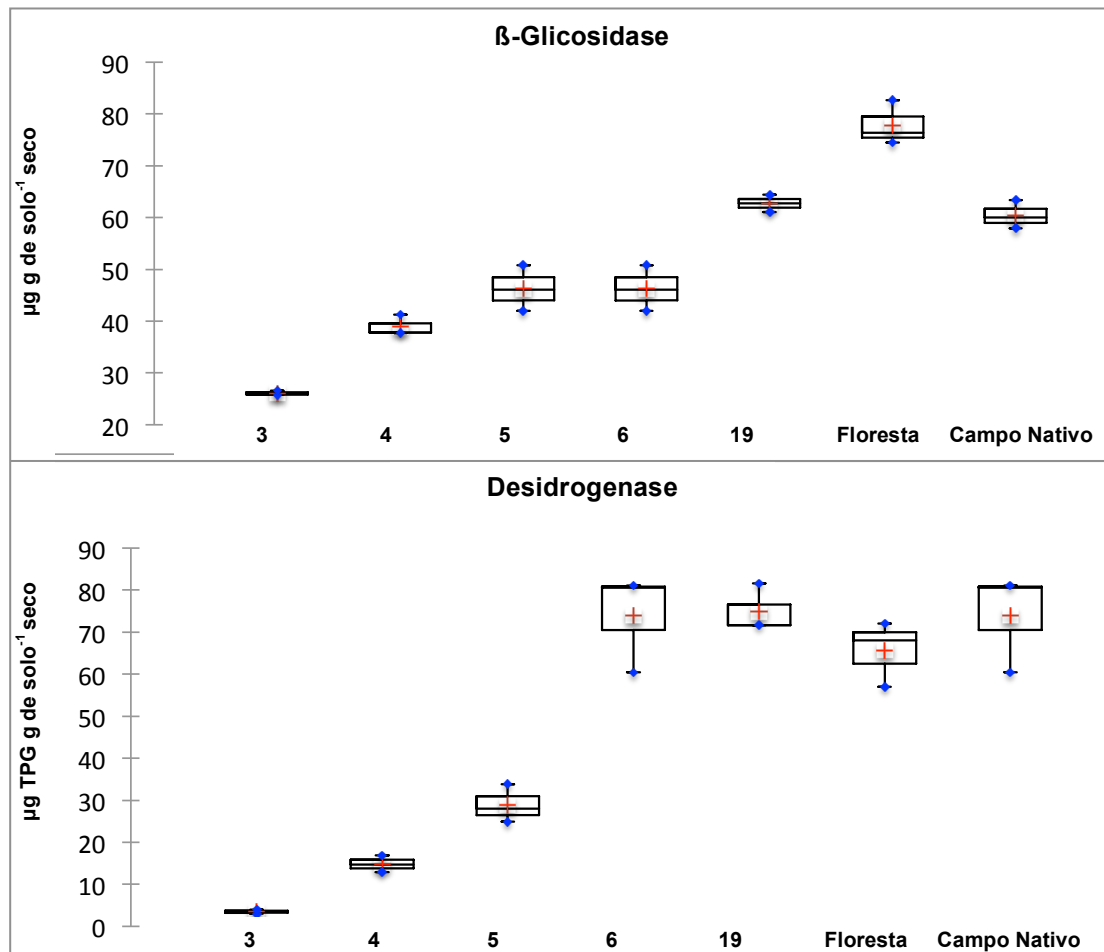
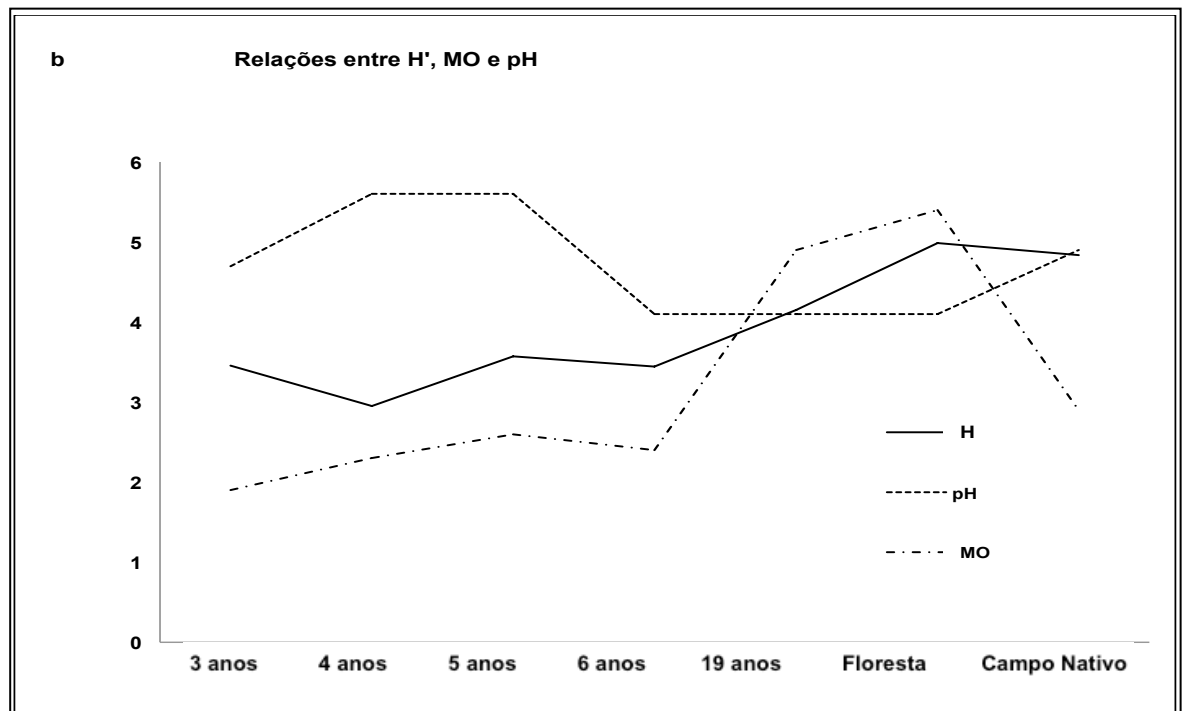
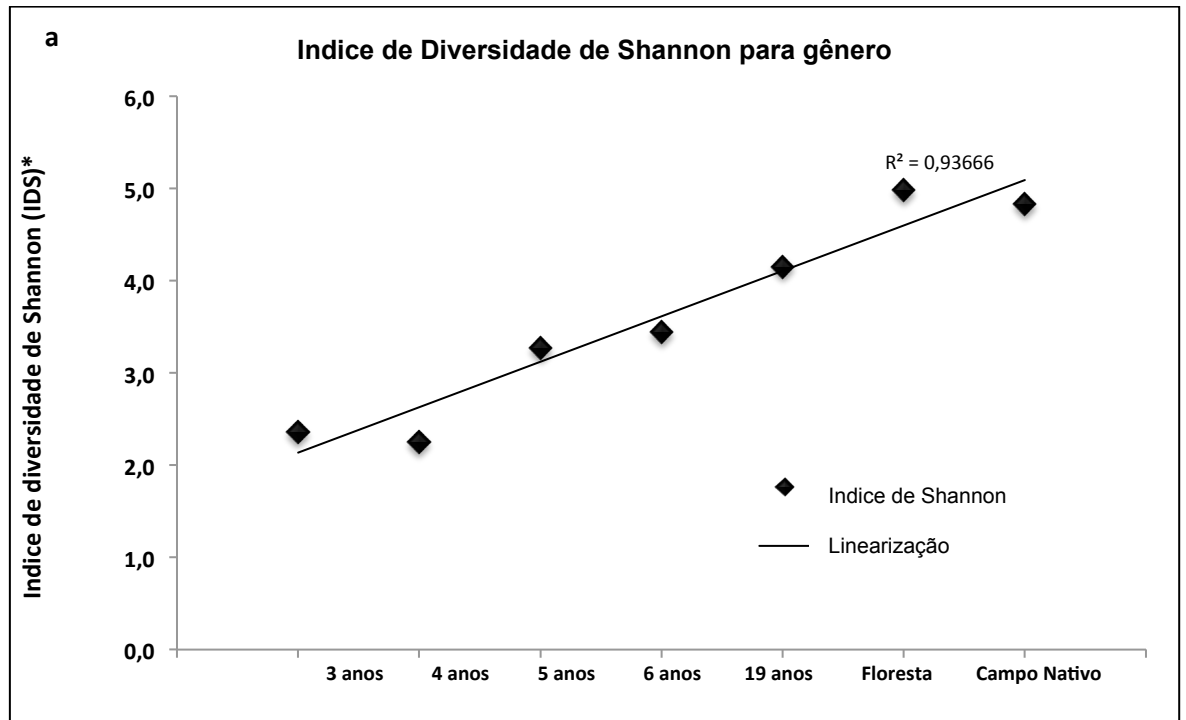


FIGURA 3.4. Boxplot representando a concentração das enzimas β -glicosidase e desidrogenase (enzimas por grama de solo seco) dos solos construídos com 3, 4, 5, 6, e 19 anos de idade, em comparação com áreas de floresta e campo nativo. Valores representam a média entre 6 repetições.

3.4.3 Diversidade da comunidade microbiana

Com o sequenciamento Illumina, foram obtidas 20.516.155 leituras de sequências do gene 16S rRNA de todos os solos construídos, florestas e áreas campestres, compondo 455.759 seqüências após a limpeza. Os domínios Bacteria e Archaea foram distribuídos dentro de 24 filos, 46 classes, 95 ordens, 191 famílias, 525 gêneros e 2.005 espécies. O índice de diversidade microbiana foi realizado em nível de gênero (Figura 3.5 a). Como esperado, a diversidade microbiana foi menor nos solos construídos, apresentando incrementos com o passar do tempo desde a construção do solo. Os solos de floresta e campo nativo apresentaram diversidade significativamente maior em comparação com os solos construídos. O solo com a maior diversidade foi o solo da floresta, e o solo com a menor diversidade

microbiana foi o de quatro anos (Figura 3.5a). Solos de campo nativo apresentaram baixo teor de MO, porem alta diversidade microbiana.



*Média entre 6 repetições de cada amostra.

FIGURA 3.5. Índice de diversidade de Shannon (H) para gênero em todos os solos estudados (a), relação entre H, MO (matéria orgânica) e pH (b).

Correlações foram calculadas para se observar a relação entre o índice de diversidade de Shannon (H), as características biológicas do solo e os teores de matéria orgânica (Tabela 3.2). Correlações positivas foram observadas entre H e biomassa microbiana, atividade da enzima β -glicosidase, respiração microbiana, e teor de matéria orgânica.

As correlações positivas do H com a biomassa microbiana, respiração microbiana e atividade da enzima desidrogenase, indicando que esses parâmetros são úteis na avaliação de comunidades microbianas do solo.

TABELA 3.2. Correlação de Spearman entre índices de diversidade de Shannon (H), C-respiração, C-biomassa microbiana, qCO_2 e matéria orgânica (MO).

Correlação de Spearman ($p < 0.001$)	Biomassa microbiana	Desidrogenase	β - glicosidase	CO ₂ -Respiração microbiana	qCO_2	H
Biomassa Microbiana	1.00	0.60	0.89	0.81	-0.38	0.76
CO ₂ -Respiração microbiana	0.81	0.55	0.85	1.00	0.20	0.87
qCO_2	-0.38	-0.29	-0.18	0.20	1.00	0.10
H	0.76	0.46	0.82	0.87	0.10	1.00
Matéria Orgânica	0.86	0.68	0.99	0.89	-0.17	0.86

3.4.4 Composição da comunidade microbiana

A composição dos microrganismos dos solos estudados variou bastante (Figura 3.6). No solo de três anos de idade, apenas seis filos foram detectados (Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia, e Actinobacteria). Em solos com quatro, cinco, seis e 19 anos de idade, entre oito e 10 filos diferentes foram detectados. No solo de floresta e campo nativo, entre 20 e 22 filos diferentes foram detectados, respectivamente.

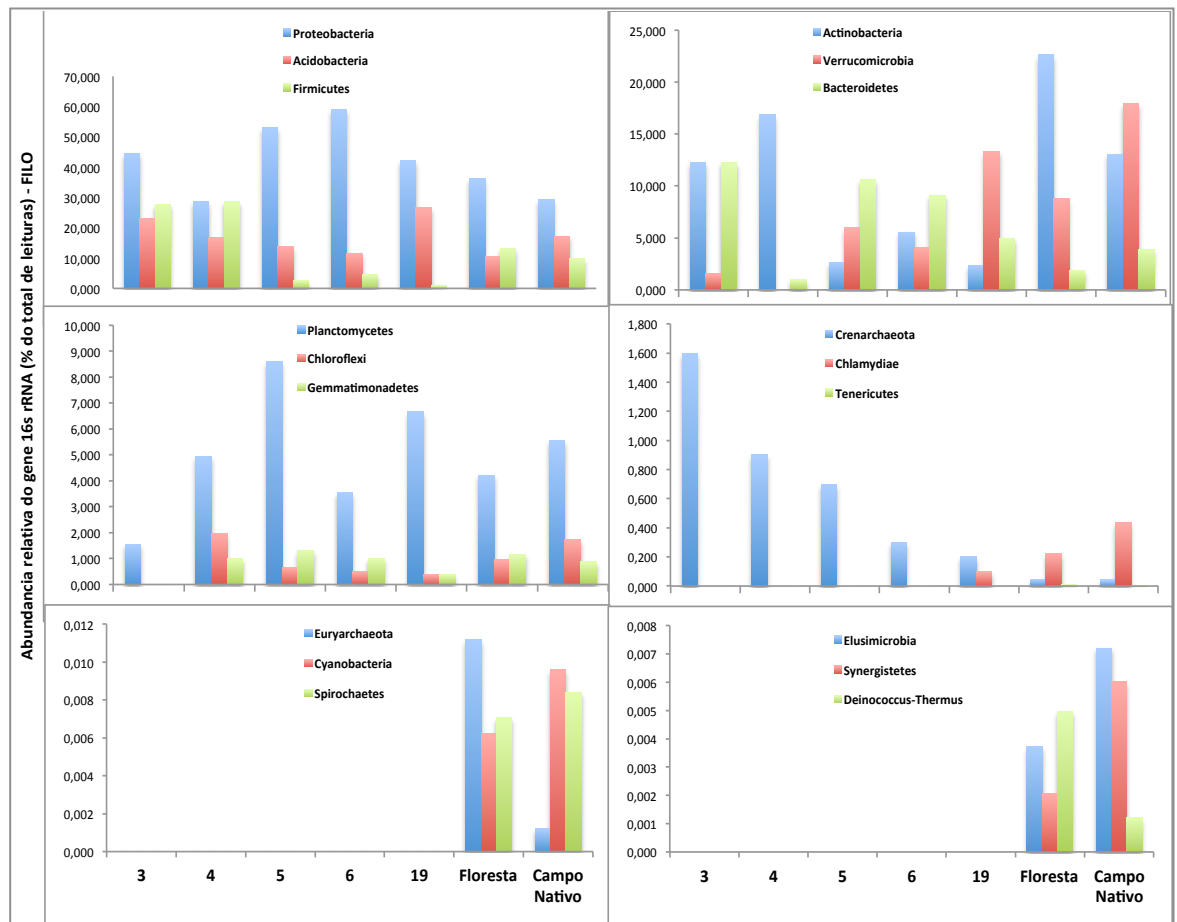


FIGURA 3.6. Abundância relativa (%) do gene 16S rRNA nos solos de 3 a 19 anos de idade após construção, em floresta controles e em campo nativo, para o nível de filo.

Em geral para todos os solos estudados, os filos mais abundantes foram Proteobacteria, Acidobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes e Verrucomicrobia. Proteobacteria foi o filo mais bem distribuído e abundante nos solos construídos. A abundância do filo Verrucomicrobia foi mais maior em solos de floresta, e apresentou um incremento com a idade de construção dos solos. Contrariamente, os filos Crenarchaeota e Firmicutes foram mais abundantes nos solos mais novos, apresentando um decréscimo na abundancia relativa com o aumento da idade dos solos. O comportamento destes filos pode indicar um padrão de sucessão microbiana. Os membros do filo Crenarchaeota são metabolicamente muito diversos, e podem crescer em condições ambientais extremas, tais como em altas temperaturas e salinidade ou pH extremos. Surpreendentemente, Euryarchaeota, Deinococcus-Thermus,

Spirochaetes, Synergistetes, Tenericutes, Cyanobacteria e Elusimicrobia, foram detectados apenas nos solos de floresta e campo nativo.

Os filos foram agrupadas através da análise dos componentes principais / PCA (Figura 3.7). A contribuição de cada observação (abundância relativa 16S rRNA gene de cada filo, em cada site) foi agrupada dentro de F1 e F2 (componentes com maiores cossenos quadrados). Os sites construídos a partir de 3 a 6 anos de idade foram agrupados. O solo de 19 anos de construção, bem como solos de floresta e de campo nativo, não foram agrupados, ficando isoladamente distantes dos solos construídos mais novos.

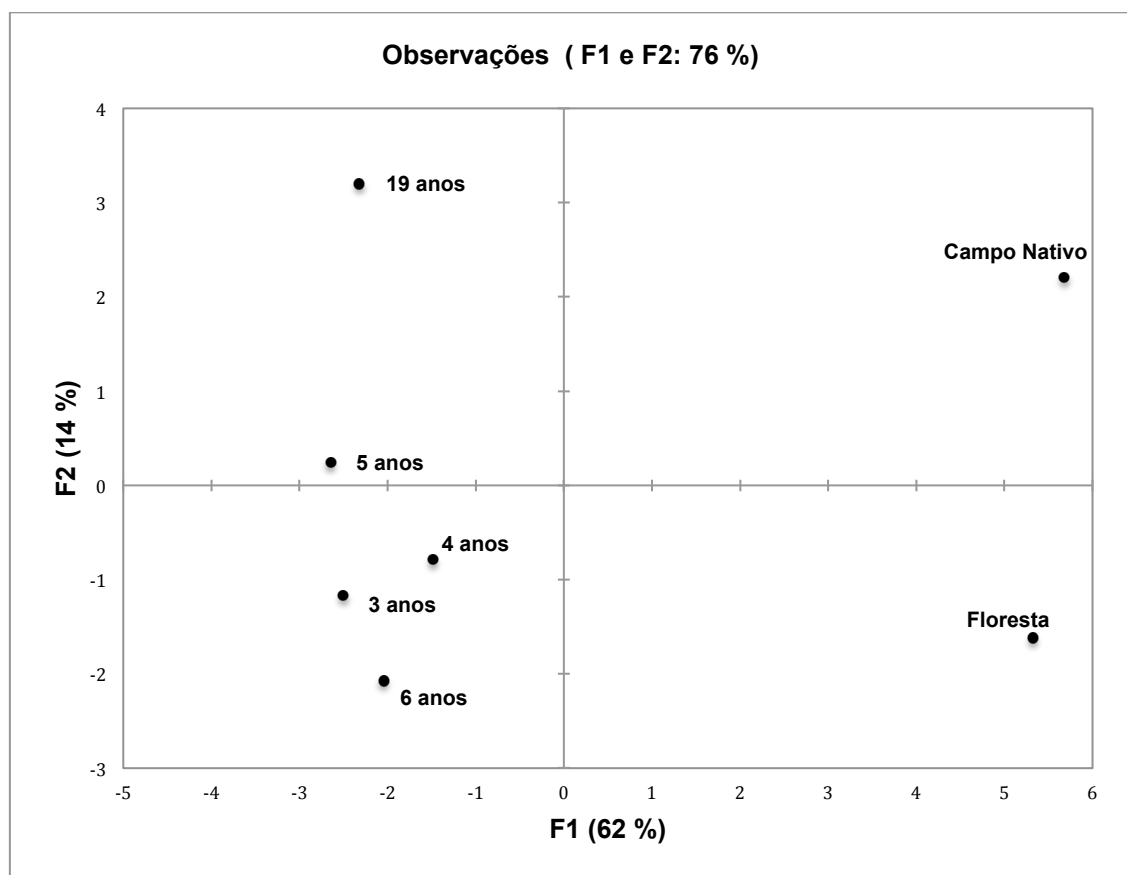


FIGURA 3.7. Análise dos componentes principais / PCA. Plotagem representando os solos com 3 a 19 anos após a construção, floresta e campo nativo, agrupados de acordo com as semelhanças entre as comunidades microbianas.

TABELA 3.3. Tabela mostrando os 20 gêneros mais abundantes de cada solo estudado (em negrito na coluna).

Gênero	Abundancia relativa do gene 16S rRNA (% do total de leituras)			
	3-6 anos*	19 anos	Floresta	Campo Nativo
<i>Acidovorax</i>	0.55	0.00	0.10	0.04
<i>Acinetobacter</i>	0.50	0.00	0.00	0.01
<i>Actinoallomurus</i>	0.00	0.00	0.76	0.68
<i>Actinomadura</i>	0.00	0.00	0.49	0.42
<i>Actinoplanes</i>	0.06	0.00	0.65	0.15
<i>Aetherobacter</i>	0.06	0.20	0.21	0.15
<i>Afipia</i>	0.45	0.60	0.08	0.05
<i>Bacillus</i>	0.00	0.00	5.74	4.79
<i>Bacteroides</i>	1.21	0.00	0.00	0.02
<i>Bradyrhizobium</i>	0.00	0.00	6.37	2.75
<i>Burkholderia</i>	0.25	0.40	1.59	1.08
<i>Ca. Koribacter</i>	0.06	1.19	0.45	0.56
<i>Ca. Solibacter</i>	0.00	0.70	0.17	0.19
<i>Chthoniobacter</i>	0.00	0.40	0.26	0.73
<i>Desulfuromonas</i>	1.15	0.00	0.00	0.00
<i>Devosia</i>	0.55	0.20	0.04	0.03
<i>Flavisolibacter</i>	0.50	0.30	0.22	0.15
<i>Flavobacterium</i>	0.42	0.10	0.05	0.42
<i>Gardnerella</i>	0.77	0.00	0.00	0.00
<i>Geobacter</i>	1.13	0.10	0.31	0.23
<i>Legionella</i>	0.06	0.20	0.05	0.09
<i>Leptothrix</i>	0.87	0.20	0.09	0.18
<i>Lysobacter</i>	0.00	0.40	0.03	0.01
<i>Mesorhizobium</i>	0.00	0.00	0.49	0.28
<i>Methylobacterium</i>	0.19	0.00	0.27	0.02
<i>Methylocystis</i>	0.74	0.00	0.00	0.00
<i>Micromonospora</i>	0.00	0.10	0.54	0.25
<i>Mucilaginibacter</i>	0.06	0.20	0.13	0.04
<i>Mycobacterium</i>	0.00	0.01	1.61	0.66
<i>Niastella</i>	0.00	0.30	0.06	0.07
<i>Nocardioides</i>	0.38	0.00	0.27	0.05
<i>Novosphingobium</i>	3.84	0.00	0.00	0.00
<i>Opitutus</i>	0.17	0.30	0.02	0.11
<i>Paenibacillus</i>	0.83	0.10	4.41	2.55
<i>Paucimonas</i>	0.00	0.00	0.33	0.00
<i>Pelomonas</i>	1.38	0.10	0.00	0.00
<i>Phenylobacterium</i>	0.00	0.50	0.56	0.37
<i>Planosporangium</i>	0.00	0.00	0.97	0.79
<i>Pseudomonas</i>	1.09	0.10	0.01	0.06
<i>Ralstonia</i>	1.02	0.00	0.04	0.03
<i>Rhodoplanes</i>	0.00	1.09	1.28	0.94
<i>Solobacterium</i>	1.15	0.00	0.00	0.00
<i>Sphingomonas</i>	3.24	0.79	2.72	2.27
<i>Steroidobacter</i>	0.17	0.50	0.02	0.02
<i>Streptomyces</i>	1.15	0.00	0.83	0.27
<i>Terrimonas</i>	0.00	0.30	0.07	0.11
<i>Thiobacillus</i>	8.50	0.00	0.01	0.01
<i>Variovorax</i>	0.55	0.60	0.18	0.06

Apenas os valores em negrito na COLUNA representam os 20 gêneros mais abundantes para cada categoria (valores em cinza não são significativos para a categoria). * Os solos entre 3 e 6 anos de construção apresentaram resultados muito semelhantes, e então os valores médios para cada gênero foram agrupados dentro da mesma categoria de solo.

A fim de se obter uma melhor compreensão da composição microbiana dos solos construídos, foi realizada a identificação taxonômica em nível de gênero, sendo que os 20 gêneros mais abundantes de cada solo foram estudados (Tabela 3.3). Apenas o gênero *Sphingomonas* (Proteobacteria) foi detectado em todos os solos. *Thiobacillus* (Proteobacteria) foi o gênero mais abundante em áreas de três e seis anos de idade, com uma média de 8,5% do total leituras. *Bradyrhizobium* foi o gênero mais abundante em área de floresta (6,4% do total de leituras) e o segundo mais abundante em pastagens (4,7% do total de leituras). *Bacillus* foi o gênero mais abundante pastagem (4,8% do total de leituras).

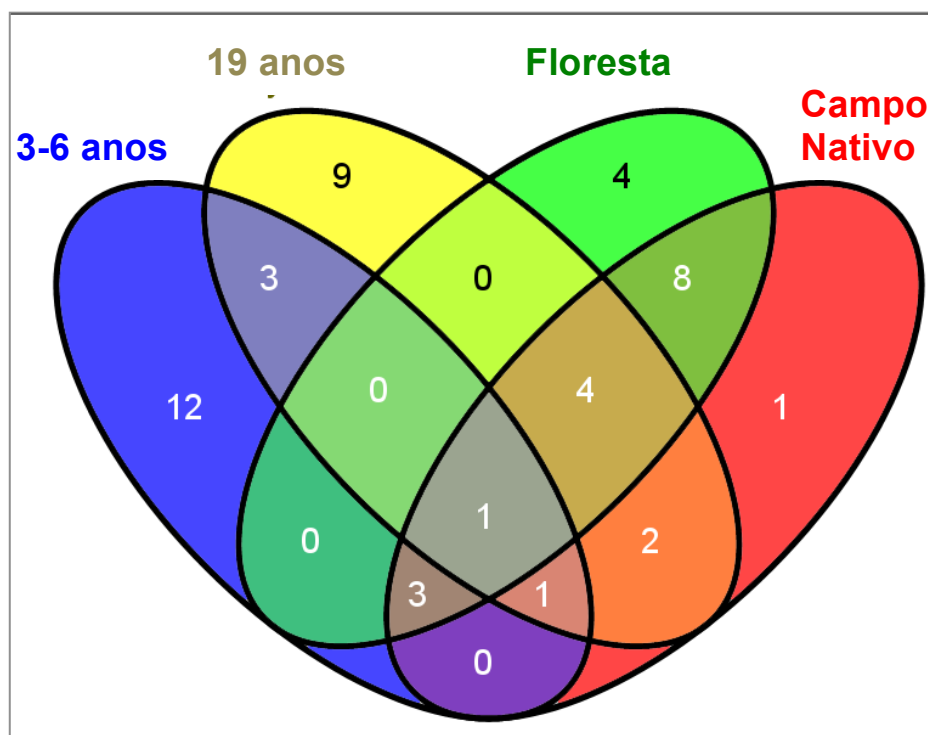


FIGURA 3.8. Diagrama de Venn que mostra a distribuição dos 20 principais gêneros mais abundantes de cada local - solos construídos, florestas e pastagens.

Um diagrama de Venn foi construído para comparar o número dos gêneros mais abundantes em comum entre os diferentes solos estudados (Figura 3.8), e indicou uma baixa diversidade beta (número de gêneros compartilhados entre dois ambientes). Comparando-se os 20 gêneros mais abundantes, cinco gêneros entre comuns entre os solos com 3-6 anos de construção e pastagens; três gêneros em comum entre os solos com 3-6 anos e floresta; quatro gêneros entre os solos com 3-6 anos e 19 anos de idade

construção; 16 gêneros em comum entre floresta e campo nativo; oito gêneros entre o solo de 19 anos de idade e campo nativo, e cinco gêneros entre o solo de 19 anos de idade e floresta.

3.5 DISCUSSÃO

Solos naturais têm comunidades microbianas estáveis que levaram milhões de anos para se formarem e desempenham um papel na regulação do sistema biogeoquímico do planeta. Perturbações antropogênicas no solo abalam o equilíbrio do ecossistema, forçando os microrganismos a se adaptarem ao novo habitat. Muitos processos fisiológicos estão envolvidos nesta adaptação, ocorrendo a supressão e/ou estimulação de comunidades microbianas específicas; certos genes que não estavam sendo expressos são ativados, assim como rotas metabólicas alternativas são ativadas para neutralizar ou degradar as substâncias tóxicas presentes no novo ambiente.

No presente estudo, foi utilizada uma combinação de análises de biologia molecular com análises químicas, físicas e biológicas, para investigar as comunidades microbianas em solos reconstruídos após mineração de carvão, e compara-las a comunidades microbianas de solos naturais (floresta e campo nativo). Os resultados mostraram que manejo de solo utilizado para a recuperação dos solos degradados na área estudada alterou drasticamente a comunidade microbiana do solo, causou uma redução na diversidade de microrganismos, bem como estimulou o crescimento de microrganismos com capacidade de biodegradação e biorremediação.

Todas as comunidades microbianas são limitados pela disponibilidade de recursos (Harder e Dijkhuizen, 1983), os quais geralmente são escassos em solos construídos devido degradação física e química do solo. O impacto ambiental da mineração de carvão provoca profundos distúrbios físicos, químicos e biológicos (Shi e Ele, 2012; Dong e Liu, 2005). Estes distúrbio altera a disponibilidade de nutrientes e, conseqüentemente, afeta o ecossistema microbiano local. Este estudo mostrou que, após a reconstrução do solo, algumas das características químicas do solo podem ser recuperados, tais

como o pH, assim como macro e micronutrientes com calagem e fertilização. Mas, a recuperação dos componentes biológicos é mais complexa, e o restabelecimento da comunidade microbiana depende do tempo e estabilização física, assim como da re-vegetação adequada do local.

Os resultados sugerem que a matéria orgânica do solo (MOS) é o principal fator de predição da biomassa e da atividade microbiana do solo após a construção. A MOS foi muito menor nos solos construídos em comparação com os solos não perturbados, e também foi altamente e positivamente correlacionada com a diversidade microbiana, biomassa microbiana, C-respiração e C-Biomassa microbiana. Uma menor atividade enzimática foi detectada nos solos construídos, bem como menor diversidade microbiana. Estes níveis foram confirmadas através dos resultados do sequenciamento do gene 16S dos solos estudados.

A MOS é uma entidade dinâmica num estado de fluxo constante (Six e Jastrow, 2002) e tem sido considerada como um indicador da qualidade do solo, pois é fonte e dreno de nutrientes para as plantas e microrganismos do solo (Chaundhry et al., 2012). Além disso, é responsável por processos biogeoquímicos e pela ciclagem de componentes orgânicos. A MOS é o principal agente de ligação que agrega as partículas do solo e viabiliza a estruturação do solo (Oades, 1984; Six et al., 1998). A interação entre a MOS, as raízes, minhocas e microrganismos, ajuda a manter as partículas do solo agregadas (Six et al., 2004).

Os microrganismos que participam da decomposição da matéria orgânica também desempenham um papel importante no processo de agregação do solo devido a liberacao de substâncias cimentantes, incluindo polissacarídeos e glomalina, que ajudam o processo de agregação e reorganização das partículas de solo (Tisdall e Oades, 1982, Chenu, 1989; Oades, 1993). Além disso, solos com alto teor de MO podem complexar elementos tóxicos e metais, reduzindo a sua disponibilidade e toxicidade em um processo químico chamado complexação (Cabaniss, 2009).

No solo de floresta (5,4% do SOM), o gênero mais abundante foi *Bradyrhizobium*, um microrganismo simbiote bem conhecido. No solo com 3 anos de construção (1,9% do SOM) o gênero mais abundante detectado foi *Thiobacillus*, um oxidante de enxofre conhecido, que é normalmente

encontrado em solos degradados (Singleton et al., 2012; Bosch et al., 2012). O solo de 3 anos apresentou teores de enxofre quase 6 vezes maiores do que em solo de floresta. Isso pode explicar a alta abundância de *Thiobacillus*.

A perda de MOS e conseqüentemente a redução da população microbiana, afetam a restauração física do solo, bem como o processo de re-vegetação (De Groot et al., 2005) em solos construídos. Solos construídos têm de ser cuidadosamente re-vegetados a fim de restaurar a MOS, bem como a estabilidade física e biológica, em conjunto. Uma vez que a vegetação é estabelecida, ela vai realizar os processos de estruturação do solo através das raízes além de fornecer MO para o solo. A diversidade de plantas é um fator que influencia os microrganismos do solo. Gruter et al. (2006) observaram que a diversidade de plantas afetou a abundância microbiana. Yin et al. (2000) demonstraram claramente que a redundância funcional de bactérias aumentou à medida que se mudou recuperou o solo degradado, e que este aumento pode estar relacionado com o restabelecimento de espécies vegetais. A diversidade total e a riqueza microbiana aumenta em proporção que aumenta a cobertura vegetal do solo (Barget, 1999). Dangi et al. (2012) demonstraram que a vegetação e microrganismos interagem em sistemas recuperados, e que a fase mais importante da recuperação ocorre entre 0 e 15 anos após a recuperação. Insam & Domsch amostraram solo em dois transectos de uma cronosequência de mineração a céu aberto, um com agricultura e outro com floresta, num período de 50 anos, e encontraram aumentos na biomassa microbiana e diminuição do qCO₂ com aumento da idade após construção do solo.

Ao comparar-se os 20 gêneros mais abundantes entre os solos estudados, observou-se apenas alguns gêneros em comum entre eles. Já entre solos de floresta e de campo nativo, 16 gêneros eram comuns entre os dois solos. Os solos construídos estudados devem oferecer diferentes nichos para os microrganismos, o que é comprovado pela caracterização química contrastante desses solos. Os gêneros que foram encontrados somente em uma categoria de solo, provavelmente encontraram condições nestes locais para estabelecerem uma população detectável com a metodologia utilizada, o que não quer dizer que não existam nas outras áreas estudadas (como em microsítios) em uma percentagem muito baixa.

Gêneros com capacidade de biodegradação e de biorremediação foram detectados em solos de 3 a 6 anos após a construção. O alto teor de pirita e enxofre em solos recentemente construídos pode explicar a elevada abundância destes microrganismos, tais como *Thiobacillus*, *Sphingomonas*, *Novosphingobium*, *Acinetobacter*, e *Variovorax*. Estas bactérias têm enzimas que podem degradar vários compostos, tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos de enxofre (Corinne et al., 2011), e 2-metilfenantreno (Nimatuzahroh et al., 1999). Yuanhu et al. (2012) isolaram uma cepa de *Sphingomonas* em solo de uma mina de carvão, que eram capazes de degradar borracha de pneu dessulfurização. Este gênero pode ter sido estimulado a crescer em solos com resíduos de carvão e alto teor de enxofre. O gênero *Novosphingobium* é capaz de degradar compostos aromáticos, tais como fenol, nitrobenzeno, e fenantreno (Sohn et al., 2004, Liu et al., 2005). *Acinetobacter* é capaz de crescer em concentrações muito elevadas de cádmio, e *Variovorax* tolera concentrações elevadas de metais pesados (Chien et al., 2008). É possível observar nos sítios com 3-6 anos de restauração, que a diversidade microbiana foi reduzida drasticamente.

O solo é um recurso não-renovável dentro da perspectiva da vida do ser humano, e a degradação do solo deve ser evitada, porque uma vez que isso aconteça, outros processos, como a arenização e a erosão profunda também podem acontecer. A importância de se encontrar critérios adequados na tomada de decisões e na implementação de planos de recuperação de solos é essencial para a indústria de mineração. A capacidade de um ecossistema de tolerar perturbações sem colapso deve ser observada, a fim de se preservar a biodiversidade do ecossistema e evitar a degradação do solo. Um processo de gestão adequada do solo é necessário, bem como o controle eficaz da erosão do solo e o monitoramento contínuo da vegetação destas áreas.

3.6 CONCLUSÃO

A perturbação causada pela mineração e, posteriormente, a construção do solo altera drástica e definitivamente a comunidade microbiana do solo. O pH e a concentração de metais pesados foram estabilizados com o tempo. A biomassa microbiana e a diversidade aumentaram com o tempo após a restauração do solo, porém não atingiram seus níveis originais, os quais foram encontrados nos solos de floresta e de campo nativo. A comunidade microbiana dos solos perturbados é bem menos complexa do que a de solos não perturbados, apresentando poucos microrganismos dominantes e milhares de microrganismos raros. As práticas de manejo do solo afetam diretamente a comunidade microbiana.

4. CAPITULO II

***TILLAGE SYSTEM AND CROP ROTATION EFFECT ON SOIL MICROBIAL DIVERSITY AND COMPOSITION IN A SUBTROPICAL ACRISOL**

* Publicado na revista Diversity/MDPI, em outubro de 2012.

4.1 ABSTRACT

Agricultural management alters physical and chemical soil properties, which directly affects microbial life strategies and community composition. The microbial community drives important nutrient cycling processes that can influence soil quality, cropping productivity and environmental sustainability. In this research, a long-term agricultural experiment in a subtropical Acrisol was studied in south Brazil. The plots at this site represent two tillage systems, two nitrogen fertilization regimes, and three crop rotation systems. Using Illumina high-throughput sequencing of the 16S rRNA gene, the archaeal and bacterial composition was determined from phylum to species level for the different plot treatments. The relative abundance of these taxa was correlated with measured soil properties. The P, Mg, total organic carbon, total N and mineral N were significantly higher in no tillage system. The microbial diversity was higher in no-tillage system at order, family, genus and species level. In addition, overall microbial composition changed significantly between conventional tillage and no-tillage systems. Anaerobic bacteria such as clostridia dominate in no-tilled soil as well as anaerobic methanogenic archaea, which were detected only in the no-tillage system. Microbial diversity was higher in plots in which only cereals (oat and maize) were grown. Soil management influenced soil biodiversity on Acrisol by change of composition and abundance of individual species.

4.2 INTRODUCTION

Agricultural management affects soil chemical, physical and biological features. Tillage typically involves complete removal of vegetation followed by plantings often designed to completely switch the crop cover from the previous year, and this process increases soil erosion and degradation, which triggers many changes in the soil community composition (Lee, 1985; Edwards and Bohlen, 1996; Chan, 2001; Fierer et al., 2012; Hobbs et al., 200). Tillage also results in nitrous oxide (N₂O) and carbon dioxide (CO₂) emission to the atmosphere (Bayer et al., 2006; Omonode et al., 2011). When the soil is not tilled, these gases remain stored within soil pores, which significantly reduces field emissions of these greenhouse gases (Lal, 1987).

No-tillage is a sustainable cropping management system that protects soil, water, air, and biodiversity (Hoobs et al., 2007; Campbell et al., 1996; Calegari et al., 2008), and authors have shown that even a reduction in tillage leads to increased microbial activity and biomass in contrast to surface soil under conventional tillage (von Lützow et al., 2002; Feng et al., 2003). Agricultural areas under no-tillage systems are increasing worldwide largely as result of improved soil conservation efforts. In recent years, the United States, Brazil, and Argentina have converted about 26, 25, and 20 million hectares, respectively, into no-tillage cropping systems (Derpsch et al., 2010). The residues left on soil after harvest increase soil organic matter (SOM), conserve soil moisture, and reduce soil temperature in summer (Wang et al., 2011). Feng (2003) found that a no-till management system led to significantly higher soil organic carbon (SOC) and microbial biomass in the soil surface compared to the conventional tillage treatment. Wang (2011) found significant increases in

soil N, organic C and SOM fraction with no-tillage system, while conventional tillage had deleterious impact on soil microbial biomass and also reduced SOC.

In conventional tillage and no-tillage systems, nitrogen (N) fertilization and crop rotations also are factors that can modify soil quality and fertility thereby affecting microbial community composition. Recent studies have demonstrated that microbial community composition changes with N fertilizer. Fierer et al. (2012) showed that N addition can result in a shift of microbial composition from oligotrophic to copiotrophic bacteria. Lu et al. (2011) showed that all nitrogen cycle processes increased with N addition. The crops rotation where predominates plants that are succulent and rich in proteins and sugars, such as legumes, release nutrients more quickly, whereas plants that are more fibrous, such as grasses and cereals, release nutrients more slowly, but promote more stable organic matter (Sarrantonio and Gallandt, 2003). Systems that increase inputs of C and N through inclusion of legumes or fibrous rooted crops in the crop rotation may increase microbial populations and activities. After the harvest, the cover crop residues that are left on the soil, improve soil fertility since they release nutrients to soil. Conventional tillage releases the nutrients more quickly because the residues are crushed and mechanically incorporated to soil, which stimulates microorganisms that degrade organic matter. In no-tillage conditions, the nutrient releasing is progressive, since the residues remain on the soil surface and therefore decomposition is slower. The crop rotation composition and the tillage management, together, determine the soil C:N ratio, which has significant effect on microbial composition (Fierer et al., 2009), crop residue decomposition, and crop nutrient cycling.

The aim of this study was to understand how microbial diversity and composition change with agricultural management, as well as, to find relationships between microorganism's taxa and soil features. High-throughput sequencing of the 16S rRNA gene was used to determine how microbial diversity and composition changes in response to tillage, crop rotation, and N fertilization. The sequencing data was used to measure the relative abundance of operational taxonomic units (OTUs) and to calculate the Shannon diversity index (SDI) of soil samples. These data were then correlated to several measurable properties of soil to reveal any relationships.

4.3 MATERIAL AND METHODS

4.3.1 Site description

This study was based on soil samples collected in a 27-year-old experiment, at the Agronomical Experimental Station from Federal University of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. This site has a subtropical climate with the geographic coordinates 30°50'52"S, 51°38'08"W. The local annual mean temperature is 19.4°C, and the average rainfall is 1440 mm. The soil is classified as Acrisol according to FAO classification system and as Typic Paleudult by US taxonomy, with 54% sand, 24% silt, and 22% clay. The clay fraction type is composed mainly of kaolinite (720 g kg⁻¹) and iron oxides (109 g Fe₂O₃ kg⁻¹) (Bayer et al, 2000). The experiment began in 1985, and before this, the soil had been degraded, eroded, and compacted due to 15 years under a conventional tillage system causing extensive soil disturbance and erosion (Bayer et al., 2001).

4.3.2 Experimental design and treatments

The experiment was a randomized block design with split-plots for two regimes of soil tillage, three different rotation systems, and two mineral N rates, on three field replicates for a total of 36 plots. The soil-tillage regimes were conventional tillage and no-tillage. In conventional tillage, total crop residue was incorporated into the soil by disk plow with two disks with a soil disturbance depth of about 20 cm. In the no-tillage system, crop residues were maintained on the soil surface since 1985. Three crop rotations were selected in order to obtain wide variation of quality crop residue addition to the soil, varying between cereals and legumes. These rotations were as follows:

a) oat (*Avena strigosa* Schreb) + common vetch (*Vicia sativa* L.) during winter / maize (*Zea mays* L.) + cowpea (*Vigna unguiculata* L.) during summer;

b) oat during winter/ maize during summer;

c) vetch during winter / maize during summer.

The two levels of N fertilization were without N and 180 Kg ha⁻¹. Every year 50 kg ha⁻¹ of P₂O₅ (as single or triple superphosphate) and 50 kg ka⁻¹ of K₂O (as KCl) were applied on the plots. Irrigation and phytosanitary treatments were applied when necessary.

4.3.3 Soil sampling

Soil samples were collected from 1 to 10 cm layer, with sterile 30 mm wide cores in the middle of each plot. Three subsamples were collected from each plot. The samples were immediately frozen until further analyzes could be performed.

4.3.4 Chemical analysis

Soil subsamples were room temperature dried and sieved (0.2-mm sieve). pH, P-Mehlich, Ca, Mg, Al were analyzed following methodology of Tedesco et al (1995). Total organic carbon (TOC) was analyzed using Walkley Black procedure (Page et al., 1982).

4.3.5 DNA extraction and PCR

For each sample, DNA was isolated from 0.5 g of soil using the MoBio PowerSoil™ DNA Isolation Kit (Carlsbad, CA, USA). Extractions were performed according to the manufacturer's protocol. All genomic DNA concentration and purity was determined by NanoDrop spectrophotometry (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). PCR was performed at an initial denaturation temperature of 94°C for 3 min, followed by 20 cycles of 94°C for 45 sec, 53°C for 30 sec, and 65°C for 90 sec. A final elongation step at 65°C was run for 10 minutes. PCR products were purified using the Qiagen™ PCR purification kit following the manufacturer's protocol with the exception of eluting in sterile water (Qiagen, Valencia, CA, USA) and quantified in Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, NY, USA).

4.3.5 Illumina high-throughput sequencing of 16S rRNA genes

Primers 515F and 806R (Caporaso et al., 2010) were used to target the V4 region of the 16S rRNA gene with the addition of a barcoded sequence and the required Illumina adapters. Sequencing was performed on an Illumina (Illumina, Inc., CA, USA) with two paired-end read cycles of 101 bases each. Sequence analysis and OTU identification was based on the methods of Giongo (Giongo et al., 2010) and Fagen et al. (2012). Reads were trimmed to remove low quality bases and to remove the first 11 bases corresponding to the primer region by a script based on Trim2 (Huang et al., 2003) (source available at: <https://gist.github.com/1006830>), and then the reads were separated by barcode (source available at: <https://gist.github.com/1006983>). Paired reads were assembled using CLC Assembly Cell v3.0.2b to the reference Ribosomal Database Project (RDP) (Cole et al., 2009) 16S SSU rRNA database. Full taxonomic descriptions based on the NCBI taxonomy database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) were generated for the entries in the RDP database using TaxCollector (Giongo et al., 2010). Matches were filtered at 80% length fraction and classified at the 80% identity level for domain and phylum, 90% identify level for class, order and family, 95% identity level for genus, and 99% identity level for species. The total number of pairs matching 16S rRNA sequences in the database at each level of similarity created an OTU abundance matrix for each level of taxonomy across samples. Pairs that did not match to the same sequence in the RDP database were annotated according to their Last Common Ancestor (LCA), and pairs that did not have an LCA, or any match in the RDP database, were considered to be unclassified. To normalize for varying sequencing depths, the OTU abundance matrices for each sample were divided by the total number of pairs after trimming.

4.3.6 Statistical analysis

A T-test, Tukey test, PCA, and Spearman correlations were performed using XLSTAT-Pro 2011 (Addinsoft's core software). To integrate Spearman correlations analysis, only the OTUs with relative abundance equal or higher than 0.05% of total reads (cutoff) were used. To perform correlation-based PCA ($p \leq 0.01$), the data was normalized in order to have the same (=1)

variance of the samples along all species axes. For this, the mean count was subtracted from each genus or family's relative abundance, and then it was divided by the standard deviation $[(\text{genus/family abundance} - \text{mean}) / \text{standard deviation}]$. Shannon diversity index (SDI) was estimated for each sample, considering the total reads (classified + unclassified) using the script found in <https://gist.github.com/3078251>.

4.4 RESULTS

In total, 1,364,311 reads were obtained from Illumina sequencing after trimming, with 609,664 from tillage and 754,647 from no-tillage plots. The Bacteria and Archaea classified in this work were distributed among 30 phyla (classified reads = 66%), 45 classes (classified reads = 60%), 99 orders (classified reads = 55%), 241 families (classified reads = 53%), 986 genera (classified reads = 45%) and 4,622 species (classified reads = 25%).

The SDI of the samples was used to determine how microbial diversity changed with different treatments (Table 4.1), also considering clustered unclassified reads. At the phylum level, the SDI was highest in the samples that experienced conventional tillage fertilized with 180 kg N ha⁻¹, and cultivated with cereal only (oats/maize). Although one sample had undergone conventional tillage and another sample no tillage, at the class level, the SDI was highest in the two samples in which no N was added and only cereals were cultivated. At the order, genus and species levels, SDI was highest in the sample from a no-tillage system, without N, and only cereal cultivation. At the family level, the SDI was highest in a sample from a plot with no-tillage, 180 kg N ha⁻¹ and only cereal cultivation.

TABLE 4.1. Shannon diversity index to phylum, class, order, family, genus and species level, to each treatment. Numbers followed by the same letters on the **columns**, are not different by Tukey test, under p-value ≤ 0.01 . The numbers in bold, indicate the highest significant SDI values from each taxonomy level.

	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
Tillage, no N (oat+vetch/maize+cowpea)	0.16 abc	3.48 b	3.59 abc	3.68 abc	5.29 bcd	5.29 bcd
Tillage, 180 kg N/ha⁻¹ (oat+vetch/maize+cowpea)	0.08 cd	3.43 b	3.45 c	3.47 bc	5.20 cd	5.20 cd
Tillage, no N (oat/maize)	0.21 ab	3.87 a	3.93 ab	3.93 ab	5.73 ab	5.73 ab
Tillage, 180 kg N/ha⁻¹ (oat/maize)	0.23 a	3.68 ab	3.73 abc	3.76 abc	5.53 abc	5.53 abc
Tillage, no N (vetch/maize)	0.17 abc	3.64 ab	3.62 abc	3.67 abc	5.33 d	5.33 d
Tillage, 180 kg N/ha⁻¹ (vetch/maize)	0.16 abc	3.53 ab	3.58 bc	3.62 abc	5.21 bcd	5.21 bcd
No tillage, no N (oat+vetch/maize+cowpea)	0.02 d	3.43 b	3.42 c	3.54 abc	4.89 d	4.89 d
No tillage, 180 kg N/ha⁻¹ (oat+vetch/maize+cowpea)	0.14 abc	3.54 ab	3.57 bc	3.64 abc	5.29 bcd	5.29 bcd
No tillage, no N (oat/maize)	0.13 bc	3.88 a	3.96 a	3.94 ab	5.85 a	5.85 a
No tillage, 180 kg N/ha⁻¹ (oat/maize)	0.18 abc	3.77 ab	3.89 ab	3.98 a	5.59 abc	5.59 abc
No tillage, no N (vetch/maize)	0.19 ab	3.74 ab	3.73 abc	3.72 abc	5.45 abc	5.45 abc
No tillage, 180 kg N/ha⁻¹ (vetch/maize)	0.16 abc	3.43 b	3.40 c	3.42 c	5.11 cd	5.11 cd

P content in samples from no tillage system were two-fold higher than in conventional tillage (Table 4.2). Also Mg, TOC, total N and mineral N were significantly higher in no tillage, indicating an increasing in soil fertility within this system. Considering the crop rotations, pH and P content was higher where cereals were grown all year (oat and maize). TOC, total N and mineral N were significantly higher where cereals and legumes were grown together in the summer and winter successively. P, Ca, and Mg were significantly higher where

no N fertilization was added, and Al and mineral N was higher where 180 kg N ha⁻¹ were added.

TABLE 4.2. Soil features measured on samples from the different treatments. Asterisk indicates significant difference between the correspondent treatments on the line, by qui-square test. Numbers followed by the same letter are not statistically different by Tukey test under p-value \leq 0.01.

	Soil Tillage System		Crop System			N Fertilization Level	
	Tillage	No Tillage	O+V/M+C	O/M	M/O	0 kg N ha ⁻¹	180 kg N ha ⁻¹
pH	5.2	5.2	5.0 b	5.6 a	4.9 b	5.4	5.0
P (mg dm ⁻³)	13.7	29.1*	21.1 b	27.8 a	17.6 b	25.7*	19.4
K(mg dm ⁻³)	161	156	157	166	150	162	155
Al (cmol _c dm ⁻³)	0.5	0.5	0.6 b	0.1 a	0.9 b	0.3	0.7*
Ca (cmol _c dm ⁻³)	2.3	2.6	2.5	2.9	2.1	2.9*	2.2
Mg (cmol _c dm ⁻³)	1.2	2.6*	1.4	1.5	1.2	1.5*	1.2
TOC (%)	1.17	1.52*	1.54 a	1.20 b	1.37 b	1.32	1.38
Total N (%)	0.096	0.127*	0.127 a	0.099c	0.11 b	0.110	0.114
Min. N (mg kg ⁻¹)	5.24	6.90*	8.66 a	2.48 c	7.29 b	5.12	6.58*

Among the phyla, Proteobacteria was the most abundant and was well represented in all treatments (Figure 4.1a). Verrucomicrobia, Firmicutes, Crenarchaeota, Chlamydiae, Euryarchaeota, and Chlorobi were significantly more abundant in samples from no-tillage systems (Figure 4.1). On the other hand, Gemmatimonadetes, Cyanobacteria, and Deinococcus-Thermus, were significantly more abundant in the samples from tilled systems (Figure 4.1). Among the archaeal phyla detected, Crenarchaeota, Thaumarchaeota and Euryarchaeota presented low relative abundance (less than 0.7%), but were significantly more abundant in the no-tillage system.

The 20 most abundant genera for both treatments were analyzed and the differences were represented in a heatmap (Figure 4.2). The relative abundances of *Sphingomonas*, *Candidatus Koribacter*, *Flavisolibacter*, *Burkholderia*, *Phenylobacterium*, *Streptomyces*, *Mycobacterium* and *Mucilaginibacter* were significantly higher in conventional tillage system. On the other hand, *Clostridium*, *Geobacter*, *Rhodoplanes*, *Duganella* and *Sphingobacterium* were significant higher in no tillage samples. Also, a range of archaeal methanogens, such as *Methanobacterium*, *Methanolinea*, *Methanomethylovorans*, *Methanoregula* and *Methanosarcina* (both anaerobe,

Euryarchaeota), were found in no-tillage samples that were not detected in samples from the tilled system (data not shown).

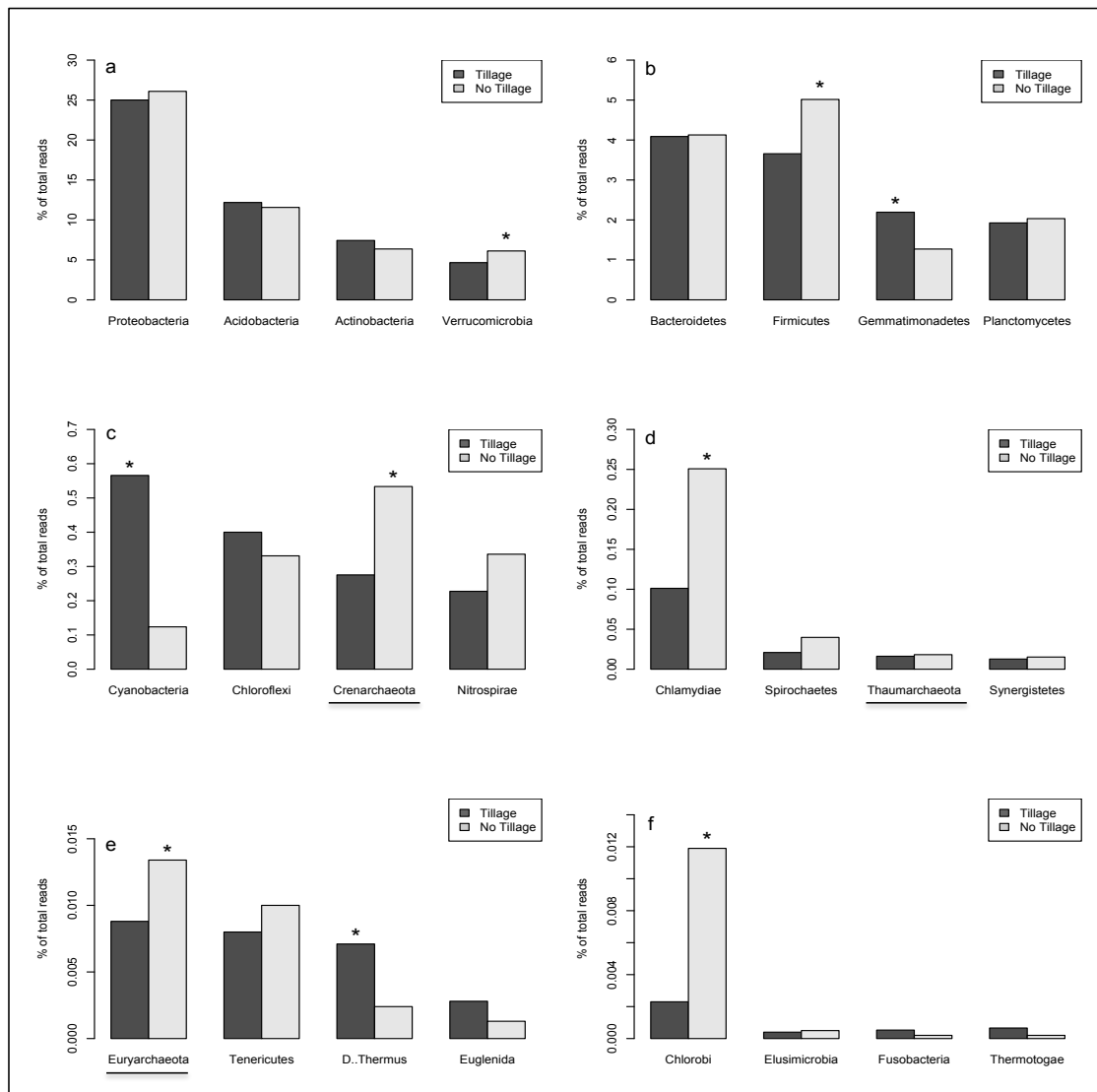
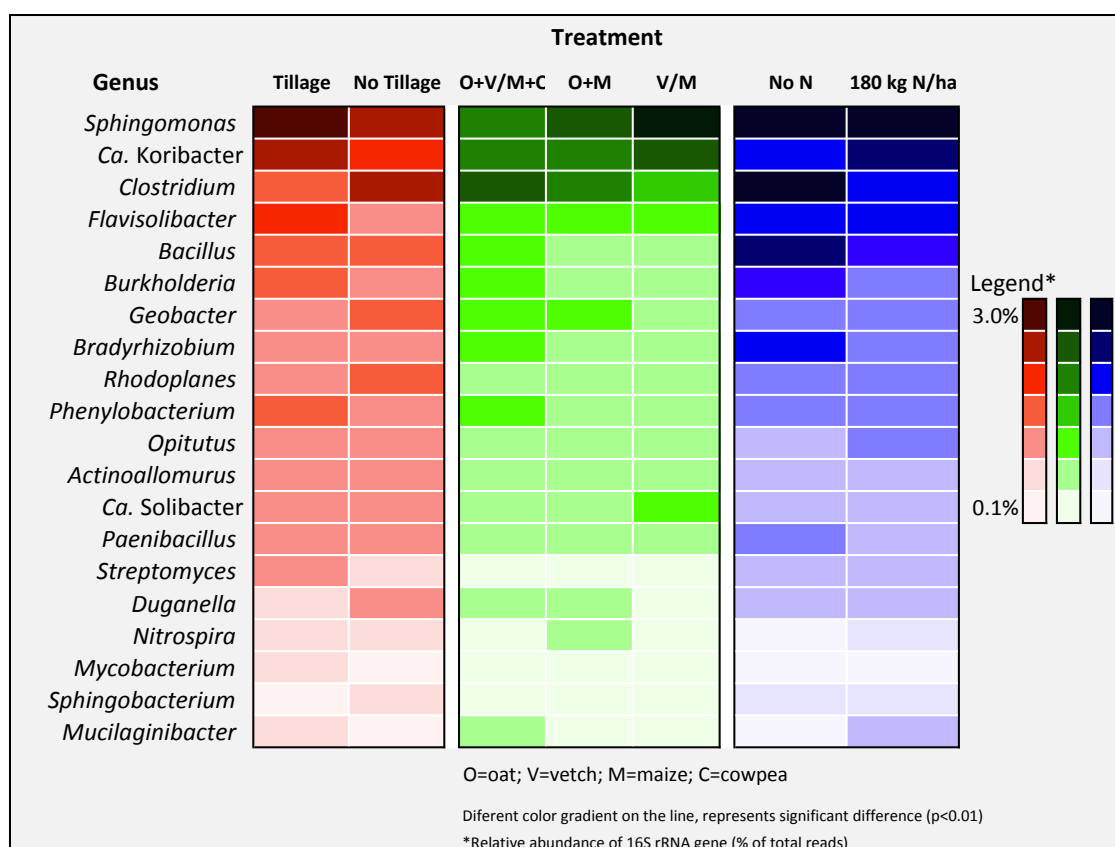


FIGURE 4.1. Relative abundance of 16S rRNA gene (% of total reads) to phylum level, in an Acrisol under conventional tillage and no-tillage soil management. Asterisk expresses that the average differs statistically by Tukey test, at p-value ≤ 0.01. The archaeal phyla are underlined.

Among the rotation systems, *Clostridium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, and *Phenylobacterium* were relatively more abundant in samples from those crop rotations that included a mix of legumes and cereals during all the year (Figure 4.2). In the cereal/legume plots, *Sphingomonas*, *Ca. Koribacter* and *Ca. Solibacter* were significantly more abundant than in the

other two crop rotation systems. *Geobacter* was less abundant in legume/cereal rotation.

Clostridium, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium* and *Paenibacillus* (nitrogen fixers) were significantly higher in plots with no added N, compared to those with added N. *Ca. Koribacter*, *Opiritus*, *Nitrospira* and *Mucilaginibacter* relative abundances were higher in those plots with added N (Figure 4.2).



* Relative abundance of 16S rRNA gene (% of total reads).

FIGURE 4.2. Heatmap illustrating the 20 most abundant genera, in the three treatments. Different gradient color on the line represents significant difference (p-value ≤ 0.01) by Tukey test.

The most abundant UTUs from each taxonomic level were correlated with tillage system and with chemical soil features (pH, TOC, Ca, Mg, P, K and Al) by Spearman correlation with a significance level of 0.1 (alpha < 0.001), and a correlation matrix was created. Only those taxa that represented at least 0.05% of total reads (using an average of 6 replicates from each OTU) were used to

calculate Spearman correlation. Just those values with a significant rho above 0.5 are shown here (Tables 4.3 and 4.4).

TABLE 4.3. Spearman correlations (p-value ≤ 0.01) of the most correlated organisms with conventional tillage and no-tillage. The correlated microorganisms are within the colorful boxes. The names in gray color represent the correlated microorganism's related taxa.

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Tillage	No tillage
<i>Chlamydiae</i>						-0.87	0.87
<i>Chlamydiae</i>	<i>Chlamidiia</i>	<i>Chlamydiales</i>				-0.82	0.82
<i>Verrucomicrobia</i>						-0.82	0.82
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>					-0.82	0.82
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>				-0.82	0.82
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobia sub 3</i>	unclassified	<i>Ellin5121</i>	-0.72	0.72
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobia sub 3</i>	unclassified	<i>Ellin515</i>	-0.72	0.72
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobia sub 3</i>	unclassified	<i>Ellin518</i>	-0.72	0.72
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobia sub 3</i>	unclassified	<i>Ellin5102</i>	-0.77	0.77
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>			-0.82	0.82
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Hypomicrobiaceae</i>			-0.82	0.82
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Hypomicrobiaceae</i>	<i>Rhodoplanes</i>		-0.87	0.87
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Hypomicrobiaceae</i>	<i>Rhodoplanes</i>	<i>Rhodoplanes sp.</i>	-0.77	0.77
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Sphingobacteriia</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Terrimonas</i>		-0.77	0.77
Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Tillage	No tillage
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Streptomycetaceae</i>			0.82	-0.82
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i>		0.87	-0.87
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Kitasatospora</i>		0.72	-0.72
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Amycolatopsis</i>		0.87	-0.87
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Geodermatophilaceae</i>			0.87	-0.87
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Geodermatophilaceae</i>	<i>Modestobacter</i>	<i>Modestobacter sp.</i>	0.87	-0.87
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Intrasporangiaceae</i>			0.87	-0.87
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Kineosporiaceae</i>			0.87	-0.87
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Micrococcaceae</i>			0.87	-0.87
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Sphingobacteriia</i>	<i>Sphingomonadales</i>				0.77	-0.77
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Sphingobacteriia</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>			0.77	-0.77
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Sphingobacteriia</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingomonas</i>		0.77	-0.77
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Sphingobacteriia</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas sp.</i>	0.77	-0.77
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Sphingobacteriia</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Mucilaginibacter</i>	<i>M. ximonensis</i>	0.82	-0.82
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Sphingobacteriia</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Pedobacter</i>		0.72	-0.72
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Sphingobacteriia</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Flavisolibacter</i>		0.87	-0.87
<i>Gemmatimonadetes</i>						0.77	-0.77
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Herbaspirillum</i>		0.77	-0.77
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Herbaspirillum</i>	<i>Herbaspirillum sp.</i>	0.87	-0.87
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Ramlibacter</i>		0.72	-0.72
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Ramlibacter</i>	<i>Ramlibacter sp.</i>	0.72	-0.72

Using this approach, many taxa were found to be correlated with either the tilled or no-till systems. In the no tillage system, the relative abundance of Phylum Verrucomicrobia, the family Verrucomicrobia subdivision 3, as well as Proteobacteria, represented by families *Xanthomonadaceae* and *Hypomicrobiaceae* (*Rhodoplanes*), were strongly correlated with no-till (Table 4.3). *Chlamydiae*, and Bacteroidetes represented by *Terrimonas*, were also strongly correlated with no-tillage system.

The conventional tillage system was highly correlated with relative abundance *Streptomycetaceae*, *Geodermatophilaceae*, *Intrasporangiaceae*, *Kineosporiaceae* and *Micrococcaceae* families (Table 4.3). From Bacteroidetes

phylum, the genera *Sphingomonas*, *Pedobacter* and *Flavisolibacter* were highly correlated with conventional tillage. Gemmatimonadetes phylum, and the genera *Herbaspirillum* and *Ramlibacter* also correlated with conventional tillage. The genus *Anaeromyxobacter* (order *Myxococcales*, Class *Deltaproteobacteria*), was highly positively correlated with pH (Table 4.4). In contrast, Acidobacteria, represented by *Acidobacteriaceae* and *Solibacteraceae* families, were negatively correlated with pH indicating that these microorganisms may grow in low pH. *Phenylobacterium zucineum* was highly positively correlated with Al concentration (Table 4.4). Also, Actinobacteria and Acidobacteria (*Acidobacteriaceae* and *Solibacteraceae*) were correlated positively with Al concentration on soil. The genus *Anaeromyxobacter* was negatively correlated with Al.

Firmicutes phylum relative abundance, represented by *Clostridium beijerinckii* from the Clostridiales order, correlated positively with Ca and Mg and also with the no tillage system (Table 4.4). These divalent cations were present at higher levels in no tillage system. No organisms were negatively correlated with these two elements in soil.

Phyla Verrucomicrobia, and Firmicutes represented by *Clostridium* genus, correlated positively with soil P concentration (Table 4.4). *Clostridium* was also higher in no-tillage (Table 4.1). No tillage plots had more than twice the level of P than conventional tillage plots (Table 4.2) supporting the relationship between P, soil management practices and *Clostridium* abundance. Also, *Geobacter* sp. (from Proteobacteria) correlated positively with P. *Desulforomonadales* from *Deltaproteobacteria* and Rhodocyclales from Betaproteobacteria correlated positively with P. *Actinobacteria* representatives, such as Intrasporangiaceae, *Micrococcaceae* and *Geodermatophilaceae*, as well as *Sphingomonas* from Alphaproteobacteria and *Mucilaginobacter* from Bacteroidetes correlated negatively with P and also with tillage.

Principle components analysis (PCA) was also done to identify relationships among the 30 most abundant families and genera with soil parameters and experimental treatments (Figure 4.3). The tilled system was clustered with *Geodermatophilaceae*, *Sphingomonadaceae* and *Streptomycetaceae* (Figure 4.3 a). No till samples clustered with *Clostridiaceae*, *Micromonosporaceae*, *Rhodospirillaceae*, *Verrucomicrobia* and

Hypomicrobiaceae. Sites with low N or with no N fertilization were positively correlated with *Comonadaceae* and *Paenibacillaceae*. *Sphingobacteriaceae*, *Acetobacteraceae*, *Caulobacteraceae* and *Thermomonosporaceae* clustered with 180 kg N ha⁻¹ treatment.

TABLE 4.4. Spearman correlations ($p \leq 0.01$) of the most correlated organisms, with phosphorus (P), potassium (K), aluminum (Al), calcium (Ca) and magnesium (Mg). The correlated microorganisms are within the colorful boxes. The names in gray color represent the correlated microorganism's related taxa.

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	pH	P	K	Al	Ca	Mg
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales				0.73	0.36	0.39	-0.82	0.70	0.62
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Myxococcaceae			0.83	0.60	0.29	-0.94	0.82	0.75
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Myxococcaceae	Anaeromyxobacter		0.79	0.51	0.31	-0.90	0.75	0.66
Proteobacteria	Betaproteobacteria					0.74	0.46	0.57	-0.80	0.77	0.68
Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	unclassified	Ellin5017	-0.77	-0.48	-0.46	0.85	-0.91	-0.86
Acidobacteria	Solibacteres	Solibacterales	Solibacteraceae	Ca. Solibacter		-0.75	-0.53	-0.19	0.85	-0.75	-0.70
Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	pH	P	K	Al	Ca	Mg
Proteobacteria	Betaproteobacteria					0.74	0.46	0.57	-0.80	0.77	0.68
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfuromonadales				0.62	0.74	0.11	-0.76	0.71	0.73
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales				0.73	0.36	0.39	-0.82	0.70	0.62
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Myxococcaceae			0.83	0.60	0.29	-0.94	0.82	0.75
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Myxococcaceae	Anaeromyxobacter		0.79	0.51	0.31	-0.90	0.75	0.66
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	<i>Phenylobacterium</i>	P. zucineum	-0.67	-0.62	-0.18	0.79	-0.81	-0.79
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Catenulisporaceae	Catenulispora		-0.63	-0.63	-0.22	0.78	-0.82	-0.82
Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales				-0.70	-0.33	-0.19	0.76	-0.69	-0.61
Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae			-0.70	-0.33	-0.19	0.76	-0.69	-0.61
Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	unclassified	Ellin5017	-0.77	-0.48	-0.46	0.85	-0.91	-0.86
Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	unclassified	Ellin5056	-0.70	-0.66	-0.15	0.80	-0.67	-0.63
Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	unclassified	Ellin5237	-0.71	-0.38	-0.50	0.77	-0.80	-0.76
Acidobacteria	Acidobacteriia	Solibacterales				-0.68	-0.57	-0.13	0.80	-0.74	-0.71
Acidobacteria	Acidobacteriia	Solibacterales	Solibacteraceae			-0.68	-0.57	-0.13	0.80	-0.74	-0.71
Acidobacteria	Acidobacteriia	Solibacterales	Solibacteraceae	Ca. Solibacter		-0.75	-0.53	-0.19	0.85	-0.75	-0.70
Acidobacteria	unclassified	unclassified	unclassified	<i>Ca. Koribacter</i>	Ca. K. versatilis	-0.58	-0.69	-0.23	0.73	-0.77	-0.83
Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	pH	P	K	Al	Ca	Mg
Firmicutes						0.50	0.73	0.31	-0.56	0.77	0.85
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales				0.57	0.70	0.40	-0.61	0.75	0.81
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae			0.54	0.73	0.37	-0.59	0.72	0.79
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	Clostridium		0.54	0.73	0.37	-0.59	0.72	0.79
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	Clostridium	C. beijerinckii	0.59	0.53	0.42	-0.61	0.77	0.78
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae			0.52	0.31	0.49	-0.53	0.77	0.77
Proteobacteria	betaproteobacteria					0.74	0.46	0.57	-0.80	0.77	0.68
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocycales				0.57	0.73	0.27	-0.73	0.70	0.76
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocycales	Rhodocyclaceae			0.57	0.73	0.27	-0.73	0.70	0.76
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfuromonadales				0.62	0.74	0.11	-0.76	0.71	0.73
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Myxococcaceae			0.83	0.60	0.29	-0.94	0.82	0.75
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Myxococcaceae	Anaeromyxobacter		0.79	0.51	0.31	-0.90	0.75	0.66
Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	pH	P	K	Al	Ca	Mg
Verrucomicrobia						0.17	0.78	0.16	-0.28	0.49	0.66
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae					-0.38	0.81	0.01	0.54	-0.56	-0.67
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfuromonadales				0.62	0.74	0.11	-0.76	0.71	0.73
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfuromonadales	Geobacteraceae	<i>Geobacter</i>	G. bemidjensis	0.51	0.78	0.03	-0.68	0.67	0.72
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfuromonadales	Geobacteraceae	<i>Geobacter</i>	Geobacter sp.	0.43	0.76	-0.10	-0.61	0.59	0.64
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	Asticcacaulis		-0.57	-0.81	-0.18	0.70	-0.81	-0.88
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales				-0.19	-0.75	0.16	0.25	-0.26	-0.37
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae			-0.21	-0.76	0.11	0.27	-0.27	-0.38
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas		-0.19	-0.75	0.16	0.25	-0.26	-0.37
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>	Sphingomonas sp.	-0.19	-0.75	0.16	0.25	-0.26	-0.37
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocycales				0.57	0.73	0.27	-0.73	0.70	0.76
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocycales	Rhodocyclaceae			0.57	0.73	0.27	-0.73	0.70	0.76
Firmicutes						0.50	0.73	0.31	-0.56	0.77	0.85
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae			0.54	0.73	0.37	-0.59	0.72	0.79
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	Clostridium		0.54	0.73	0.37	-0.59	0.72	0.79
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	Clostridium	C. magnum	-0.50	-0.76	-0.22	0.63	-0.76	-0.87
Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	<i>Mucilaginibacter</i>	M. ximonensis	-0.27	-0.83	-0.23	0.31	-0.51	-0.68
Actinobacteria						-0.36	-0.75	-0.11	0.51	-0.62	-0.72
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Intrasporangiaceae			-0.05	-0.76	-0.18	0.15	-0.29	-0.48
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococaceae			-0.26	-0.85	-0.09	0.36	-0.42	-0.57
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Geodermatophilaceae			-0.12	-0.81	-0.24	0.25	-0.41	-0.60
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomycetaceae	Streptomyces		-0.03	-0.76	0.27	0.15	-0.22	-0.39
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Pseudonocardiaceae			-0.07	-0.75	0.11	0.20	-0.30	-0.49

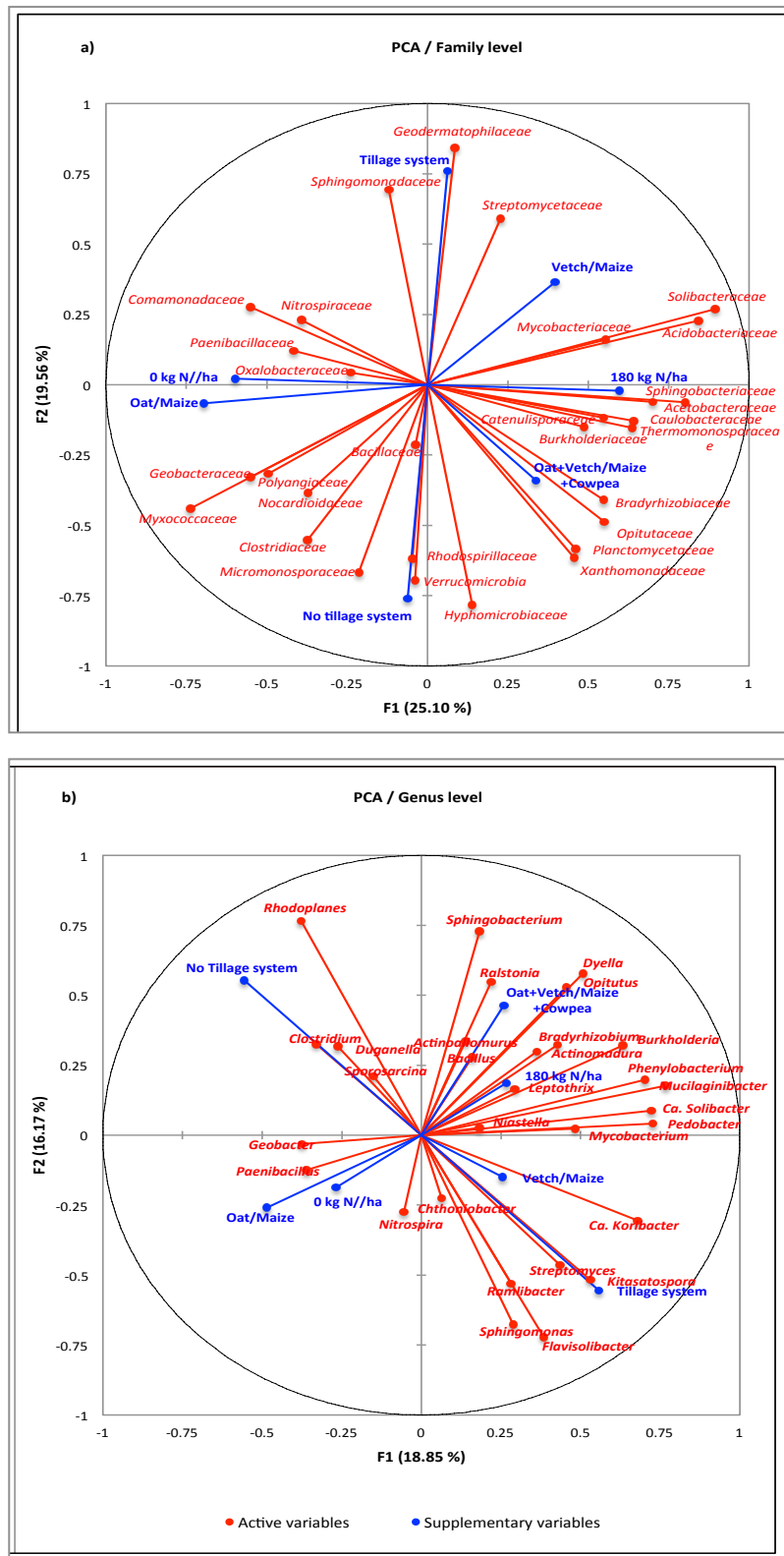


FIGURE 4.3. Principal component analysis (correlation-based PCA), between the 30 most abundant families (a), and genera (b). The treatments were used as supplementary variables.

Among the 30 most abundant genera, the tilled system, in some way, clustered with *Kisatospora*, *Streptomyces*, *Ramlibacter*, *Sphingomonas* and *Flavisolibacter* while the no-tillage system clustered with *Rhodoplanes* and *Clostridium* abundance (Figure 4.3 b). The cropping system that included cereals and legumes in winter and in summer, clustered with *Dyella*, *Opitutus*, *Sphingobacterium*, *Ralstonia*, *Bradyrhizobium* and *Actinomadura*.

The genera *Actinoallamurus*, *Paenibacillus*, *Nitrospira*, *Chthoniobacter*, *Sporosarcina* and *Niastella* have shown weak contributions on the PCA (see short arrows on Figure 4.3 b) suggesting that they may be more ubiquitous than other organisms and adapt well in a range of environments and do not require specific conditions to grow.

4.5 DISCUSSION

This work used 16S rRNA barcoded Illumina sequencing to describes soil microbial diversity and composition from phylum to species level, as well as, correlated the microbial composition with the soil features. The soil was sampled from plots located on a Brazilian agricultural long-term research experimental site, and this research is the first sequence-based approach of the local microbial community.

The microbial diversity, measured by Shannon diversity index (SDI), was significantly higher in samples from no-tillage system plots to four taxonomic levels (order, family, genus and species), which agree with Ceja-Navarro et al. (2010), which found that soils under no tillage, had the highest levels of microbial diversity compared to the conventional tillage system. Also, at all taxonomic levels, SDI was significantly higher when oat and maize were cultivated all year without legumes, indicating that the crop system based on cereals, with higher C:N ratio, stimulates microbial diversity on the soil. Vargas et al. (2005) studying this same long-term experiment site, identified greater microbial biomass in no-tillage systems and determined the increased biomass was related to the C:N ratio. A high C:N ratio stimulates the microbial community to degrade organic substrate thereby increasing determined microbial population. C:N ratio is higher in cereals straw substrates (Wheatley et al., 1990; Garcia and Rice, 1994), which provides more substrate to microorganisms explaining the highest SDI found in this work on plots where uniquely cereals (oat and maize) were grown throughout the year. Besides crops and C:N ratio, root exudates are also key factors that influence microbial communities, as they provide a carbon source to soil microorganisms (Uren, 2007; Badri and Vivanco, 2009). Through the exudation of a wide variety of

compounds, roots may regulate the soil microbial community in their immediate vicinity, stimulate beneficial symbioses, change the chemical and physical properties of the soil, and inhibit the growth of competing plant species (Nardi et al., 2000), which may also determine the microbial diversity around rhizosphere.

This study revealed significant microbial community changes between tillage systems, such as predominance of anaerobes in no tillage, as well as, presence of resilient microorganisms in tillage system, that are usually is found in extreme environments. In a conventional tillage system, annual soil tilling increases total aeration capacity up to 20 cm deeper compared with no-tillage system (Khan, 1996). This process is expected to stimulate the relative abundance of aerobic microorganisms. The results in this study confirmed this expectation, as aerobic microorganisms from the phyla Deinococcus-Thermus, Gemmatimonadetes, and Cyanobacteria, were significantly more abundant on conventional tillage. Deinococcus-Thermus were two-fold more abundant in tillage than in no-tillage. This phylum includes many species that are resistant to environmental hazards, to ionizing radiation, ultraviolet light (UV) and desiccation (Marakova et al., 2007), and this phylum has been observed in soil based solely on their branching patterns in 16S rRNA and other phylogenetic trees (Griffiths and Gupta, 2007; Pukall et al., 2011). Pagaling et al. (2012) found this phylum in a hot spring boiling pool with temperatures of 60-65 °C and a pH of 8.5 in China. McLaughlin et al (2012) detected Deinococcus-Thermus on 2.6% of 16S rRNA gene clone library in fecal samples. Pukall et al. (2011) isolated a Deinococcus strain resistant to radiation in excess of 10 kGy from an Arizona desert. Changes in soil structure that occur in a tillage system exposes the soil to solar radiation, since there is no residues in the soil surface to protect the soil, and it may explain the dominance of potentially radiation and heat resistant Deinococcus-Thermus representatives in bare and tilled soils. Opposed to this, in no tillage system the harvest residues are left on the soil surface, acting like a “roof”, which protects the soil against solar radiation, among others benefits. Gemmatimonadetes were detected in about 2.2% of reads in tillage system compared to 1.2% in the no-tillage system. Janssen (2006) identified Gemmatimonadetes as one of the top nine phyla found in soils comprising 2% of soil bacterial communities. Cyanobacteria were five fold more abundant in tillage than in no tillage in this study (Figure 1). Members of this

phylum are able to fix nitrogen gas into ammonia (NH₃), nitrite (NO₂) or nitrate (NO₃), and reduce carbon aerobically (Herrero and Flores, 2008).

The archaeal phylum Thaumarchaeota was evenly detected in both management systems. Thaumarchaeota comprises the soil ammonia-oxidizing-archaea genus *Candidatus Nitrososphaera*, which oxidizes ammonia by using ammonia monooxygenase (AMO) enzyme (Zhalnina et al., 2012).

In no-tillage systems, the soil is not disturbed physically, and because of this, there is less aeration than in tilled soils. This feature may stimulate the anaerobes microorganisms. In no tillage, at phylum level, Euryarchaeota, Verrucomicrobia, Firmicutes, Crenarchaeota, Chlamydia and Chlorobi were significantly more abundant than in the tilled system. The archaeal phylum Euryarchaeota was almost twice more abundant without tillage. Euryarchaeota comprises diverse species including extreme halophiles, thermoacidophiles, sulfate reducing microbes and a quite diverse group of anaerobic methanogens (Ludwig and Klenk, 2005; Baptiste et al., 2005; Gribaldo and Brochier, 2006; Garret and Klenk, 2006). The Euryarchaeota genera *Methanobacterium*, *Methanolinea*, *Methanomethylovorans*, *Methanoregula* and *Methanosarcina* were detected only in no-tillage system. The phylum Crenarchaeota was twice more abundant in no-tillage. This group is metabolic less diverse than Euryarchaeota, and comprises many extreme thermophiles and species that can metabolize sulfur (Gribaldo and Brochier, 2005). The bacterial Chlorobi phylum was four-fold more abundant without tillage. These microorganisms are obligate photolithotrophs and carry out anaerobic photosynthesis withdrawing electrons from hydrogen sulfide (Eisen et al., 2002). Collectively, these data support the notion that the no tillage system supports a greater proportion of anaerobic microorganisms, which can be explained by a higher number of anaerobic microsites available as a result of reduced soil aeration compared to conventional tillage. Also, in no tillage soil, the higher content of organic matter provides increased water storage capacity providing higher humidity and anaerobic sites that stimulate the expansion of anaerobes microorganisms.

The 20 most abundant genera from all treatments represented by the heatmap, demonstrated that composition varied significantly among the three evaluated treatments (tillage, N fertilization and crop rotation). Clostridia were more abundant in the no-tillage system in the oat/maize rotation, without added

N. These bacteria could be as high as 2.5% of total reads in some samples. Soil clostridia are often free-living diazotrophs under anaerobic conditions. Nitrogenase is inhibited by external N supply. This result is consistent with past results showing the association of free-living diazotrophic bacteria associated with grasses (Li and Hung, 1987; Minamisawa et al., 2004). Verrucomicrobia were also correlated with the no-tillage system from the phylum to species levels. Studying undisturbed soils from four continents, Bergmann et al. (2011) found that 23% of bacterial sequences analyzed belonged to the Verrucomicrobia, which also was often the dominant phylum in these soils with under-recognized dominance in soil. Here in this work, Verrucomicrobia was found in no-tillage system, nearly undisturbed soil, in between 4 and 8% of total reads.

P is an important nutrient for plants and microorganisms, and is usually high correlated with pH. It is very well known that P turns soluble in the soil solution, when pH is higher than 6.0 (Haynes, 1982; Curtin and Syers, 2001). In tropical areas, as the studied site, the soil is naturally acidic, and to grow plants in these soils, the farmers have to add lime in order to increase the pH, which creates chemical conditions to P (and also micronutrients) be solubilized. If some soil has high P content but pH is acidic, this P will be adsorbed on soil matrix, and will be available neither to the microorganisms, nor to the plants. In this work, we found higher number of OTUs correlated with P, than OTUs correlated with pH. A close relationship of microorganisms and P in the studied soil, suggests that P is an essential nutrient for the found taxa, whose may be involved on phosphate solubilizing processes. Correlation of abundance of microorganisms with P, as well as between P and pH, confirms that pH regulates P availability for microorganisms in soil.

PCA analysis summarized the analyses at family and genus level, and placed tillage and no tillage systems in totally opposite sides on the quadrants, as well as, the crop rotations clustered with different group of bacteria, showing that the tillage system and cropping system significantly influenced microbial composition; N fertilization influenced microbial composition to a lesser degree. The oat/maize rotation clustered with *Geobacillus* and *Paenibacillus* suggesting their preference for low nitrogen environments. *Chitinobacter*, *Nitrospira* and *Niastella* appear to be ubiquitous as they were detected in all samples with no

significant changes in their relative abundance. Microbial diversity and composition in agricultural lands does not depend solely on soil management, but also on soil features and type. Together, these parameters determine the availability of nutrients, and consequently the relative abundance of oligotrophs or copiotrophs (Koch, 2001). Kuramae et al. (2011) found high correlations between bacterial groups and soil chemistry as opposed to correlations with vegetation type and land-use practices. In this work, the tillage system had a greater impact than soil chemistry on microbial abundance. Fierer et al. (2007) observed that in environments where microorganisms are exposed environmental stress, particularly where the stress stems from low resource concentrations, oligotrophs predominate over copiotrophs.

Physical disturbance caused by tillage may be crucial factor in determining decreasing of soil species diversity. No tillage may create relatively stable environments, which results in more diverse decomposer communities and slower nutrient turnover. The relative abundance and distribution of the soil microorganisms, are good indicators of the stability of the ecosystem, but more studies of monitoring the microbial communities from agricultural areas are essential to create a model of soil functioning and quality.

4.6 CONCLUSIONS

This study demonstrates that no tillage system significantly increase the soil microbial diversity in an Acrisol. The exchangeable P, Mg concentration, total organic carbon (TOC), total N and mineral N were significantly higher in no tillage system. The crop system based on cereals (grass) growing during all the year stimulates microbial diversity on the soil. Microbial composition differed significantly between conventional tillage and no-tillage systems. Verrucomicrobia, Firmicutes, Crenarchaeota, Chlamydiae, Euryarchaeota and Chlorobi representatives were predominant in a no-tillage system. Anaerobic groups dominate the community in no-tillage samples, and Clostridium was the most abundant genus detected without tillage. Gemmatimonadetes, Cyanobacteria, and Deinococcus-Thermus representatives were predominant in the tilled system. Bacteria abundance and composition varies between tillage and no tillage, but Archaea are most abundant at no tillage system. The radiation favorable environment on a tillage system stimulated radiation tolerant phylum such as Deinococcus-Thermus. Soil management influences soil microbial diversity in agricultural ecosystems through alteration of composition and abundance of individual microbial species.

4.7 REFERENCES

BADRI, D.V.; VIVANCO J.M. Regulation and function of root exudates. **Plant and Cell Environmental**, v. 32, p. 666-681, 2009.

BAPTESTE, E.; BROCHIER, C.; BOUCHER, Y. Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens. **Archaea**, v. 1, p. 353-363, 2005.

BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; CERETTA, C.A. Effect of no-till cropping systems on soil organic matter in a sandy clay loam Acrisol from Southern Brazil monitored by electron spin resonance and nuclear magnetic resonance. **Soil Tillage and Research**, v. 53, p. 95-104, 2000.

BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; PAVINATO, A.; DIECKOW, J. Carbon sequestration in two Brazilian Cerrado soils under no-till Soil and Tillage. **Soil Tillage and Research**, v. 86, p. 237-245, 2006.

BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; PILLON, C.N.; SANGOI, L. Changes in soil organic matter fractions under subtropical No-till Cropping Systems. **Soil Science Society of America Journal**, v. 65, p. 1473-1478, 2001.

BERGMANN, G.; BATES, S.; EILERS, K.; LAUBER, C.; CAPORASO, J.; WALTERS, W. et al The under-recognized dominance of Verrucomicrobia in soil bacterial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, p. 1450-1455, 2011.

CALEGARI, A.; HARGROVE, W.L.; RHEINHEIMER, D.D.; RALISCH, R.; TESSIER, D.; DE TOURDONNET, S.; GUIMARAES, M.D. Impact of long-term no-tillage and cropping system management on soil organic carbon in an Oxisol: A model for sustainability. **Agronomy Journal**, v. 100, p. 1013-1019, 2008.

CAMPBELL, C.A.; MCCONKEY, B.G.; ZENTNER, R.P.; DYCK, F.B.; SELLES, F.; CURTIN, D. Tillage and crop rotation effects on soil organic C and N in a

coarse- textured Typic Haploboroll in south-western Saskatchewan. **Soil Tillage and Research**, v. 37, p. 3-14, 1996.

CAPORASO, J.G.; LAUBER, C.L.; WALTERS, W.A.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, C.A.; TURNBAUGH, P.J.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.**, v.108, p. 4516-4522, 2010.

CEJA-NAVARRO, J.A.; RIVERA, F.N.; PATINO-ZUNIGA, L.; GOVAERTS, B; MARSCH, R.; VILA-SANJURJO, A; DENDOOVEN, L. Molecular characterization of soil bacterial communities in contrasting zero tillage systems. **Plant and Soil**, v. 329, p. 127-137, 2010.

CHAN, K.Y. An overview of some tillage impacts on earthworm population abundance and diversity implications for functioning in soils. **Soil Tillage and Research**, v. 57, p.179-191, 2001.

COLE, J.R.; WANG, O.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R.J. ET AL. The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 141-145, 2009.

CURTIN, D.; SYERS, J.K. Lime-Induced Changes in Indices of Soil Phosphate Availability. **Soil Science Society of America Journal**, v. 65, p. 147-152, 2001.

DERPSCH, R.; FRIEDRICH, T.; KASSAM, A.; HONGWEN, L. Current status of adoption of no-till farming in the world and some of its main benefits. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 3, p. 1-25, 2010.

EDWARDS, C.A.; BOHLEN, P.J. **Biology and ecology of earthworms**. 3rd ed. Chapman & Hall, London, 1996.

EISEN, J.A.; NELSON, K.E.; PAULSEN, I.T. et al. The complete genome sequence of *Chlorobium tepidum* TLS, a photosynthetic, anaerobic, green-sulfur bacterium. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 99, p. 9509-9514, 2002.

FAGEN, J.R.; GIONGO, A.; BROWN, C.T.; DAVIS-RICHARDSON, A.; GANO, K.A.; TRIPLETT, E.W. Characterization of the relative abundance of the citrus pathogen *Ca. Liberibacter asiaticus* in the microbiome of its insect vector, *Diaphorina citri*, using high throughput 16S rRNA sequencing. **Open Microbiology Journal**, v. 6, p. 29-33, 2012.

FENG, Y.; MOTTA, A.C.; REEVES, D.W.; BURMESTER, C.H.; VAN SANTEN, E.; OSBORNE, J.A. Soil microbial communities under conventional-till and no-till continuous cotton systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, p. 1693-1703, 2003.

FIERER, N.; BRADFORD, M.; JACKSON, R. Toward an ecological classification of soil bacteria. **Ecology**, v. 88, p.1354–1364, 2007.

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 Journal**, v. 6, p. 1007-1017, 2012.

FIERER, N.; STRICKLAND, M.S.; LIPTZIN, D.; BRADFORD, M. A.; CLEVELAND, C. C. Global patterns in belowground communities. **Ecology Letters**, v. 12, p.1-2, 2009.

GARCIA, F. O.; RICE, C. W. Microbial biomass dynamics in tall cereals prairie. **Soil Science Society of America Proceedings**, v. 58, p. 816-823, 1994.

GARRETT R.A.; KLENK H.P. (eds) **Archaea: evolution, physiology and molecular biology**. Blackwell Publishing, Oxford, 2006.

GIONGO, A.; CRABB, D.B.; DAVIS-RICHARDSON, A.G.; CHAULIAC, D.; MOBBERLEY, J.M.; GANO, K. et al PANGAEA: pipeline for analysis of next generation amplicons. **ISME Journal**, v. 4, p. 852–861, 2010.

GIONGO, A.; DAVIS-RICHARDSON, A. G.; CRABB, D. B.; TRIPLETT, E. W. TaxCollector: tools to modify existing 16S rRNA databases for the rapid classification at six taxonomic levels. **Diversity**, v. 2, p. 1015-1025, 2010.

GRIBALDO, S.; BROCHIER-ARMANET, C. The origin and evolution of Archaea: a state of the art. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, p. 1007-1022, 2006.

GRIFFITHS, E.; GUPTA, R.S. Identification of signature proteins that are distinctive of the Deinococcus-Thermus phylum. **International Microbiology**, v. 10, p. 201-208, 2007.

HAYNES, R.J. Effects of lime on phosphate availability in acid soils: a critical review. **Plant and Soil**, v. 68, p. 289-308, 1982.

HERRERO, A.; FLORES, E. **The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution**. Caister Academic Press, Norfolk, chapter 4, 2008.

- HOBBS, P.R.; SAYRE, K.; GUPTA, R. The role of conservation agriculture in sustainable agriculture. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, p. 543-555, 2007.
- HUANG, X.; WANG, J.; ALURU, S.; YANG, S.P.; HILLIER, L. PCAP: a whole genome assembly program. **Genome Research**, v. 13, p. 2164-2170, 2003.
- JANSSEN, P.H. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, p. 1719-1728, 2006.
- KHAN, A.R. Influence of Tillage on Soil Aeration. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 177, n. 4, p. 253-259, 1996.
- KOCH, A. L. Oligotrophs versus copiotrophs. **Bioessays**, v. 23, p. 657-61, 2001.
- KURAMAE, E.E.; YERGEAU, E.; WONG, L.; PIJL, A.; VAN VEEN, J.A.; KOWALCHUK, G.A. Soil characteristics more strongly influence soil microbial communities than land management. **FEMS Microbiology Ecol**, v. 79, p.1-271, 2011.
- LAL, R. Residue Management, Conservation Tillage and Soil Restoration for Mitigating Greenhouse Effect by CO₂. **Enrichment Soil and Tillage Research**, v. 43, p. 81-107, 1997.
- LEE, K.E. **Earthworms: Their Ecology and Relationships with Soil and Land Use**. Academic Press, New York, 1985.
- LI, C.Y.; HUNG, L.L. Nitrogen-fixing (acetylene-reducing) bacteria associated with ectomycorrhizae of Douglas-fir. **Plant and Soil**, v. 98, 425-428, 1987.
- LU, M.; YANG, Y.; LUO, Y.; FANG, C.; ZHOU, X.; CHEN, J. ET AL. Responses of ecosystem nitrogen cycle to nitrogen addition: a meta-analysis. **New phytology**, v. 189, p. 1040–1050, 2011.
- LUDWIG, W.; KLENK, H. P. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. In: brenner dj, krieg nr, staley jt, garrity gm (eds) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. springer-verlag, Berlin, p 49-65, 2005.
- MAKAROVA, K.S.; OMELCHENKO, M.V.; GAIDAMAKOVA, E.K.; et al. *Deinococcus geothermalis*: the pool of extreme radiation resistance genes shrinks. **PLoS One**, v. 26 n. 9, p. e955, 2007.

MCLAUGHLIN, R.W.; CHEN, M.; ZHENG, J.; ZHAO, Q.; WANG, D. Analysis of the bacterial diversity in the fecal material of the endangered Yangtze finless porpoise, *Neophocaena phocaenoides asia e orientalis*. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 669-76, 2012.

MINAMISAWA, K.; NISHIOKA, K.; MIYAKI, T.; YE, B.; MIYAMOTO, T.; YOU, M.; SAITO, A.; SAITO, M.; WILFREDO, L.B.; TEAUMROONG, N.; SEIN, T.; SATO, T. Anaerobic nitrogen-fixing consortia consisting of Clostridia isolated from gramineous plants. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, p. 3096-3102, 2004.

NARDI, S.; CONCHERI, G.; PIZZEGHELLO, D.; STURARO, A.; RELLA, R.; PARVOLI, G. Soil organic matter mobilization by root exudates. **Chemosphere**, v. 5, p. 653–658, 2000.

OMONODE, R.A.; SMITH, D.R.; GÁL, A.; VYN, T.J. Soil Nitrous Oxide Emissions in Corn following Three Decades of Tillage and Rotation Treatments. **Soil Science Society of America Journal**, v. 75, p. 152–163, 2011.

PAGALING, E.; GRANT, W.D.; COWAN, D.A.; JONES, B.E.; MA, Y.; VENTOSA, A.; HEAPHY, S. Bacterial and archaeal diversity in two hot spring microbial mats from the geothermal region of Tengchong, China. **Extremophiles**, 2012 16:617-618.

PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R., Eds. **Methods of soil analysis**. Part 2. 2nd ed. Madison, W.I. 1159p, 1982.

PUKALL, R.; ZEYTUN, A.; LUCAS, S.; LAPIDUS, A.; HAMMON, N.; DESHPANDE, S. et al Complete genome sequence of *Deinococcus maricopensis* type strain (LB-34). **Standard Genomic Science**, v. 29, p. 163-72, 2011.

SARRANTONIO, M.; GALLANDT, E. The role of cover crops in North American cropping systems. **Journal of Crop Production**, v. 8, p. 53-74, 2003.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. UFRGS: Porto Alegre, Brazil (in Portuguese), 1995.

UREN, N.C. Types, amounts, and possible function of compounds released into the rizosphere by soil-grown plants. In: **The rizosphere. Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface**, 2nd ed.; Pinton, R.; Varanini, Z.; Nannipieri, P. Eds.; CRC Press, New York, p 1-21, 2007.

VARGAS, L.K.; SELBACH, P.A.; DE SÁ, E.L.S. Microbial changes in soil during a maize crop season in no-till and conventional systems. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 39, p. 749-755, 2004.

VON LÜTZOW, M.; LEIFELD, J.; KAINZ, M.; KÖGEL-KNABNER, I.; MUNCH, J.C. Indications for soil organic matter quality in soils under different management. **Geoderma**, v. 105, p. 243-258, 2002.

WANG, Y.; TU, C.; CHENG, L.; LI, C.; GENTRY, L.F.; HOYT, G.D.; ZHANG, X.; HU, S. Long-term impact of farming practices on soil organic carbon and nitrogen pools and microbial biomass and activity. **Soil Tillage and Research**, v. 117, p. 8-16, 2011.

WHEATLEY, R.; RITZ, K.; GRIFFITHS, B. Microbial biomass and mineral N transformations in soil planted with barley, rye cereals, pea or turnip. **Plant and Soil**, v. 127, p. 157-167, 1990.

ZHALNINA, K.; DE QUADROS, P.D.; CAMARGO, F.A.O.; TRIPLETT, E.W. Drivers of archaeal ammonia-oxidizing communities in soil. **Frontiers in Microbiology**, doi: 10.3389/fmicb.2012.00210, 2012.

5. CAPÍTULO III

DIVERSIDADE E COMPOSIÇÃO MICROBIANA DE SOLO CULTIVADO COM DIFERENTES COMPOSIÇÕES DE GRAMÍNEAS E LEGUMINOSAS, SOB PLANTIO DIRETO

5.1 RESUMO

A utilização de rotação de culturas preserva a estrutura e fertilidade do solo agrícola, e é uma das práticas mais recomendadas no sistema plantio direto. A alternância de leguminosas e gramíneas aumenta a ciclagem de nutrientes e reduz a necessidade de adubação química. Neste trabalho foram estudados o efeito de 9 sistemas de rotação de culturas ou plantas de cobertura sobre os microrganismos do solo. Para isto, realizou-se o sequenciamento do gene 16S rRNA, utilizando tecnologia Illumina. Os tratamentos foram: a) aveia preta + ervilhaca (inverno) / milho (verão); b) aveia preta + ervilhaca (inverno) / milho + feijão caupi (verão); c) aveia preta (inverno) / milho (verão); d) pousio; e) feijão Lablab (ano todo); g) milho + feijão Lablab; h) capim Pangola; e i) pousio (inverno) / milho verão). A ocorrência e distribuição de Bacteria e Archaea foram estudadas de filo a espécie. Características químicas do solo foram analisadas e correlacionadas com a comunidade microbiana do solo. A diversidade microbiana demonstrou estar relacionada com a diversidade de plantas, e foi significativamente maior nas parcelas de pousio, onde as ervas daninhas crescem livremente formando um emaranhado de raízes diversas no solo. Solo cultivado com culturas leguminosas estimulam microrganismos relacionados ao ciclo do N, o que acabam dominando o nicho, reduzindo-se a diversidade de microrganismos. O gênero *Clostridium* é consistentemente o microrganismo mais abundante em no solo estudado, podendo ser utilizado como um microrganismo assinatura deste solo sob plantio direto.

5.2 INTRODUÇÃO

O plantio direto é uma técnica agrícola de cultivo sem preparo prévio do solo, onde a semeadura é feita sobre os resíduos da cultura anterior. No cultivo convencional, os resíduos pós-colheita são incorporados no solo com aração e gradagem após cada colheita. O sistema de plantio direto aumenta a entrada de carbono no solo, aumentando assim a fertilidade natural do solo e diminuindo a necessidade do uso de fertilizantes. Dentro do sistema de plantio direto, a rotação de culturas é uma prática comum que é usado para melhorar a qualidade do solo e das culturas em geral. Diferentes composições de plantas incluindo gramíneas e leguminosas, permite a liberação de diversos nutrientes ao solo. Além disso, as raízes de gramíneas e leguminosas têm arquiteturas diferentes que absorvem e liberam nutrientes em diferentes profundidades no solo. Entre as vantagens da utilização da rotação de culturas, estão o controle da erosão, o controle de pragas de solo, a melhoria da estrutura física do solo, o aumento da matéria orgânica, a infiltração de água no solo, e a ciclagem de nutrientes.

Uma vez que os microrganismos preferem viver perto da zona rizosférica a qual é mais rica em nutrientes, a composição das raízes interfere na ecologia microbiana do solo. Isso também cria condições para associações entre plantas e microrganismos, como a simbiose entre leguminosas e rizóbios e as associações de fungos micorrizicos. No entanto, embora estudos tenham avaliado o efeito de plantas de cobertura na biomassa microbiana, química do solo e simbioses (Collins et al., 1992; Marais et al., 2012; Orr et al., 2012), não há estudos avaliando o efeito de diferentes rotações de culturas sobre a composição, abundância e diversidade microbiana em nível molecular. Existem muitas questões relacionadas com o efeito de leguminosas e gramíneas na

ecologia microbiana do solo que precisam ser esclarecidas, como por exemplo como estas culturas regulam a diversidade, composição e abundância dos microrganismos no solo.

Este estudo teve como objetivo avaliar as relações entre as culturas de cobertura, o solo, e microrganismos. A fim de atingir este objetivo, o solo cultivado com nove composições diferentes de gramíneas e leguminosas estudado em nível químico e molecular (sequenciamento do 16S rRNA total do solo). A ocorrência e diversidade microbiana foram estudadas de filo a espécie e correlacionadas com as características químicas do solo.

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1 Descrição do local de estudo

Este trabalho estudou um experimento de 27 anos de idade estabelecido na Estação Experimental Agrônômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / Eldorado do Sul, RS. O local está situado a 30°50'52"S, 51°38'08"W, tem um clima subtropical, temperatura média anual de 19,4°C, e precipitação média de 1440 mm. O solo é classificado como um Argissolo Vermelho distrófico típico (Embrapa, 1999). Quanto a granulometria, é composto principalmente por 54% de areia, 24% de silte e 22% de argila. A fração argila composta principalmente por caulinita (720 g kg⁻¹) e óxidos de ferro (109 g Fe₂O₃ kg⁻¹).

5.3.2 Desenho experimental, tratamentos e amostragem do solo

O arranjo experimental segue um esquema de parcelas subdivididas em blocos casualizados com três repetições. Diferentes composições de gramíneas e leguminosas foram distribuídas nos seguintes tratamentos: Os tratamentos foram: a) aveia preta + ervilhaca (inverno) / milho (verão); b) aveia preta + ervilhaca (inverno) / milho + feijão caupi (verão); c) aveia preta (inverno) / milho (verão); d) pousio; e) feijão Lablab (ano todo); g) milho + feijão Lablab; h) capim Pangola; e i) pousio (inverno) / milho verão).

Para a análise genômica, foram coletadas 3 subamostras de cada parcela, na região das três entrelinhas centrais. Tubos de PVC estéreis com 15 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro foram previamente desinfestados com hipoclorito de sódio a 20%, enxaguados e secos ao ar. Antes da coleta das

amostras a vegetação superficial foi raspada com um espátula. Os tubos de PVC contendo as amostras de solo de 0-10 cm de profundidade foram inseridos em tubos falcon estéreis, tampados e armazenados em caixa térmica com gelo seco. No laboratório, as amostras foram congeladas a -20°C para posteriores análises.

Para as análises químicas, três subamostras de 500g cada foram coletadas de cada parcela, armazenadas em sacos plásticos. No laboratório, estas amostras foram secas à temperatura ambiente e peneiradas (peneira de 0,2 mm) para posteriores análises.

5.3.3 Análises químicas

O pH, P-Mehlich, Ca, Mg, Al e os níveis foram analisados seguindo metodologia Tedesco et al. (1995). A concentração total do solo orgânico C foi determinada por combustão seca, utilizando-se um analisador de C Shimadzu VCSH.

5.3.4 Isolamento do DNA, PCR e sequenciamento

Esta metodologia foi detalhadamente explicada nos capítulos 3.3.5 e 3.3.6 desta tese.

5.3.5 Análises estatísticas

T-teste, teste de Tukey, análise das componentes principais (PCA), e correlações de Spearman foram realizadas utilizando o software XLSTAT-Pro 2011 (Addinsoft). Para integrar análise de correlações Spearman, apenas as UTOs com abundância relativa igual ou superior a 0,05% foram utilizados, e o restante foi descartado para esta análise (corte). Para executar a análise de componentes principais PCA ($p \leq 0,01$), os dados foram normalizados para terem a variância = 1. Para isso, utilizou-se a seguinte fórmula: [(abundancia relativa da UTO – média da abundancia relativa) / desvio padrão]. O índice de diversidade de Shannon (H) foi estimado para cada amostra, considerando as sequencias classificadas e as não classificadas, utilizando-se para isto o script encontrado em <https://gist.github.com/3078251>.

5.4 RESULTADOS

No total, 6.308.992 leituras (Tabela 5.1) foram obtidas a partir do sequenciamento Illumina após a limpeza, com uma média de 580.000 leituras por amostra (total de 120 amostras). As bactérias e archaeas detectadas neste trabalho foram distribuídas em 33 filós (sequências classificadas= 65%), 48 classes (sequências classificadas = 62%), 154 ordens (sequências classificadas = 52%), 305 famílias (classificados leituras = 49%), 1081 gêneros (sequências classificadas = 41%), e 4.722 espécies (sequências classificadas = 20%).

TABELA 5.1. Número de leituras totais das sequências (após limpeza) detectadas em cada sistema de rotação de culturas, para Bactéria e Archaea, em sistema de plantio direto.

Culturas	Nº de leituras (apos limpeza)		Total
	Bactéria	Archaea	
Aveia + Ervilhaca / Milho	734.497	5.107	739,604
Aveia + Ervilhaca / Milho + Feijão Caupi	762.948	2.545	765,493
Aveia/Milho	513.166	1.589	514,755
Pousio	619.238	3.792	623,030
Lablab	797.229	7.252	804,481
Milho + Feijão Guandu	578.671	1.546	580,217
Milho + Lablab	762.586	5.746	768,332
Capim Pangola	846.614	2.230	848,844
Pousio / Milho	660.728	3.508	664,236
Total	6.275,67	33.31	6.308,99

O índice de diversidade de Shannon (H) foi utilizado para determinar a diversidade microbiana das amostras nos diferentes tratamentos em nível de gênero (Tabela 5.1). Embora estatisticamente os valores não foram diferentes,

os valores do índice de diversidade foi maior nas amostras do tratamento Pousio⁸. Os menores valores de diversidade foram detectados nas amostras onde milho e feijão guandu foram cultivados, bem como no tratamento aveia + ervilhaca no inverno e milho no verão.

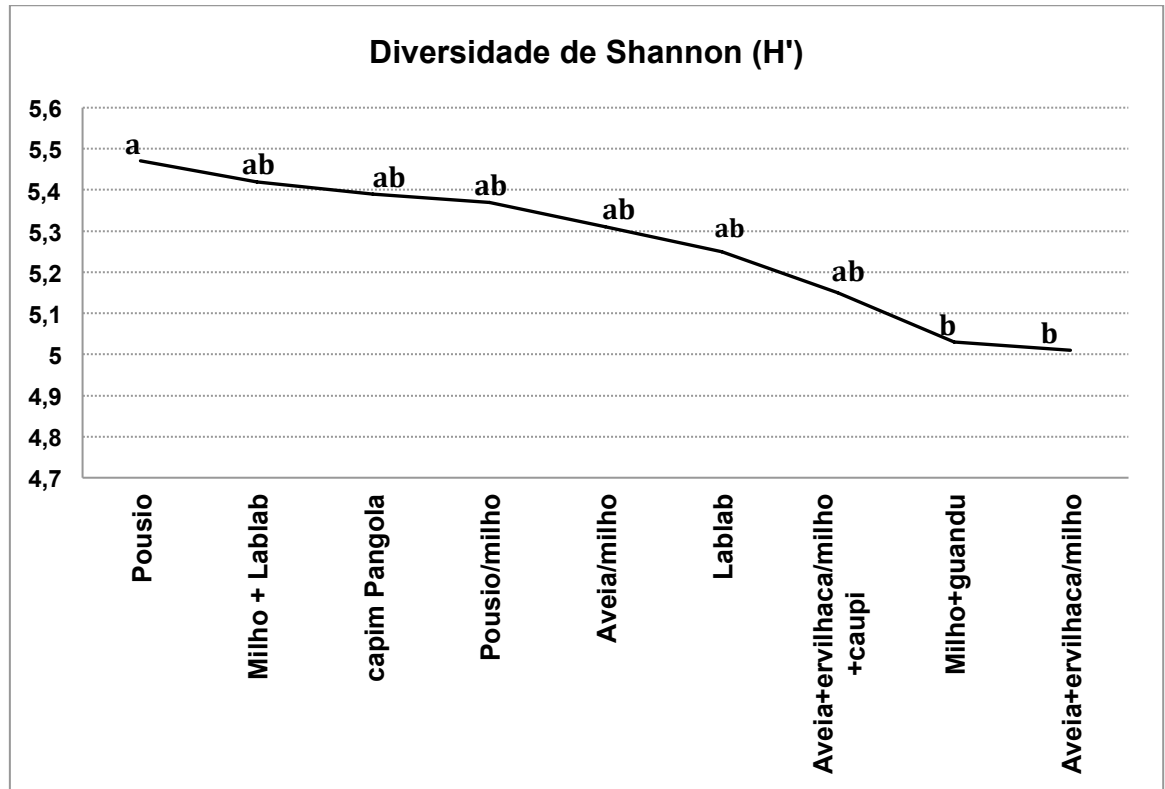


FIGURA 5.1. Índice de diversidade de Shannon para cada tratamento.

Em nível do filo, Proteobacteria e Acidobacteria, apresentaram os maiores valores de abundância relativa (Figura 5.2), variando entre 10% e 35% das sequencias. A abundância relativa de Actinobacteria variou de 4% a 15% das sequencias. Firmicutes, Verrucomicrobia e Bacteroidetes apresentaram abundância relativa variando entre 2% e 10% das sequencias.

Planctomycetes, Chloroflexi, Cyanobacteria, Thaumarchaeota, e Tenericutes, mostraram alta abundância relativa no tratamento Pousio. Firmicutes e Planctomycetes foram maiores onde o milho foi cultivado no verão, seguido de pousio no inverno. Crenarchaeota e Chlamydiae foram mais abundantes onde foi cultivado apenas feijão Lablab. Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes e Nitrospirae foram muito abundantes em parcelas onde o milho foi cultivado no verão e feijão Lablab no inverno.

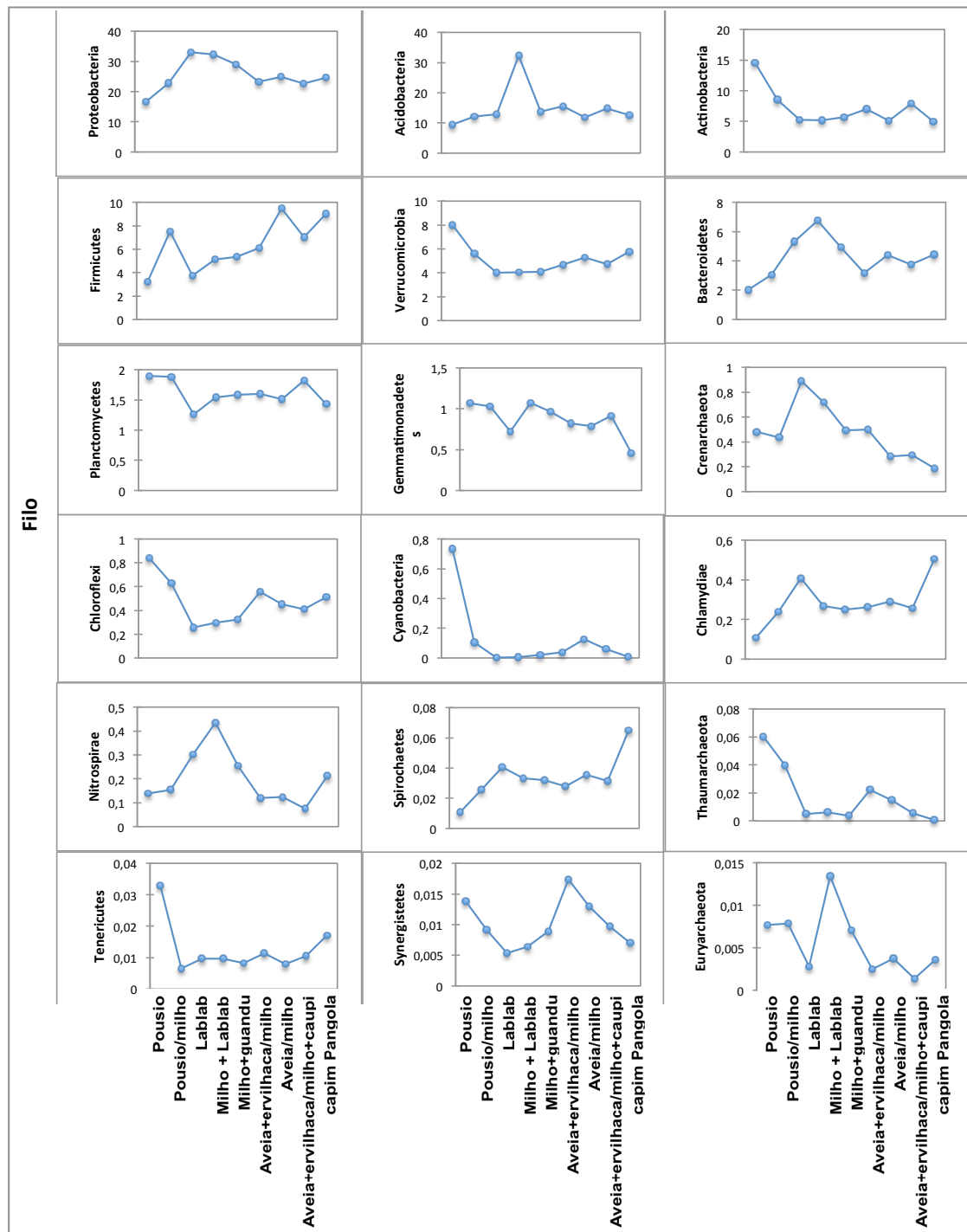


FIGURA 5.2. Percentagem da abundância relativa (média entre 6 repetições) do gene 16S rRNA nos 18 filios mais abundantes nos solos estudados.

Nas parcelas contendo apenas gramíneas como capim Pangola, milho e/ou aveia, o filo Firmicutes foi muito abundante (Figura 5.2). Chlamydiae e Espiroquetas foram mais abundantes nas parcelas contendo capim Pangola. Interessantemente, os filios Acidobacteria, Actinobacteria e Cyanobacteria apresentaram o mesmo padrão de abundância em todos os tratamentos

(Figura 5.2).

Foi realizada uma análise de correlação (Spearman, p -valor $\leq 0,001$) entre os filos mais abundantes, os tratamentos, e as características de solo pH, P, K, Al, Ca, Mg, carbono orgânico total (COT), N total e N mineral (Figura 5.3). Proteobacteria, Bacteroidetes, Nitrospirae e Euryarchaeota (archaea) foram positivamente correlacionadas com o pH, Ca e Mg. Por outro lado, Actinobacteria e Acidobacteria foram negativamente correlacionadas com estas características. Nenhum filo se correlacionou significativamente com a concentração de P no solo, sob o nível de significância utilizado. Actinobacteria, Chloroflexi, e Thaumarchaeota (archaea) correlacionaram-se positivamente com Al e negativamente com Ca, Mg, COT, N total, e N mineral. Proteobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes, Crenarchaeota (archaea), Firmicutes, Gemmatimonadetes, Espiroqueta, Elusiomicrobia e Tenericutes, não se correlacionaram com qualquer característica do solo, sob o nível de significância utilizado.

Alguns filos apresentaram correlação positiva com culturas específicas ou tratamentos, como por exemplo, Proteobacteria, Bacteroidetes, Nitrospirae e Euryarchaeota com os tratamentos de milho + feijão Lablab, bem como Actinobacteria, Cyanobacteria, Verrucomicrobia, Chloroflexi, Thaumarchaeota, e Deinococcus-Thermus, com parcelas em pousio.

Além disso, observaram-se algumas correlações positivas entre os tratamentos e as características do solo, como por exemplo, entre os tratamentos milho + feijão Lablab com pH, K, Ca, Mg e N mineral; parcelas de feijão Lablab com Ca, Mg, TOC, e N total; tratamento Milho + feijão guandu com P, TOC, N total e N mineral; uma correlação negativa entre as parcelas de pousio e P, K, TOC, e uma correlação negativa entre as parcelas Pousio/milho com TOC, N total, e N mineral.

Variáveis	pH	P	K	Al	Ca	Mg	TOC	N Total	N Mineral	Aveia+Ervilhaca/Milho	Aveia+Ervilhaca/Milho+Caupi	Aveia/Milho	Pousio	Labiab	Milho+Guandu	Milho+Labiab	capim Pangola	Pousio/Milho
Proteobacteria	0,38	0,12	0,42	-0,51	0,61	0,55	0,51	0,51	0,47	-0,16	-0,14	0,03	-0,46	0,43	0,08	0,40	-0,02	-0,12
Actinobacteria	-0,32	-0,10	-0,32	0,41	-0,45	-0,35	-0,35	-0,36	-0,34	0,00	0,13	-0,21	0,50	-0,19	-0,02	-0,19	-0,24	0,20
Cyanobacteria	-0,03	-0,09	-0,36	0,22	-0,47	-0,33	-0,69	-0,69	-0,60	0,17	-0,06	0,04	0,50	-0,37	-0,23	-0,28	-0,12	0,29
Acidobacteria	-0,62	0,21	0,10	0,51	-0,27	-0,39	0,28	0,29	0,33	0,27	0,18	-0,10	-0,35	-0,01	0,25	-0,22	-0,08	-0,06
Verrucomicrobia	0,13	-0,21	-0,35	0,01	-0,18	-0,09	-0,49	-0,47	-0,47	-0,07	-0,08	0,05	0,46	-0,24	-0,17	-0,25	0,18	0,16
Planctomycetes	-0,13	0,09	-0,27	0,18	-0,29	-0,22	-0,28	-0,29	-0,29	-0,05	0,23	-0,07	0,25	-0,35	0,04	-0,09	-0,21	0,26
Crenarchaeota	-0,01	-0,08	0,23	0,01	0,03	0,09	0,02	0,05	0,14	0,04	-0,12	-0,21	0,10	0,38	-0,20	0,20	-0,30	0,08
Chloroflexi	-0,25	-0,06	-0,26	0,41	-0,54	-0,45	-0,52	-0,51	-0,47	0,14	-0,05	-0,02	0,43	-0,37	-0,18	-0,26	0,03	0,23
Bacteroidetes	0,45	-0,04	0,33	-0,52	0,55	0,51	0,38	0,38	0,30	-0,21	0,01	0,08	-0,38	0,29	-0,13	0,44	0,15	-0,16
Firmicutes	0,21	0,12	0,04	-0,19	0,05	0,01	-0,09	-0,10	-0,14	-0,01	0,13	0,29	-0,29	-0,20	-0,09	-0,08	0,18	0,09
Synergistetes	-0,27	0,15	-0,16	0,33	-0,34	-0,31	-0,26	-0,25	-0,18	0,16	-0,02	0,14	0,19	-0,24	0,02	-0,19	-0,14	0,01
Gemmatimonadetes	-0,06	0,15	-0,07	0,13	-0,14	-0,04	-0,20	-0,21	-0,10	-0,08	0,08	-0,08	0,27	-0,20	-0,03	0,26	-0,45	0,23
Nitrospirae	0,65	-0,22	0,17	-0,64	0,47	0,55	-0,02	-0,01	-0,01	-0,21	-0,25	-0,03	0,02	0,29	-0,30	0,37	0,13	0,05
Spirochaetes	0,23	-0,02	0,24	-0,27	0,29	0,25	0,24	0,25	0,17	-0,05	0,03	-0,03	-0,35	0,16	-0,02	0,05	0,28	-0,04
Chlamydiae	0,20	-0,04	0,23	-0,26	0,30	0,20	0,29	0,31	0,20	-0,06	-0,02	0,04	-0,44	0,27	-0,09	0,01	0,38	-0,06
Thaumarchaeota	-0,28	-0,15	-0,19	0,43	-0,51	-0,38	-0,46	-0,45	-0,32	0,16	-0,08	-0,02	0,41	-0,02	-0,31	-0,04	-0,34	0,17
Deinococcus-Thermus	0,03	-0,19	-0,25	0,07	-0,12	-0,06	-0,29	-0,31	-0,23	0,07	-0,01	0,01	0,38	-0,05	-0,22	0,03	-0,18	-0,07
Euryarchaeota	0,63	-0,06	0,03	-0,52	0,26	0,39	-0,31	-0,31	-0,24	-0,20	-0,24	-0,03	0,29	-0,10	-0,28	0,39	0,04	0,19
Elusimicrobia	0,19	0,04	0,15	-0,18	0,10	0,09	-0,04	-0,06	-0,03	-0,08	-0,12	0,10	-0,10	0,02	-0,11	0,18	0,11	0,05
Chlorobi	-0,18	0,02	-0,08	0,26	-0,34	-0,30	-0,31	-0,30	-0,23	0,10	0,09	0,02	0,17	-0,09	-0,10	-0,17	-0,17	0,13
Tenericutes	0,30	-0,11	0,09	-0,29	0,20	0,19	0,03	0,03	0,02	0,11	0,03	-0,04	-0,15	0,04	-0,17	0,04	0,24	-0,13
pH	1,00	-0,18	0,20	-0,94	0,68	0,76	-0,06	-0,06	-0,12	-0,31	-0,28	0,02	0,06	0,19	-0,33	0,35	0,33	0,09
P	-0,18	1,00	0,45	0,12	-0,07	-0,12	0,05	0,08	0,28	0,09	-0,09	0,28	-0,46	-0,31	0,39	0,20	-0,42	0,29
K	0,20	0,45	1,00	-0,31	0,36	0,35	0,38	0,40	0,62	0,21	-0,06	-0,15	-0,52	0,19	-0,05	0,48	-0,18	0,01
Al	-0,94	0,12	-0,31	1,00	-0,87	-0,90	-0,24	-0,23	-0,17	0,33	0,26	0,09	0,10	-0,31	0,13	-0,38	-0,32	-0,01
Ca	0,68	-0,07	0,36	-0,87	1,00	0,96	0,63	0,62	0,53	-0,40	-0,19	-0,16	-0,22	0,47	0,18	0,38	0,25	-0,17
Mg	0,76	-0,12	0,35	-0,90	0,96	1,00	0,49	0,48	0,43	-0,37	-0,27	-0,25	-0,05	0,39	0,11	0,46	0,22	-0,11
TOC	-0,06	0,05	0,38	-0,24	0,63	0,49	1,00	0,99	0,87	-0,16	0,11	-0,27	-0,50	0,38	0,51	0,26	0,12	-0,40
N Total	-0,06	0,08	0,40	-0,23	0,62	0,48	0,99	1,00	0,87	-0,16	0,11	-0,27	-0,52	0,37	0,50	0,29	0,11	-0,40
N Mineral	-0,12	0,28	0,62	-0,17	0,53	0,43	0,87	0,87	1,00	0,07	-0,05	-0,29	-0,51	0,30	0,45	0,41	-0,09	-0,32

FIGURA 5.3 Correlação (Spearman) entre os filós, os tratamentos e as características do solo. A cor vermelha significa que o valor rho é significativamente positivo, e cor azul que o valor rho é significativamente negativo, utilizando $p \leq 0,001$.

O nível gênero foi analisado, e os 18 gêneros mais abundantes foram plotados na Figura 5.4.

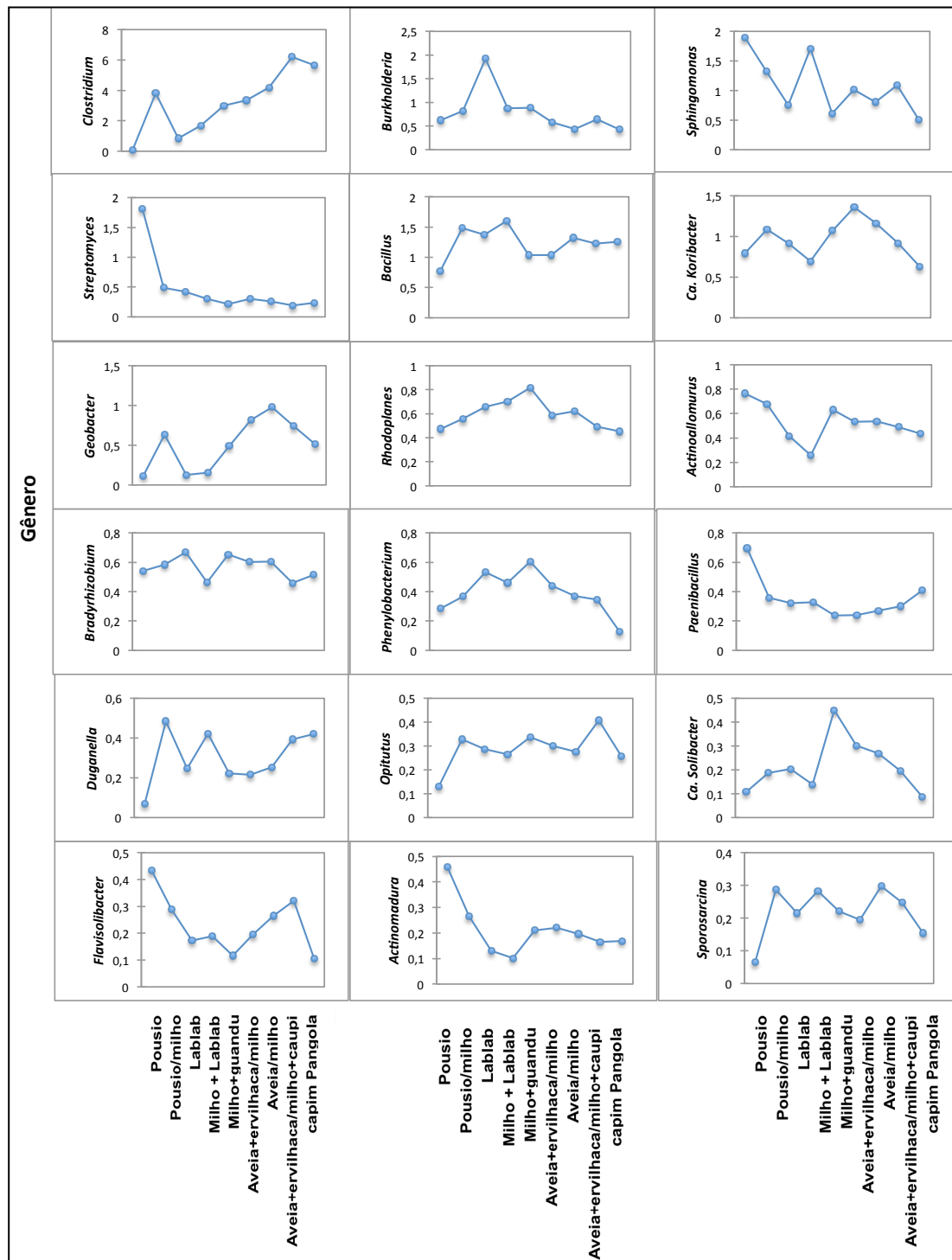


FIGURA 5.4. Percentagem da abundância relativa (média entre 6 repetições) do gene 16S rRNA nos 18 gêneros mais abundantes nos solos estudados.

Clostridium, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Candidatus Koribacter*, e *Geobacter* foram os gêneros mais abundantes detectados em todos os tratamentos. *Sphingomonas*, *Streptomyces*, *Actinoallomurus*, *Paenibacillus*, *Flavisolibacter*, e *Actinomadura*, foram mais abundantes no tratamento pousio (Figura 5.4). *Bacillus*, *Ca. Koribacter*, *Geobacter*, e *Actinoallomurus*, foram detectados em alta abundância nos tratamentos Pousio/Milho.

Clostridium foi mais abundante em parcelas onde apenas gramíneas foram cultivadas (Figura 5.5), tais como aveia/milho, capim Pangola, e Pousio/Milho. Nas parcelas de pousio, *Sphingomonas* foi o gênero mais abundante, e abundância de *Clostridium* foi muito baixa (Figura 5.5).

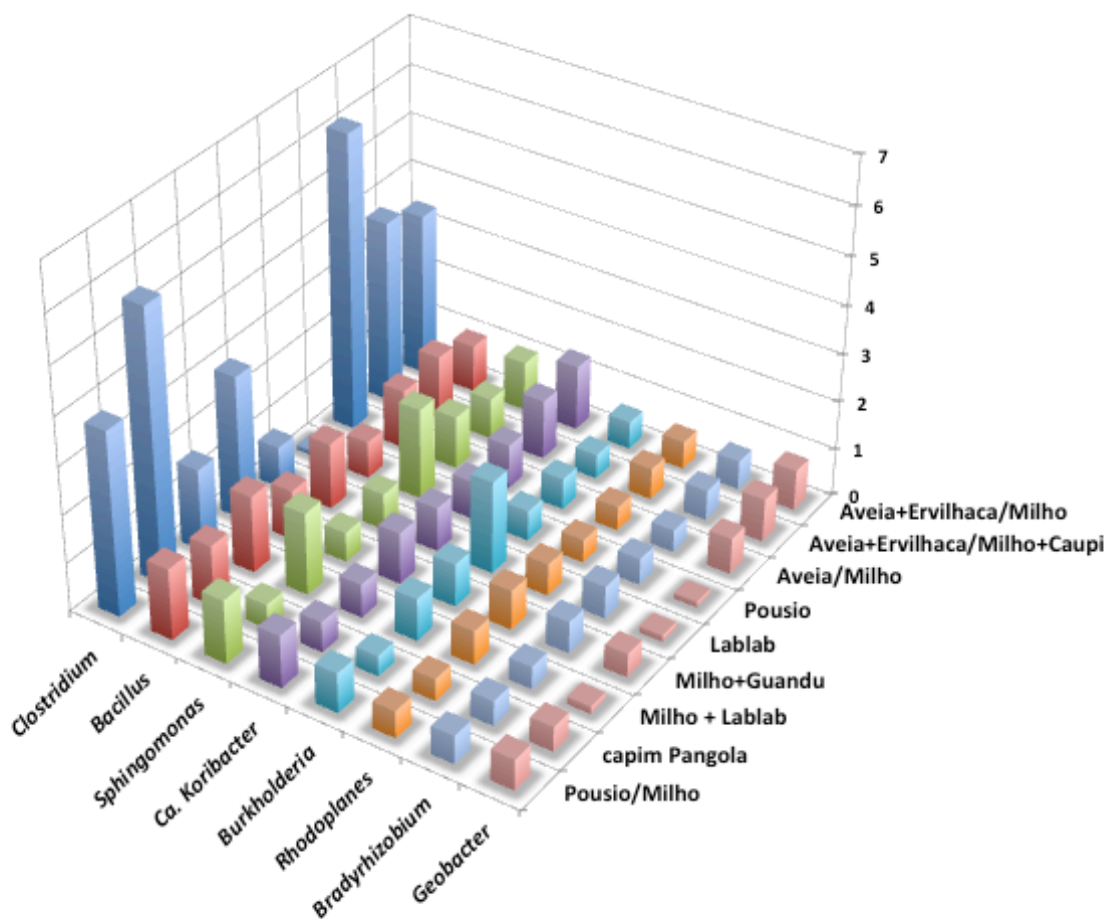


FIGURA 5.5 Representação gráfica em três dimensões da abundância relativa dos oito gêneros mais abundantes em cada tratamento estudado.

Os gêneros que apresentaram maior abundância relativa foram correlacionados ($p \leq 0,001$) com os tratamentos e as características do solo pH, P, K, Al, Ca, Mg, COT, N total, e mineral N (figura 5.6).

Foi possível a observação de relações interessantes, tais como: *Ca. Koribacter* correlacionou-se negativamente com pH, Ca e Mg, e positivamente com o tratamento pousio / milho + Lablab, assim como apresentou correlação negativa com capim Pangola, o qual possui elevados teores de Mg e pH mais elevado (ver Tabela 5.2). *Leptothrix* e *Pseudomonas* apresentaram correlação positiva com pH, Ca, Mg, TOC, e N total, e também com o tratamento Lablab (Figura 5.6), que por sua vez, possui elevados teores de Ca, Mg e TOC (Tabela 5.2). Estas relações mostram a semelhança entre estes dois organismos no seu estilo de vida, e pode ser utilizado na preparação de um meio de cultura, bem como em outros estudos com estas bactérias.

TABELA 5.2 Características do solo dos nove tratamentos.

Categoria	Aveia + Ervilhaca / Milho	Aveia + Ervilhaca / Milho + Feijão Caupi	Aveia/Milho	Pousio	Lablab	Milho + Feijão Guandu	Milho + Lablab	Capim Pangola	Pousio / Milho
pH	4.7 c	4.7 c	5.0 b	5.1 b	5.1 b	4.6 d	5.3 a	5.4 a	5.1 b
P	24.5 c	21.4 c	30.4 a	8.4 d	14.2 d	32.7 a	29.1 b	9.8 d	31.9 a
K	246 b	224 b	211 c	130 c	253 b	219 b	317 a	201 c	221 b
Al	0.98 a	0.99 a	0.75 a	0.69 a	0.16 b	0.74 a	0.06 b	0.13 b	0.60 a
Ca	1.86 c	2.05 c	2.10 c	1.93 c	4.34 a	3.09 b	3.99 a	3.45 b	2.13 c
Mg	1.07 c	1.02 c	1.06 c	1.37 b	2.02 a	1.58 b	2.08 a	1.80 a	1.27 b
COT	1.56 c	1.77 b	1.42 c	1.20 d	2.24 a	2.59 a	2.03 b	1.86 b	1.34 d
N Total	0.13 c	0.15 c	0.12 d	0.09 c	0.18 b	0.20 a	0.17 b	0.15 c	0.11 d
N Mineral	8.07 c	6.31 c	4.27 d	1.83 e	12.12 b	16.73 a	15.27 a	6.96 c	4.29 d

Letras diferentes ao lado dos números na linha significam que as médias são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ao nível de significância = 0,01.

Bacillus, *Ralstonia*, *Sporosarcina*, *Dyella*, e *Mucilaginibacter*, não se correlacionaram com qualquer característica do solo ou rotação de culturas, o que pode indicar que esses microrganismos são ubíquos, e são capazes de se desenvolverem bem em vários ambientes.

Variáveis	pH	P	K	Al	Ca	Mg	COT	N Total	N Mineral	Aveia+Ervilhaca/Milho	Aveia+Erv./Milho+Caupi	Aveia/Milho	Pousio	Labiab	Milho+Guandu	Milho+Labiab	capim Pangola	Pousio/Milho
<i>Clostridium</i>	0,10	0,22	0,06	-0,10	-0,01	-0,09	-0,03	-0,03	-0,07	0,11	0,15	0,33	-0,47	-0,27	-0,03	-0,16	0,23	0,09
<i>Bacillus</i>	0,20	0,05	0,18	-0,22	0,17	0,16	0,06	0,05	0,03	-0,14	0,13	0,03	-0,21	0,04	-0,11	0,14	0,03	0,13
<i>Sphingomonas</i>	0,19	0,05	-0,01	-0,03	-0,15	0,01	-0,45	-0,46	-0,30	-0,03	-0,12	0,06	0,44	-0,17	-0,30	0,32	-0,37	0,18
<i>Ca. Koribacter</i>	-0,57	0,20	0,03	0,54	-0,37	-0,42	0,03	0,05	0,13	0,27	0,15	-0,04	-0,12	-0,04	0,09	-0,16	-0,29	0,02
<i>Burkholderia</i>	-0,06	0,13	0,23	0,01	0,12	0,08	0,20	0,18	0,21	-0,15	-0,09	0,00	-0,14	0,35	0,08	0,06	-0,19	0,12
<i>Rhodoplanes</i>	-0,12	0,22	0,27	-0,06	0,25	0,22	0,47	0,46	0,48	-0,09	0,14	-0,23	-0,25	0,21	0,34	0,23	-0,29	-0,06
<i>Bradyrhizobium</i>	-0,33	-0,02	-0,04	0,30	-0,18	-0,23	0,09	0,06	0,06	0,00	0,09	-0,15	-0,01	0,13	0,10	-0,16	-0,06	0,05
<i>Geobacter</i>	-0,14	0,26	0,04	0,16	-0,24	-0,32	-0,11	-0,10	-0,10	0,34	0,22	0,17	-0,42	-0,35	-0,02	-0,28	0,11	0,12
<i>Actinoallomurus</i>	-0,46	-0,04	-0,28	0,49	-0,42	-0,39	-0,18	-0,18	-0,19	0,06	0,04	-0,06	0,32	-0,18	0,18	-0,34	-0,12	0,08
<i>Streptomyces</i>	0,08	-0,17	-0,19	0,04	-0,14	-0,02	-0,35	-0,36	-0,33	-0,13	-0,08	-0,19	0,52	0,02	-0,18	-0,06	-0,10	0,24
<i>Phenylobacterium</i>	-0,30	0,29	0,29	0,22	-0,01	-0,06	0,31	0,31	0,37	0,09	0,07	-0,06	-0,22	0,27	0,20	0,14	-0,50	-0,04
<i>Paenibacillus</i>	0,41	-0,31	-0,25	-0,31	0,14	0,23	-0,32	-0,31	-0,36	-0,35	-0,10	-0,03	0,50	0,06	-0,21	-0,02	0,21	0,07
<i>Duganella</i>	0,44	0,18	0,26	-0,47	0,36	0,36	0,08	0,08	0,09	-0,15	-0,05	0,08	-0,35	-0,01	-0,09	0,27	0,17	0,20
<i>Opitutus</i>	0,03	0,34	0,13	-0,09	0,12	0,07	0,14	0,15	0,14	0,06	-0,03	0,24	-0,44	-0,01	0,15	-0,03	-0,06	0,11
<i>Ca. Solibacter</i>	-0,70	0,27	0,04	0,61	-0,35	-0,45	0,25	0,25	0,27	0,24	0,20	-0,01	-0,26	-0,02	0,34	-0,18	-0,33	-0,07
<i>Flavisolibacter</i>	-0,07	-0,01	-0,15	0,21	-0,30	-0,23	-0,46	-0,45	-0,34	-0,02	0,07	0,20	0,40	-0,10	-0,32	0,03	-0,37	0,10
<i>Actinomadura</i>	-0,40	-0,07	-0,36	0,49	-0,52	-0,45	-0,38	-0,38	-0,36	0,07	0,00	-0,13	0,47	-0,24	0,07	-0,37	-0,10	0,18
<i>Sporosarcina</i>	0,07	0,19	0,23	-0,11	0,10	0,06	0,12	0,11	0,11	-0,07	0,22	0,07	-0,37	0,02	-0,05	0,13	-0,10	0,17
<i>Mycobacterium</i>	-0,27	-0,11	-0,25	0,36	-0,40	-0,32	-0,29	-0,30	-0,27	0,03	0,18	-0,15	0,42	-0,07	-0,12	-0,07	-0,33	0,08
<i>Sphingobacterium</i>	0,04	0,16	0,39	-0,12	0,25	0,22	0,36	0,35	0,36	-0,11	0,10	0,02	-0,42	0,25	-0,05	0,39	-0,18	0,03
<i>Kitasatospora</i>	0,11	-0,19	-0,20	0,03	-0,19	-0,06	-0,45	-0,45	-0,40	-0,08	-0,15	-0,15	0,52	-0,06	-0,27	-0,05	-0,01	0,26
<i>Nitrospira</i>	0,65	-0,22	0,17	-0,63	0,47	0,55	-0,01	-0,01	0,00	-0,21	-0,25	-0,03	0,01	0,30	-0,30	0,37	0,13	0,05
<i>Ralstonia</i>	0,22	0,10	0,07	-0,18	0,10	0,08	-0,15	-0,15	-0,13	-0,16	0,03	0,26	-0,18	0,19	-0,27	0,04	-0,15	0,30
<i>Pseudomonas</i>	0,46	-0,10	0,33	-0,53	0,56	0,54	0,35	0,35	0,29	-0,24	-0,09	-0,05	-0,24	0,33	-0,13	0,41	0,20	-0,10
<i>Chthoniobacter</i>	0,03	0,01	-0,31	0,19	-0,41	-0,29	-0,73	-0,72	-0,61	-0,03	-0,05	0,21	0,52	-0,29	-0,33	-0,11	-0,25	0,32
<i>Dyella</i>	-0,17	0,26	0,26	0,12	0,00	-0,05	0,16	0,14	0,18	-0,01	0,01	0,08	-0,21	0,28	0,07	0,05	-0,41	0,13
<i>Leptothrix</i>	0,32	-0,01	0,23	-0,42	0,49	0,43	0,36	0,36	0,28	-0,21	-0,02	-0,04	-0,39	0,47	-0,08	0,22	0,04	0,07
<i>Mucilaginibacter</i>	-0,04	0,25	0,21	0,01	0,05	-0,03	0,16	0,14	0,10	-0,10	0,08	0,24	-0,45	0,14	-0,02	0,03	-0,04	0,15
<i>Variovorax</i>	0,56	-0,08	0,23	-0,56	0,48	0,47	0,12	0,12	0,09	-0,25	-0,09	0,19	-0,18	0,27	-0,25	0,38	0,10	-0,08
<i>Flavobacterium</i>	0,39	-0,30	0,22	-0,44	0,47	0,44	0,38	0,37	0,27	-0,12	0,01	-0,09	-0,24	0,23	-0,22	0,41	0,36	-0,30
pH	1,00	-0,18	0,20	-0,94	0,68	0,76	-0,06	-0,06	-0,12	-0,31	-0,28	0,02	0,06	0,20	-0,33	0,35	0,33	0,09
P	-0,18	1,00	0,45	0,12	-0,07	-0,12	0,05	0,08	0,28	0,09	-0,09	0,28	-0,46	-0,31	0,39	0,20	-0,42	0,29
K	0,20	0,45	1,00	-0,31	0,36	0,35	0,38	0,40	0,62	0,21	-0,06	-0,15	-0,52	0,19	-0,05	0,48	-0,18	0,01
Al	-0,94	0,12	-0,31	1,00	-0,87	-0,90	-0,24	-0,23	-0,17	0,33	0,26	0,09	0,10	-0,31	0,13	-0,38	-0,32	-0,01
Ca	0,68	-0,07	0,36	-0,87	1,00	0,96	0,63	0,62	0,53	-0,40	-0,19	-0,16	-0,22	0,47	0,18	0,38	0,25	-0,17
Mg	0,76	-0,12	0,35	-0,90	0,96	1,00	0,49	0,48	0,43	-0,37	-0,27	-0,25	-0,05	0,39	0,11	0,46	0,22	-0,11
COT	-0,06	0,05	0,38	-0,24	0,63	0,49	1,00	0,99	0,87	-0,16	0,11	-0,28	-0,50	0,38	0,51	0,26	0,13	-0,40
N Total	-0,06	0,08	0,40	-0,23	0,62	0,48	0,99	1,00	0,87	-0,16	0,11	-0,27	-0,52	0,37	0,50	0,29	0,11	-0,40
N Mineral	-0,12	0,28	0,62	-0,17	0,53	0,43	0,87	0,87	1,00	0,07	-0,05	-0,29	-0,51	0,30	0,45	0,41	-0,09	-0,32

FIGURA 5.6 Correlação (Spearman) entre os gêneros, os tratamentos e as características do solo. A cor vermelha significa que o valor rho é significativamente positivo, e cor azul que o valor rho é significativamente negativo, utilizando $p \leq 0,001$.

Variáveis	pH	P	K	Al	Ca	Mg	COT	N Total	N Mineral	Aveia+Ervilhaca/Milho	Aveia+Erv./Milho+Caupi	Aveia/Milho	Pousio	Lablab	Milho+Guandu	Milho+Lablab	capim Pangola	Pousio/Milho
<i>Clostridium magnum</i>	0,03	0,23	0,05	-0,06	-0,01	-0,10	0,02	0,02	-0,04	0,05	0,22	0,27	-0,47	-0,24	0,05	-0,21	0,21	0,12
<i>Sphingomonas</i> sp.	0,21	0,04	0,00	-0,05	-0,14	0,01	-0,46	-0,47	-0,30	-0,03	-0,11	0,06	0,43	-0,16	-0,33	0,32	-0,36	0,18
<i>Clostridium</i> sp.	0,14	0,19	0,05	-0,14	0,01	-0,07	-0,04	-0,04	-0,08	0,13	0,13	0,34	-0,45	-0,25	-0,08	-0,12	0,24	0,03
<i>Bacillus</i> sp.	0,20	0,08	0,19	-0,22	0,16	0,16	0,06	0,05	0,03	-0,13	0,13	0,04	-0,24	0,04	-0,10	0,15	0,02	0,14
Ca. <i>Koribacter versatilis</i>	-0,66	0,25	0,05	0,60	-0,38	-0,44	0,14	0,15	0,22	0,27	0,22	-0,09	-0,17	-0,08	0,19	-0,11	-0,33	-0,01
<i>Burkholderia</i> sp.	-0,12	0,11	0,27	0,04	0,13	0,08	0,28	0,27	0,30	-0,09	-0,04	-0,07	-0,20	0,38	0,11	0,05	-0,19	0,06
<i>Acidobacteria bacterium</i>	0,24	-0,07	0,17	-0,26	0,23	0,14	0,08	0,10	0,08	0,01	0,00	0,08	-0,27	0,18	-0,17	-0,12	0,42	-0,09
<i>Rhodoplanes</i> sp.	0,03	0,20	0,28	-0,20	0,37	0,33	0,48	0,47	0,47	-0,16	0,09	-0,14	-0,28	0,25	0,31	0,29	-0,24	-0,08
uncultured crenarchaeote	0,00	-0,11	0,25	-0,01	0,05	0,10	0,07	0,09	0,18	0,05	-0,07	-0,21	0,05	0,38	-0,21	0,22	-0,29	0,04
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	-0,30	-0,02	-0,05	0,30	-0,21	-0,24	0,04	0,01	0,01	0,03	0,07	-0,14	0,01	0,13	0,06	-0,18	-0,05	0,05
alpha proteobacterium	0,23	-0,04	0,19	-0,37	0,55	0,50	0,51	0,50	0,42	-0,33	-0,03	-0,04	-0,21	0,44	0,18	0,34	-0,11	-0,15
<i>Paenibacillus</i> sp.	0,40	-0,32	-0,28	-0,30	0,14	0,22	-0,30	-0,30	-0,36	-0,33	-0,09	-0,03	0,50	0,05	-0,18	-0,06	0,23	0,04
myxobacterium AT3-03	0,39	0,08	0,22	-0,46	0,45	0,44	0,23	0,23	0,24	-0,14	-0,03	0,07	-0,26	0,21	0,00	0,28	-0,04	-0,05
beta proteobacterium	0,54	0,03	0,29	-0,56	0,47	0,46	0,10	0,10	0,10	-0,19	-0,07	0,15	-0,25	0,22	-0,23	0,37	0,06	0,03
<i>Streptomyces</i> sp.	0,05	-0,18	-0,17	0,04	-0,10	0,01	-0,28	-0,29	-0,27	-0,11	-0,09	-0,24	0,52	0,07	-0,13	-0,07	-0,14	0,21
bacterium Ellin5237	-0,70	0,21	0,02	0,62	-0,37	-0,46	0,26	0,25	0,26	0,25	0,27	-0,10	-0,24	-0,15	0,32	-0,15	-0,23	-0,07
Xanthomonadaceae bacterium	0,40	-0,09	0,25	-0,51	0,51	0,44	0,34	0,34	0,29	-0,02	-0,07	-0,10	-0,39	0,20	-0,01	0,11	0,36	-0,07
<i>Geobacter</i> sp.	-0,15	0,27	0,03	0,15	-0,23	-0,31	-0,09	-0,08	-0,06	0,36	0,24	0,16	-0,39	-0,37	0,03	-0,24	0,05	0,05
<i>Clostridium beijerinckii</i>	0,20	0,19	0,05	-0,18	0,06	0,00	-0,07	-0,07	-0,10	0,03	0,01	0,29	-0,39	-0,22	-0,03	-0,12	0,28	0,18
<i>Sporosarcina</i> sp.	0,07	0,21	0,24	-0,12	0,11	0,07	0,13	0,12	0,11	-0,08	0,24	0,06	-0,36	0,01	-0,03	0,14	-0,11	0,16
proteobacterium Ellin139	-0,19	0,08	0,26	0,03	0,23	0,09	0,54	0,56	0,48	0,01	0,17	-0,07	-0,39	0,42	0,27	-0,02	-0,14	-0,26
proteobacterium Ellin181	-0,16	0,08	0,25	0,00	0,25	0,11	0,53	0,55	0,48	0,06	0,18	-0,06	-0,41	0,38	0,25	-0,06	-0,08	-0,30
<i>Phenylobacterium</i> sp.	0,22	0,23	0,35	-0,27	0,31	0,30	0,17	0,18	0,25	-0,16	0,07	0,04	-0,20	0,37	-0,12	0,40	-0,46	0,10
bacterium Ellin327	-0,12	0,13	-0,07	0,18	-0,18	-0,19	-0,21	-0,17	-0,14	-0,03	0,19	0,11	0,12	-0,07	-0,10	-0,01	-0,28	0,07
<i>Leptothrix</i> sp.	0,32	0,01	0,24	-0,42	0,49	0,43	0,36	0,36	0,29	-0,21	-0,02	-0,04	-0,39	0,47	-0,07	0,22	0,04	0,08
<i>Geobacter bemidjiensis</i>	-0,16	0,24	0,00	0,16	-0,25	-0,32	-0,10	-0,09	-0,08	0,38	0,25	0,14	-0,37	-0,37	0,02	-0,27	0,06	0,04
<i>Duganella</i> sp.	0,12	0,09	0,14	-0,20	0,24	0,21	0,22	0,20	0,17	-0,10	0,09	0,05	-0,27	0,14	0,05	0,11	-0,03	0,01
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	-0,32	0,00	0,02	0,26	-0,11	-0,16	0,17	0,15	0,16	-0,04	0,15	-0,21	-0,04	0,17	0,14	-0,09	-0,10	0,02
<i>Duganella violaceinigra</i>	0,53	0,14	0,27	-0,50	0,33	0,34	-0,01	0,00	-0,01	-0,13	-0,09	0,13	-0,34	-0,06	-0,22	0,31	0,24	0,21
<i>Pseudomonas</i> sp.	0,45	-0,12	0,29	-0,50	0,50	0,50	0,29	0,28	0,22	-0,23	-0,08	-0,06	-0,21	0,33	-0,18	0,41	0,16	-0,06
Sphingobacteriaceae bacterium	-0,01	0,10	0,32	-0,02	0,10	0,05	0,17	0,17	0,20	0,01	0,15	0,08	-0,36	0,36	-0,25	0,20	-0,26	0,06
<i>Duganella nigrescens</i>	0,55	0,14	0,29	-0,51	0,32	0,33	-0,05	-0,04	-0,03	-0,11	-0,05	0,11	-0,33	-0,08	-0,27	0,29	0,26	0,23
<i>Bacillus niacini</i>	0,07	0,21	0,26	-0,12	0,11	0,07	0,13	0,12	0,12	-0,06	0,23	0,03	-0,36	0,00	-0,03	0,13	-0,10	0,17
<i>Phenylobacterium zucineum</i>	-0,59	0,16	-0,06	0,58	-0,42	-0,44	0,01	0,01	0,06	0,21	0,16	-0,06	0,04	0,01	0,19	-0,19	-0,47	0,01
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	-0,39	-0,01	0,00	0,36	-0,19	-0,24	0,14	0,12	0,12	0,01	0,15	-0,13	-0,03	0,16	0,12	-0,10	-0,15	-0,04
Rhodospirillaceae bacterium	0,09	-0,16	0,10	-0,17	0,33	0,25	0,32	0,33	0,24	-0,14	0,05	-0,05	-0,19	0,30	0,04	-0,03	0,21	-0,13
actinobacterium YJF1-30	0,23	0,04	0,08	-0,22	0,12	0,09	-0,06	-0,03	-0,03	0,03	-0,01	0,06	-0,17	0,21	-0,15	-0,04	0,04	0,03
<i>Variovorax</i> sp.	0,55	-0,10	0,25	-0,57	0,51	0,49	0,19	0,19	0,14	-0,24	-0,06	0,15	-0,23	0,30	-0,24	0,41	0,12	-0,11
<i>Bacteroidetes bacterium</i>	0,20	0,05	0,23	-0,26	0,33	0,29	0,29	0,30	0,25	-0,12	-0,09	0,11	-0,26	0,20	0,04	0,24	0,05	-0,13
Acidimicrobidae bacterium	0,06	0,12	0,11	-0,13	0,12	0,08	0,17	0,18	0,09	-0,08	0,30	-0,03	-0,32	0,04	0,02	0,02	-0,07	0,14
pH agua	1,00	-0,18	0,20	-0,94	0,68	0,76	-0,06	-0,06	-0,12	-0,31	-0,28	0,02	0,06	0,19	-0,33	0,35	0,33	0,09
Fosforo	-0,18	1,00	0,45	0,12	-0,07	-0,12	0,05	0,08	0,28	0,09	-0,09	0,28	-0,46	-0,31	0,39	0,20	-0,42	0,29
Potassio	0,20	0,45	1,00	-0,31	0,36	0,35	0,38	0,40	0,62	0,21	-0,06	-0,15	-0,52	0,19	-0,05	0,48	-0,18	0,01
Aluminio	-0,94	0,12	-0,31	1,00	-0,87	-0,90	-0,24	-0,23	-0,17	0,33	0,26	0,09	0,10	-0,31	0,13	-0,38	-0,32	-0,01
Calcio	0,68	-0,07	0,36	-0,87	1,00	0,96	0,63	0,62	0,53	-0,40	-0,19	-0,16	-0,22	0,47	0,18	0,38	0,25	-0,17
Magnésio	0,76	-0,12	0,35	-0,90	0,96	1,00	0,49	0,48	0,43	-0,37	-0,27	-0,25	-0,05	0,39	0,11	0,46	0,22	-0,11
COT	-0,06	0,05	0,38	-0,24	0,63	0,49	1,00	0,99	0,87	-0,16	0,11	-0,27	-0,50	0,38	0,51	0,26	0,12	-0,40
Total N	-0,06	0,08	0,40	-0,23	0,62	0,48	0,99	1,00	0,87	-0,16	0,11	-0,27	-0,52	0,37	0,50	0,29	0,11	-0,40
Mineral N	-0,12	0,28	0,62	-0,17	0,53	0,43	0,87	0,87	1,00	0,07	-0,05	-0,29	-0,51	0,30	0,45	0,41	-0,09	-0,32

FIGURA 5.7 Correlação (Spearman) entre as espécies, os tratamentos e as características do solo. A cor vermelha significa que o valor rho é significativamente positivo, e cor azul que o valor rho é significativamente negativo, utilizando $p \leq 0,001$.

O nível de espécie foi definido neste estudo, quando as sequências atingiram 95% de similaridade com sequências do banco de dados RDP (classificação). Para constar, 80% das sequências totais para o nível espécie, não foram classificadas no RDP. Isto indica o quão longe estamos de conhecer a composição microbiana do solo em nível de espécie. Muitas unidades taxonômicas não classificadas foram detectadas entre as espécies mais abundantes, o que provavelmente indica novas espécies ou estirpes.

Paenibacillus sp., *Leptothrix* sp. e *Variovorax* sp. correlacionou-se positivamente com o pH do solo, da mesma maneira que seu gênero correspondente (Figura 5.7 e 5.6). Além disso, *Myxobacterium* AT3-03, *Duganella violaceinigra*, e *Pseudomonas* sp. também se correlacionaram com o pH do solo. *Rhodoplanes* sp., *Leptothrix* sp., alfa proteobactéria, uma bactéria Xhantomonadaceae, proteobactéria Ellin 139 e 181, e uma bactéria Rhodospirillaceae correlacionou positivamente com TOC e N total.

Para se ter uma ideia de como os tratamentos estudados diferem uns dos outros, o nível gênero (abundância relativa) e características de solo e os tratamentos foram agrupados pela análise de componentes principais (PCA), formando quatro grupos distintos (Figura 5.8). O primeiro grupo foi composto pelas parcelas contendo predominantemente gramíneas: Pousio/Milho, Aveia+Ervilhaca/Milho, Aveia+Ervilhaca/Milho+Caupi, e Aveia/Milho. O segundo grupo, foi composto predominantemente por tratamentos contendo leguminosas: Milho+Lablab, Lablab, e milho/feijão+Guandu. As parcelas de pousio e capim Pangola não foram agrupadas com quaisquer outros tratamentos, formando dois grupos individuais, distantes dos 1º e 2º grupos.

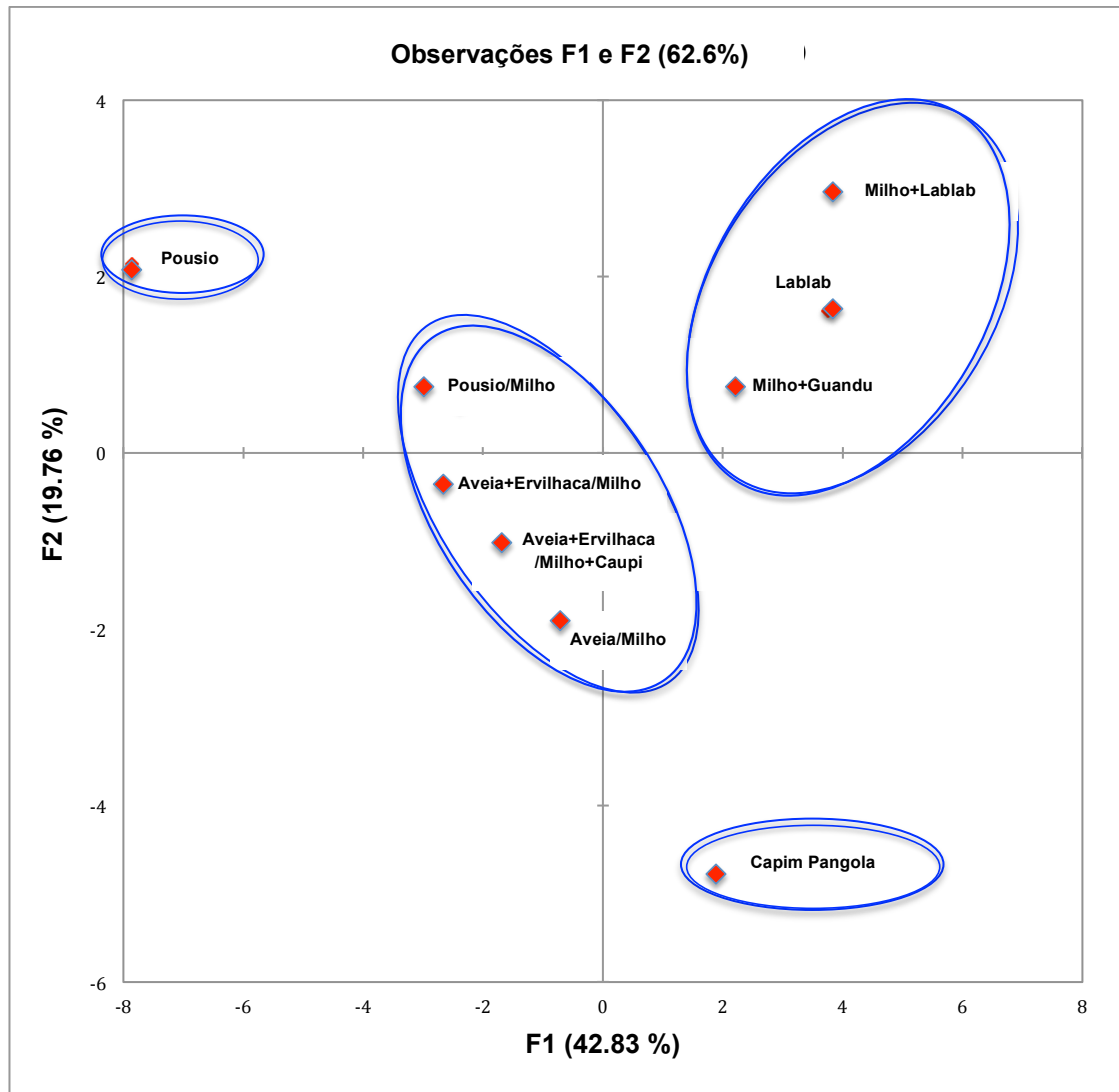


FIGURA 5.8 Análise de componentes principais (PCA) agrupando os tratamentos de acordo com a comunidade microbiana e características de solo de cada parcela.

5.5 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou as comunidades microbianas e parâmetros do solo em um solo agrícola sob plantio direto e diferentes rotações de culturas. A diversidade microbiana de cada tratamento foi avaliada. O tratamento Pousio apresentou os maiores valores de diversidade. Isto indica que a diversidade de ervas daninhas crescendo nas parcelas de pousio pode estimular a diversidade microbiana. Já as culturas agrícolas contendo leguminosas podem selecionar os microrganismos, tais como os relacionados com o ciclo de N. Sugerimos que a diversidade microbiana está completamente relacionada com a diversidade de plantas, concordando com Gruter et al. (2006). Resultados semelhantes foram descritos no Capítulo 3 do presente trabalho, onde a maior diversidade microbiana foi detectada nos solos florestais em relação aos solos reconstruídos. Ou seja, onde ha a maior diversidade de plantas, ha a maior diversidade de microrganismos.

5.5.1 Ocorrência e distribuição dos filos microbianos nos locais estudados

Observou-se que apenas alguns filos e gêneros são muito abundantes nos solos (abundancia maior do que 0,2%), e a outra porção compõe um raro grupo de microrganismos (abundancia menor que 0,1%) (Pedrós-Alió, 2011). Os microrganismos raros não são tão abundantes, mas podem desempenhar um papel importante na dinâmica da comunidade microbiana.

Encontramos Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria Firmicutes e Verrucomicrobia como filos mais abundante na área de estudo agrícola. Proteobacteria é conhecido por ser o filo mais abundante em

diferentes tipos de solos geograficamente distantes. Janssen (2006) citou Proteobacteria, Acidobacteria e Actinobacteria como os filos mais frequentes no solo. Bergmann et al. (2011) encontraram Verrucomicrobia mais abundante em áreas de pastagens e em solo subsuperficial (mais de 50% das sequências de genes bacterianos 16S rRNA). Youssef e Elshahed (2009) encontraram que Planctomycetes, Firmicutes e delta-Proteobacteria possuem as linhagens mais diversas de todo banco de dados. Por outro lado, Verrucomicrobia, Gemmatimonadetes e beta-Proteobacteria estavam entre os menos diversos.

Notavelmente, alguns filos não apresentaram nenhuma correlação com as características do solo ou com os tratamentos, o que indica que estes grupos podem ser ubíquos em solos cultivados, desde que parecem colonizar abundantemente o solo de todas os tratamentos estudados. Estes filos são Planctomycetes, Firmicutes, Gemmatimonadetes, espiroquetas e Elusimicrobia.

No capítulo 1 do presente trabalho, verificou-se que Proteobacteria e Firmicutes se correlacionaram com as concentrações de Ca e Mg no solo. No presente estudo, Proteobacteria apresentou o mesmo comportamento, mas Firmicutes não (sob o nível de significância utilizado - $p \leq 0,001$). Pode ser porque comparando-se plantio convencional e plantio direto, as diferenças nas características do solo são diferentes o suficiente para causar correlações significativas. No entanto, quando comparamos as culturas de cobertura e rotação de cultura dentro do sistema de plantio direto, a concentração desses elementos não varia significativamente. A correlação entre P e Verrucomicrobia, Firmicutes e Proteobacteria, demonstrou o mesmo comportamento. No experimento comparando preparos de solo, o teor de P foi duas vezes maior no plantio direto do solo, e sua concentração foi correlacionada com um certo grupo de microrganismos. Mas, neste experimento, onde P é a maior naturalmente (plantio direto), o mesmo grupo não se correlacionou com P.

5.5.2 Ocorrência de Archaea no solo estudado

Crenarchaeota foi detectada neste experimento com abundância relativa variando entre 0,1% e 1%, sendo que foi mais abundante nos tratamentos que continham Lablab. Este filo é muito abundante em ambientes marinhos (Fuhrman, 1992), águas termais (Hou et al., 2012; Pagaling et al., 2012;

Reigstad et al., 2008; Zhang et al., 2008), em solos (Jurgens et al., 1997; Ochsenreiter et al., 2003; Lehtovirta et al., 2009; Kemnitz et al., 2007) e outros ambientes. Ochsenreiter et al. (2003) detectou 0,17% de crenarchaeotal rDNA em área próxima a uma lavoura. Encontramos uma abundância semelhante em relação a estes autores. Thaumarchaeota, outro filo archaeal, também foi detectado no presente estudo, sendo mais abundante no tratamento Pousio. Thaumarchaeota está relacionada à oxidação de amônia em solos e em ambientes marinhos (de la Torre, 2008; Lehtovirta-Morley, 2011; Tourna, 2011, Kim et al., 2011; Blainey, 2011). Antes de 2008, Thaumarchaeota era parte do filo Crenarchaeota, mas Brochier-Armanet et al. (2008) propuseram que estes microrganismos eram suficientemente distintos para serem separados do filo Crenarchaeota, em um novo filo. O filo Euryarchaeota compreende espécies anaeróbios, incluindo os metanogênicos, e foi o 18º filo mais abundantemente detectado. Mesmo com abundância relativamente baixo, a presença deste filo indica produção de metano. Este filo não foi detectado no plantio convencional no experimento referente a preparos de solo.

5.5.3 Os gêneros mais abundantes

O gênero *Clostridium* foi o gênero mais abundante em parcelas onde gramíneas foram cultivadas como aveia preta e capim Pangola. Isto indica uma provável relação entre plantas e bactérias, uma vez que é bem conhecido o fato de que a bactéria *Clostridium* pode fixar N para as plantas, sendo um diazotrófico de vida livre (Chen et al., 2001). Tal ocorrência deste microrganismo anaeróbio no sistema de plantio direto pode ser devido a condições frequentemente anóxicas em micrositos onde o solo não é lavrado (Quadros et al., 2012). Considerando a abundância e a ocorrência de *Clostridium* nos solos estudados, este gênero poderia ser usado como um microrganismo assinatura do sistema de plantio direto. Futuros estudos são necessários para quantificar a abundância em solos *Clostridium* outros tipos sob sistema de plantio direto.

Bacillus foi encontrado como o segundo gênero mais abundante nos tratamentos em geral. A ocorrência de *Bacillus* entre os tratamentos, bem como nas parcelas de pousio, foi homogêneo, sem diferença significativa. Além disso, o teste de correlação mostrou que este microrganismo não

correlacionado com qualquer característica de solo particular. Estes resultados indicam que o *Bacillus* pode ser um gênero ubíquo. Neste estudo, foram detectadas 110 espécies diferentes de *Bacillus* (dados não mostrados), sendo que a espécie mais abundante não foi classificada (*Bacillus* sp., Abundância relativa = 0,6% do total de sequencias), seguido de *B. niacini* (abundância = 0,07% do total de sequencias), *B. cereus*, *B. fumarioli*, *B. drentensis*, *B. senegalensis*, *B. soli*, *B. arbutinivorans*, e *B. thuringiensis* (abundância = 0,02% do total de sequencias). A espécie *B. thuringiensis* é normalmente utilizada na agricultura para o controle de insetos, e que pode ter facilitado a disseminação deste microrganismo no local de estudo.

Sphingomonas pode fixar N (Xie e Yokota, 2006; Videira et al., 2007) e é um dos gêneros mais abundante em solos agrícolas. Além disso, e conhecido também por degradar herbicidas (Shi e Bending, 2007), os quais são aplicados várias vezes ao ano em solos agrícolas. Zhalnina et al. (2012), encontraram *Sphingomonas* entre o gêneros mais abundantes em três solos agrícolas dos Estados Unidos e Europa. No capítulo 1 do presente estudo, onde foram comparados os solos de sistemas de plantio direto e convencional, *Sphingomonas* foi o gênero mais abundante em ambos os sistemas. O valor da abundância relativa (calculada) é uma proporção do total de leituras de sequencias (em %), e não a abundância microbiana real. Então, quando se comparou os diferentes sistemas (preparo do solo e plantio direto), *Sphingomonas* foi o gênero mais abundante desses solos, mas quando foram comparados os tratamentos com gramíneas e leguminosas dentro do sistema de plantio direto (este capítulo), *Clostridium* foi o gênero mais abundante, e *Sphingomonas* ficou entre o segundo e terceiro gênero mais abundante detectado. Devido à elevada abundância deste gênero em ambos os estudos, *Sphingomonas* deve desempenhar um papel importante nos solos agrícolas, provavelmente relacionadas com o ciclo de N.

O gênero *Burkholderia*, também conhecido como um fixador de N (Gillis et al., 1995, Van, et al., 2000; Santos et al., 2001), foi mais abundante no solo onde foi plantado Lablab, o que pode indicar uma associação entre este gênero e as raízes destes legumes. Estirpes de *Bradyrhizobium* eficientes na fixação de N foram inoculadas no solo estudado quatro anos antes da coleta das amostras. Este gênero apresentou maior abundância nas parcelas onde

são cultivados legumes, provavelmente devido à influência rizosférica de leguminosas hospedeiras, mas em geral foi encontrado em todas as parcelas. Surpreendentemente, *Bradyrhizobium* correlacionou-se positivamente com o teor de Al no solo e negativamente com o pH, indicando a preferência dessas cepas por solos mais ácidos.

Este estudo revelou diversos aspectos ainda não abordados a respeito dos microrganismos de solo em plantio direto sob cultivo de diferentes composições de gramíneas e leguminosas em Argissolo. Porém é necessário comparar estes resultados com resultados encontrados nos mesmos tratamentos em outro tipo de solo para se generalizar as assertivas que foram feitas.

5.6 CONCLUSÕES

Os gêneros mais abundantes nas rotações de culturas envolvendo leguminosas estão relacionados com o ciclo de N, na maioria fixadores N. A microbiota de solos com cultivo de leguminosas é diferente da microbiota dos solos com cultivo de gramíneas quanto a diversidade, ocorrência e composição microbiana. O gênero *Clostridium* é consistentemente o microrganismo mais abundante no solo de plantio direto estudado, porém futuros estudos são necessários em outros tipos de solo para se confirmar a hipótese que foi gerada neste trabalho.

6. REFERÊNCIAS

- ALLISON, S. D. Cheaters, diffusion and nutrients constrain decomposition by microbial enzymes in spatially structured environments. **Ecology Letters**, Oxford, v. 8, p. 626–635, 2005.
- ANDERSON, T. H.; DOMSCH, K. H. Determination of ecophysiological maintenance carbon requirements of soil microorganism in a dominant state. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 1, p. 81-89, 1985.
- ASTARAEI, A. R. Microbial count and Succession, soil chemical properties as affected by organic debris decomposition. **American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science**, Mashhad, v. 4, p.178-188, 2008.
- BALAMURUGAN, R. et al. Bacterial succession in the colon during childhood and adolescence: molecular studies in a southern Indian village. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 88, n. 6, p. 1643-1647, 2008.
- BARGET, R. D.; SHINE, A. Linkages between plant litter diversity, soil microbial biomass and ecosystem function in temperate grasslands. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 31, p. 317–321, 1999.
- BARNHISEL, R.; BERTSHCH, P. M. Chemical and microbiological properties. In: PAGE, A. L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D. B. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p. 275-300.
- BARRANTES, G.; SANDOVAL, L. Conceptual and statistical problems associated the use of diversity indices in ecology. **Revista de Biologia Tropical**, São Carlos, v. 57, n. 3, p. 451-460, 2009.
- BERGMANN, G. T. et al. The under-recognized dominance of Verrucomicrobia in soil bacterial communities. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 43, p. 1450-1455, 2011.
- BERTIN, C.; YANG, X. H.; WESTON, L. A. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. **Plant and Soil**, Lismore, v. 256, p. 67-83, 2003.
- BIDERRE-PETIT, C. et al. Identification of sulfur-cycle prokaryotes in a low-sulfate lake (lake pavin) using apra and 16S rRNA gene markers. **Microbial Ecology**, Bathesda, v. 61, p. 313-327, 2011.

BLAINEY, P. C. et al. Genome of a low-salinity ammonia-oxidizing archaeon determined by single-cell and metagenomic analysis. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, p. 1–12, 2011.

BOSCH, J. et al. Anaerobic, nitrate-dependent oxidation of pyrite nanoparticles by *Thiobacillus denitrificans*. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 46, p. 2095-101, 2012.

BOT, A.; BENITES, J. **The importance of soil organic matter**. Rome: FAO, 2005.

BRADFORD, M. A.; FIERER, N. The biogeography of microbial communities and ecosystem processes: Implications for soil and ecosystem models. In: WALL, D. H. (Ed.). **Soil ecology and ecosystem services**. Oxford, U.K.: Oxford University Press, 2012. p. 189-200.

BROCHIER-ARMANET, C. et al. Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 6, p. 245–252, 2008.

CABANISS, S. E. Forward modeling of metal complexation by NOM: I. A priori prediction of conditional constants and speciation. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 43, p. 2838-2844, 2009.

CAVICCHIOLI, R.; DEMAERE, M. Z.; THOMAS, T. Metagenomic studies reveal the critical and wide-ranging ecological importance of uncultivated Archaea: the role of ammonia oxidizers. **Bioessays**, Cambridge, v. 29, n.1, p.11-24, 2007.

CGTEE - Companhia de Geração de Energia Elétrica. Disponível em: <<http://www.cgtee.gov.br/sitenovo/index.php>>. Acesso em: 10 out. 2012.

CHAUDHRY, V. et al. Structure of agricultural land due to long-term organic and chemical amendments. **Microbial Ecology**, Bethesda, v. 64, p. 450-460, 2012.

CHEN, J. S.; TOTH, J.; KASAP, M.; Nitrogen-fixation genes and nitrogenase activity in *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Houndmills, v. 27, n. 5, p. 281-286, 2001.

CHENU, C. Influence of a fungal polysaccharide scleroglucan, on clay microstructures. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 21, p. 299-305, 1989.

CHIEN, C. C. et al. Microbial diversity of soil bacteria in agricultural field contaminated with heavy metals. **Journal of Environmental Science**, Beijing, v. 20, p. 359-363, 2008.

CHITSAZ, H. et al. Efficient de novo assembly of single-cell bacterial genomes from short-read data sets. **Nature Biotechnology**, New York, v. 10, p. 915-921, 2011.

CLAESSON, M. J. et al. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 38, n. 22, p. 1-13, e200, 2010.

COLLINS, H. P.; RASMUSSEN, P. E.; DOUGLAS, C. L. Crop rotation and residue management effects on soil carbon and microbial dynamics. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 56, n. 3, p. 783-788, 1992.

COOPER, J. E. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 103, p. 1355-1365, 2007.

DANGI, S. R. et al. Recovery of soil microbial community structure after fire in a sagebrush–grassland ecosystem. **Land Degradation & Development**, Chichester, v. 21, p. 423-432, 2010.

DANGI, S. R. et al. Soil microbial community recovery in reclaimed soils on a surface coal mine site. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 76, p. 915-924, 2012.

DE GROOD, S. H.; CLASSENS, V. P.; SCOW, K. M. Microbial community composition on native and drastically disturbed serpentine soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 1427–1435, 2005.

DE LA TORRE, J. R. et al. Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. **Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 10, p. 810–818, 2008.

DOLFING, J. The microbial logic behind the prevalence of incomplete oxidation of organic compounds by acetogenic bacteria in methanogenic environments. **Microbial Ecology**, Bethesda, v. 41, p. 83-89, 2001.

DONG, X. L.; LIU, D. M. Environment pollution during coal development and control measures. **Coal Science and Technology**, Beijing, v. 33, p. 67-71, 2005.

DORR DE QUADROS, P. et al. The effect of tillage system and crop rotation on soil microbial diversity and composition in a subtropical Acrisol. **Diversity**, Basel, v. 4, p. 375-395, 2012.

DRIESSEN, P. et al. **Lecture notes on the major soils of the world**. Rome: FAO, 2001.

EDWARD, F.; DELONG. Archaea in coastal marine environments. **Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.**, Washington, v. 89, p. 5685-5689, 1992.

EMBRAPA - Brazilian Company of Agricultural Research. **Brazilian system of soil classification**. Rio de Janeiro, 2006.

ERCOLINI, D. et al. PCR-DGGE fingerprints of microbial succession during a manufacture of traditional water buffalo mozzarella cheese. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, p. 263-270, 2004.

FANNING, D. S.; FANNING, M. C. B. **Soil: morphology, genesis and classification**. New York: J. Willey, 1989. 395 p.

FIERER, N.; BRADFORD, M. A.; JACKSON, R. B. Toward an ecological classification of soil bacteria. **Ecology**, Ithaca, v. 88, p. 1354-1364, 2007.

FIERER, N. et al. Searching for unifying principles in soil ecology. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 2249-2256, 2009.

FIERER, N.; LADAU, J. Predicting microbial distributions in space and time. **Nature Methods**, New York, v. 9, p. 549-551, 2012.

FIERER, N. et al. Changes through time: integrating microorganisms into the study of succession. **Research in Microbiology**, New York, v. 161, p. 635-642, 2010.

GAIVIZZO, L. H. B. et al. Pollutant potential of coal rejects: II- recuperation effects with soil layers in plants and microbial population. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, p. 955-961, 2002.

GHAJ, R. et al. New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments. **Scientific Reports**, London, v. 1, p. 1-10, srep00135, 2011.

GILLIS, M. et al. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an amended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 45, n. 2, p. 274-289, 1995.

GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M. A. The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 81, p. 591-606, 2008.

GONZALEZ, J. E.; KESHAVAN, N. D. Messing with bacterial quorum sensing. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 70, p. 859-875, 2006.

GRÜTER, D.; SCHMID, B.; BRANDL, H. Influence of plant diversity and elevated atmospheric carbon dioxide levels on belowground bacterial diversity. **BMC Microbiology**, London, v. 6, p. 68, 2006.

GUEBERT, M. D.; GARDNER, T. W. Macropore flow on a reclaimed surface mine: infiltration and hillslope hydrology. **Geomorphology**, Amsterdam, v. 39, p. 151-169, 2001.

HARDER, W.; DIJKHUIZEN, L. Physiological responses to nutrient limitation. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 37, p.1-23, 1983.

HARUTA, S. et al. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 25, n. 109, p. 79-87, 2006.

HEYWOOD, J. L. et al. Capturing diversity of marine heterotrophic protists: one cell at a time. **ISME Journal**, London, v. 5, p. 674-684, 2011.

HOLT, E. A.; MILLER, S. W. Bioindicators: using organisms to measure environmental impacts. **Nature Education Knowledge**, New York, v. 3, n. 10, p. 8, 2011.

HOU, W. et al. A comprehensive census of microbial diversity in hot springs of tengchong, Yunnan Province China using 16S rRNA gene pyrosequencing. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 1, p. 1-15, e53350, 2013.

INGRAM, L. J. et al. Microbial respiration and organic carbon indicate nutrient cycling recovery in reclaimed soils. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 69, p. 1737-1745, 2005.

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

JENKINSON, D. S.; POWLSON, D. S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil - I. Fumigation with chloroform. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 8, p. 209-213, 1976.

JUHAS, M. et al. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 33, p. 376-393, 2009.

JURGENS, G.; LINDSTRÖM, K.; SAANO, A. Novel group within the kingdom Crenarchaeota from boreal forest soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 803–805, 1997.

KÄMPF, N. et al. Solos construídos em áreas de mineração da Bacia Carbonífera. In: UFRGS. Centro de Ecologia. **Carvão e meio ambiente**. Porto Alegre: 2000. Cap. 17, p. 596-640.

KAMPF, N.; SCHNEIDER, P.; GIASSON, E. Properties, pedogenesis and classification of constructed soils in coal mining areas of the Baixo Jacuí region

in Southern Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 21, p. 79-88, 1997.

KEISER, A. D. et al. The effect of resource history on the functioning of soil microbial communities is maintained across time. **Biogeosciences**, Katlenberg-Lindau, v. 8, p. 1477-1486, 2011.

KEMNITZ, D.; KOLB, S.; CONRAD, R. High abundance of Crenarchaeota in a temperate acidic forest soil. **FEMS Microbiology and Ecology**, Amsterdam, v. 60, p. 442–448, 2007.

KIM, B. K. et al. Genome sequence of an ammonia-oxidizing soil archaeon, “Candidatus *Nitrosoarchaeum koreensis*” MY1. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 193, p. 5539–5540, 2011.

KONOPKA, A. What is microbial community ecology? **ISME Journal**, London, v. 3, n. 11, p. 1223-30, 2009.

KOPPE, J. C.; COSTA, J. F. C. L. Mineração. In: TEIXEIRA, E. C. (Ed.). **Meio ambiente e carvão: impactos da exploração e utilização**. Porto Alegre: FEPAN, 2002. p. 15-27.

LEHTOVIRTA-MORLEY, L. E. et al. Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. **Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.**, Washington, v. 108, p. 15892-15897, 2011.

LEHTOVIRTA, L. E.; PROSSER, J. E.; NICOL, G. W. Soil pH regulates the abundance and diversity of Group 1.1c Crenarchaeota. **FEMS Microbiology and Ecology**, Amsterdam, v. 70, p. 367–376, 2009.

LIU, Z. P. et al. *Novosphingobium taihuense* sp nov., a novel aromatic-compound-degrading bacterium isolated from Taihu Lake, China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 1229-1232, 2005.

LUO, C. et al. Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 2, p. 1-12, e30087, 2012.

MARAIS, A. et al. Effects of monoculture, crop rotation, and soil moisture content on selected soil physicochemical and microbial parameters in wheat fields. **Applied and Environmental Soil Science**, Washington, v. 2012, p. 1-13, article ID 593623, 2012.

MARGULIES, M. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, p. 376-380, 2005.

MARTINY, A. C. et al. Long-term succession of structure and diversity of a biofilm formed in a model drinking water distribution system. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 6899-6907, 2003.

MIETHKE, M.; MARAHIEL, M. A. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 71, p. 413-451, 2007.

MORAN, N. A.; MACUTCHEON, J. P.; NAKABACHI, A. Genomics and Evolution of Heritable Bacterial Symbionts. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 42, p. 165-190, 2008.

NIMATUZHROH, G. M. et al. In-vitro study of interaction between photo-oxidation and biodegradation of 2-methylphenanthrene by *Sphingomonas* sp 2MP11. **Chemosphere**, Oxford, v. 38, p. 2501-2507, 1999.

NORDSTROM, D. K. Aqueous pyrite oxidation and the consequent formation of secondary iron minerals. In: KITTRICK, J. A.; FANNING, D. S.; HOSSNER, L. R. (Ed.). **Acid sulfate weathering**. Madison: Soil Science Society of America Publications, 1982. p. 37-56.

OADES, J. M. Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for management. **Plant and Soil**, The Hague, v. 76, p. 319-337, 1984.

OADES, J. M. The role of biology in the formation, stabilization and degradation of soil structure. **Geoderma**, Amsterdam, v. 56, p. 377-400, 1993.

OCHSENREITER, T. et al. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. **Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 5, p. 787-797, 2003.

OKABE, S. M.; ODAGIRI, T. I.; SATOH, H. Succession of sulfur-oxidizing bacteria in the microbial community on corroding concrete in sewer systems. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 3, p. 971-980, 2007.

ORR, C. H. et al. Impacts of organic and conventional crop management on diversity and activity of free-living nitrogen fixing bacteria and total bacteria are subsidiary to temporal effects. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 12, p. 1-13, e52891, 2012.

OSONO T. Colonization and succession of fungi during decomposition of *Swida controversa* leaf litter. **Mycologia**, Lancaster, v. 97, n. 3, p. 589-97, 2005.

OVERMANN, J.; VAN GEMERDEN, H. Microbial interactions involving sulfur bacteria: implications for the ecology and evolution of bacterial communities. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 24, p. 591-599, 2000.

PAGALING, E. et al. Bacterial and archaeal diversity in two hot spring microbial mats from the geothermal region of Tengchong, China. **Extremophiles**, Berlin, v. 16, p. 607-618, 2012.

- PALMER, C. et al. Development of the human infant intestinal microbiota. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 5, p. 1-18, e177, 2007.
- PANKHURST, C.; DOUBE, B. M.; GUPTA, V. V. S. R. (Ed.). **Biological indicators of soil health**. Wallingford: CAB International, 1997.
- PEDRÓS-ALIÓ, C. The rare bacterial biosphere. **Annual Review of Marine Science**, Palo Alto, v. 4, p. 449-466, 2011.
- PICHTEL, J. R.; DICK, W. A.; SUTTON, P. Comparison amendments and management practices for long-term reclamation of abandoned mine lands. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 23, p. 766-772, 1994.
- POTTER, K. N.; CARTER, F. S.; DOLL, E. C. Physical properties of constructed and undisturbed soils. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 52, p. 1453-1438, 1988.
- QUINCE; C. et al. Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. **Nature Methods**, New York, v. 6, p. 639-641, 2009.
- REDFORD, A. J.; FIERER, N. Bacterial succession on the leaf surface: a novel system for studying successional dynamics. **Microbial Ecology**, Bethesda, v. 58, p. 189-198, 2009.
- REIGSTAD, L. J. et al. Nitrification in terrestrial hot springs of Iceland and Kamchatka. **FEMS Microbiology and Ecology**, Amsterdam, v. 64, p. 167–174, 2008.
- RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 56, p. 117-137, 2002.
- RYAN, R. P.; DOW, J. M. Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. **Microbiology**, Reading, v. 154, p. 1845–1858, 2008.
- SANTOS, E. D. L. P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2790-2798, 2001.
- SCHMIDT, M. W. I. et al. Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. **Nature**, New York, v. 478, p. 49–56, 2011.
- SHI, S.; BENDING, G. D. Changes to the structure of *Sphingomonas* spp. communities associated with biodegradation of the herbicide isoproturon in soil. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 269, p. 110–116, 2007.
- SHI, X.; HE, F. The environmental pollution perception of residents in coal mining areas: a case study in the Hancheng mine area, Shaanxi Province, China. **Environmental Management**, New York, v. 50, n. 4, p. 505-513, 2012.

SINGLETON, D. R. et al. Pyrosequence analyses of bacterial communities during simulated in situ bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, 2012. Epub ahead of print.

SIX, J. et al. A history of research on the link between (micro) aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. **Soil & Tillage Research**, Washington, v. 79, p. 7-31, 2004.

SIX, J. et al. Stabilization mechanisms of soil organic matter: implications for C-saturation of soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 241, p. 155-176, 2002.

SIX, J. et al. Aggregation and soil organic matter accumulation in cultivated and native grassland soils. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 62, p. 1367-1377, 1998.

SIX, J.; JASTROW, J. D. Soil organic matter turnover. In: LAL, R. (Ed.). **Encyclopedia of Soil Science**. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 936-942.

SOGIN, M. L. et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, Washington, v. 103, p. 12115-12120, 2006.

SOHN, J. H. et al. *Novosphingobium pentaromativorans* sp. nov., a high-molecular-mass polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from estuarine sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1483-1487, 2004.

SOWELL, S. M. et al. Transport functions dominate the SAR11 metaproteome at low-nutrient extremes in the Sargasso Sea. **ISME Journal**, London, v. 3, p. 93-105, 2009.

STEPANAUSKAS, R. Single cell genomics: an individual look at microbes. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v. 15, n. 5, p. 613-20, 2012.

STOTZKY, G.; PRAMER, D. Activity, ecology and population dynamics of microorganisms in soil. **Critical Reviews in Microbiology**, Cleveland, v. 2, p. 59-137, 1972.

STRICKLAND, M. S. et al. Testing the functional significance of microbial community composition. **Ecology**, Ithaca, v. 90, p. 441-451, 2009.

SUTTLE, C. A. Marine viruses: major players in the global ecosystem. **Nature Review of Microbiology**, New York, v. 5, p. 801-812, 2007.

SWAN, B. K. et al. Potential for chemolithoautotrophy among ubiquitous bacteria lineages in the dark ocean. **Science**, Washington, v. 333, p. 1296-1300, 2011.

TABATABAI, M. A. Physicochemical fate of sulfate in soils. **Journal of the Air Pollution Control Association**, Los Angeles, v. 37, p. 34-38, 1987.

TABATATAI, M. A. Enzymes. In: WEAVER, R. W.; ANGLE, J. S.; BOTTOMLEY, P. S. (Ed.). **Methods of soil analysis**: part 2. Madison: Soil Science Society of America Journal, 1994. p. 755-833.

TEDESCO, J. M. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: UFRGS, 1995.

THENG, B. K. G. Clay-humic interactions and soil aggregate stability. In: RENGASAMY, P. (Ed.). **Soil structure and aggregate stability**. Tatura: Institute of Irrigation and Salinity Research, 1987. p. 32-73.

TISDALL, J. M.; OADES, J. M. Organic matter and water stable aggregates in soil. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 33, p. 141-163, 1982.

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

TOURNA, M. et al. Nitrososphaera viennensis, an ammonia oxidizing archaeon from soil. **Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.**, Washington, v. 20, p. 8420-8425, 2011.

TRAN VAN, V. et al. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. **Plant and Soil**, The Hague, v. 218, p. 273-284, 2000.

VAN-CAMP, L. et al. **Reports of the technical working groups established under the thematic strategy for soil protection**. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2004. 872 p.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 703-707, 1987.

VILLARREAL, D. T.; TURCO, R. F.; KONOPKA, A. Propachlor degradation by a soil bacterial community. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 2135-2140, 1991.

WANNER, G.; VOGL, K.; OVERMANN, J. Ultra structural characterization of the prokaryotic symbiosis in '*Chlorochromatium aggregatum*'. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 190, p. 3721-3730, 2008.

WOYKE, T. et al. Assembling the marine metagenome, one cell at a time. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 4, p. 1-12, e5299, 2009.

YILMAZ, S.; SINGH, A. K. Single cell genome sequencing. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 23, n. 3, p. 437-443, 2012.

YIN, B. et al. Bacterial functional redundancy along a soil reclamation gradient. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 4361-4365, 2000.

YOON, H. S. et al. Single-cell genomics reveals organismal interactions in uncultivated marine protists. **Science**, Washington, v. 332, p. 714-717, 2011.

YOUSSEF, N. H.; ELSHAHED, M. S. Diversity rankings among bacterial lineages in soil. **ISME Journal**, London, v. 3, n. 3, p. 305-13, 2009.

YUANHU, L.; ZHAO, S.; WANG, Y. Microbial desulfurization of ground tire rubber by *Sphingomonas* sp.: a novel technology for crumb rubber composites. **Journal of Polymers & the Environment**, New York, v. 20, p. 372, 2012.

ZAK, D. R. et al. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links? **Ecology**, Ithaca, v. 84, p. 2042–2050, 2003.

ZHANG, C. L. et al. Global occurrence of archaeal amoA genes in terrestrial hot springs. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 6417–6426, 2008.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É bem sabido que existem diferenças entre as raízes de leguminosas e gramíneas, em relação à sua arquitetura e área superficial específica. Além disso, existe também a variação de substâncias que são exsudadas pelas raízes destas plantas. Algumas leguminosas parecem restringir a diversidade microbiana. Isto provavelmente acontece devido a predominância de fixadores de nitrogênio.

Comparando-se solos de floresta com solos construídos ou cultivados, foram observados indicativos de que a diversidade de plantas determina a diversidade de microorganismos no solo. Nos solos de floresta, campo nativo, a diversidade microbiana apresentou valores significativamente superiores. Numa segunda estância, o mesmo foi observado em parcelas onde apenas gramíneas foram cultivadas.

A abundância e composição microbiana do solo variam substancialmente com o tipo de vegetação (floresta, campo nativo, leguminosas, gramíneas, etc.) e manejo do solo. Diferentes tipos de vegetação proporcionam diferentes ambientes rizosféricos e produzem material orgânico (restos de vegetação da parte aérea) com características químicas e taxas de decomposição diferentes. Isto gera ambientes específicos, o que estimulam o crescimento de determinados microorganismos, como por exemplo *Thiobacillus* em solos pós-construídos, *Bradyrhizobium* em solos naturais (floresta e campo nativo), *Sphingomonas* em plantio convencional, e *Clostridium* em sistema de plantio direto.

Cada microorganismo tem uma função específica para regular e equilibrar o habitat do solo. Eles trabalham de forma dinâmica para tentar degradar primeiro o que há em excesso. Além disso, os microorganismos tiram

vantagem das características do ambiente que propiciem melhores condições para crescimento.

A competição é um processo natural que permeia o ecossistema microbiano do solo.

O estudo da ecologia microbiana do solo permite a compreensão da função do solo. Isto é importante para revelar o papel dos microrganismos nos ciclos biogeoquímicos, os quais regulam os níveis de C e N do planeta.

Este estudo, comparou diferentes tipos de manejo do solo, mostrou como a ocorrência, diversidade e composição dos microrganismos se altera em função das características do solo. Estes resultados podem estimular estudos futuros sobre a qualidade do solo, microrganismos bioindicadores, e de manejo do solo.

8. BIOGRAFIA

Patrícia Dorr de Quadros nasceu em 11 de abril de 1975, em Sapucaia do Sul, Brasil. Deu a luz a sua filha Camille Vitoria em 25 de abril de 2003. Se formou em agronomia em dezembro de 2007 na Faculdade de Agronomia da UFRGS, e obteve o grau de mestre em Ciência do Solo no departamento de Ciência do Solo da Faculdade de Agronomia da UFRGS em março de 2009. Iniciou seu doutorado em Microbiologia e Bioquímica do Solo no mesmo departamento em março de 2010. Foi trabalhar no Projeto Terra do Futuro em Angola/África em 2010 durante dois meses, onde lecionou ciência do solo, fruticultura e plantas de lavoura totalizando 670 horas/aula. Em fevereiro de 2011, iniciou seu doutorado sanduiche na universidade da Flórida, em Gainesville/USA, retornando em fevereiro de 2013.

