

**PROSPECÇÃO E AVALIAÇÃO  
DA DIVERSIDADE BACTERIANA  
EM SOLO SOB AÇÃO  
ANTROPOGÊNICA.**

**LUCAS DANIEL RIBEIRO**

**Orientador: Drº Jackson Antônio Marcondes de Souza**

**Coorientador: Drª Mariana Carina Frigieri Salaro**

**Trabalho apresentado a Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal - Fatec, para obtenção do título de Tecnólogo em Biocombustíveis.**

**Jaboticabal – SP  
2º Semestre/2012**

Ribeiro, Lucas Daniel

R484p Prospecção e avaliação da diversidade bacteriana em solo sob ação antropogênica / Lucas Daniel Ribeiro. — Jaboticabal: Fatec, 2012.

34f.

Orientador: Jackson Antônio Marcondes de Souza

Coorientador: Mariana Carina Frigieri Salaro

Trabalho (graduação) – Apresentado ao Curso de Tecnologia em Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, 2012.

1. DNA metagenômico. 2. Vinhaça 3. 16S rRNA. I. SOUZA, J. A. M..  
II. Título

CDU 631.461

## Curso de Tecnologia em Biocombustíveis

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** PROSPECÇÃO E AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE BACTERIANA EM SOLO SOB AÇÃO ANTROPOGÊNICA.

**AUTOR:** LUCAS DANIEL RIBEIRO

**ORIENTADOR:** PROF. DR. Jackson Antônio Marcondes de Souza

**COORIENTADORA:** PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> Mariana Carina Frigieri Salaro

Trabalho de Graduação aprovado pela Banca Examinadora como parte das exigências para conclusão do Curso Superior de Tecnologia em Biocombustíveis, apresentado à FATEC-JB para a obtenção do título de Tecnólogo.

**JACKSON ANTÔNIO MARCONDES DE SOUZA**

**MARIA BENINCASA VIDOTTI**

**KARLA CRISTINA STROPA**

Data da apresentação: 20 de Dezembro de 2012.

---

Jackson Antônio Marcondes de Souza

*Dê-me um ponto de apoio e eu moverei o mundo.*

Arquimedes (287-212 AC)

*No temor ao SENHOR, o homem encontra um forte APOIO e também segurança para a sua família.*

Provérbios 14.26

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me permitir passar por mais esta etapa;

A toda minha família, em especial minha mãe Ivone por todo apoio dado desde o início deste trabalho e aos meus irmãos Daniele e Samuel;

Ao Prof. Dr<sup>o</sup> Jackson Antônio Marcondes de Souza, pela confiança depositada em mim, pois mesmo sem me conhecer aceitou me orientar;

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariana Carina Frigieri por aceitar meu convite na coorientação;

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, responsável pelo Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas – LBMP, por ter me aceito em seu laboratório;

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Benincasa Vidotti e a Ms.<sup>a</sup> Karla Cristina Stropa Goulart, por aceitarem fazer parte da banca examinadora;

A todos os professores da FATEC – Jaboticabal pelos ensinamentos prestados;

Aos amigos do LBMP, pelos excelentes momentos passados juntos que fizeram meus dias de trabalho muito mais felizes;

Ao Wellington Pine Omori que desde o meu primeiro dia no laboratório me ajudou muito;

A minha querida noiva que sempre me ajudou com muito amor e carinho, Sani te amo;

Ao Sebastião, Silvia, Diego, Murilo e Erik por terem me ajudado e apoiado desde o início de minha graduação;

A fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa concedida para realização deste trabalho.

## RESUMO

### Prospecção e avaliação da diversidade bacteriana em solo sob ação antropogênica

A expansão da cultura de cana de açúcar fez com que houvesse um aumento na produção de vinhaça, que é um resíduo com alto potencial poluente. Uma alternativa no uso da vinhaça tem sido a fertirrigação, técnica de aplicação de vinhaça em áreas de cultivo de cana de açúcar sem tratamento ou remediação. A aplicação deste efluente faz com que, após os primeiros dias, o solo melhore suas características favorecendo a cultura e também os microrganismos presentes no ambiente, fazendo com que se tenha um aumento na atividade microbiana. Conhecer a diversidade de microrganismos no solo é de extrema importância, pois ela pode passar informações da qualidade deste ambiente. Para os estudos sobre diversidade é necessário o uso de um marcador molecular com características que o tornem confiável para essas análises. O gene *16S rRNA* vem sendo amplamente utilizado como marcador molecular no estudo de diversidade procariótica em amostras ambientais. Uma das principais características que viabilizaram o seu uso foi o fato desse gene apresentar regiões conservadas na maioria dos organismos e regiões variáveis as quais permitem identificar o tipo de microrganismos. Para avaliação da diversidade procariótica em solo extraído de um canal de irrigação da vinhaça, DNA metagenômico foi obtido e utilizado para obtenção de amplicons relacionados ao *16S rRNA*. As análises de sequências de DNA destes amplicons referenciaram que os principais grupos bacterianos estão classificados dentro de cinco filos diferentes, a saber, “*Acidobacteria*”, “*Actinobacteria*”, *Firmicutes*, “*Gemmatimonadetes*” e “*Proteobacteria*”. Adicionalmente, em conjunto com os dados físico-químicos do solo, conclui-se que utilizando microrganismos como indicadores de qualidade, o solo apresenta boas condições tanto do ponto de vista agrícola quanto do microbiológico.

**Palavras Chave:** DNA metagenômico, *16S rRNA*, Vinhaça, Fertirrigação.

# ABSTRACT

## Prospection and assessment of the bacterial diversity in soil under anthropogenic action

The expansion of sugarcane crop renders an increase in vinasse production, which is a waste with powerful pollutant characteristics. An alternative for vinasse application consists in fertigation, that is its application without treatment or remediation in areas of sugarcane cultivation. Vinasse improves soil conditions after the first days of application favoring both the crop as the microorganisms presents in the environment causing increment in microbial activities. Knowing soil microbial diversity is of great importance once it provides information of environmental quality. For diversity studies it is necessary the application of a molecular marker presenting reliable characteristics for that purpose. *16S rRNA* gene has being wide utilized as a molecular marker in studies of prokaryotic diversity in environmental samples. One of the major characteristics that turns viable the *16S rRNA* application consist in the presentation of both conserved and variable regions into its sequence in the majority of microorganisms. For assessment of prokaryotic diversity into soil extracted from a vinasse irrigation duct, metagenomic DNA was obtained and utilized for the acquisition of *16S rRNA* amplicons. DNA sequence analysis reveals that the major bacterial groups presented are classified within five different phylum, which are “*Acidobacteria*”, “*Actinobacteria*”, *Firmicutes*, “*Gemmatimonadetes*”, and “*Proteobacteria*”. In addition, a set of physicochemical data help to conclude that utilization of microorganisms as soil quality indicators revealed a good quality the soil and good condition both from the standpoint of agricultural and microbiological.

**Key-words:** Metagenomic DNA, *16S rRNA*, Vinasse, Fertigation.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Regiões conservadas e variáveis do gene <i>16S rRNA</i> . Regiões conservadas (C1 – C9) são mostradas em cinza, regiões variáveis (V1 – V9), estão em cores diferentes.....	16
FIGURA 2 - Mapa do vetor pJET 1.2/blunt.....	19
FIGURA 3 – Árvore fenética comparativa entre 30 sequências obtidas. Utilizou-se como critério de elaboração da árvore o método de análise de distância por agrupamento <i>Neighbor-Joining</i> e amostragem dos dados com 1.000 réplicas ( <i>Bootstrap</i> ). As sequencias utilizadas como comparativo foram obtidas nos bancos de dados NCBI e RDP. ....	25
FIGURA 4 - Frequência de Filos observada utilizando como parâmetro de análise a ferramenta Classifier do banco de dados RDP II. ....	27
FIGURA 5 - Frequência de Classes observada utilizando como parâmetro de análise a ferramenta Classifier do banco de dados RDP II. ....	27
FIGURA 6 - Frequência de Ordens observada utilizando como parâmetro de análise a ferramenta Classifier do banco de dados RDP II. ....	28
FIGURA 7 - Curvas de rarefação calculadas pelo programa DOTUR usando 95%, 89% e 80% de similaridade para o agrupamento das sequências 16S rDNA. ....	29

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	10
2. OBJETIVOS.....	11
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	12
3.1 Vinhaça .....	12
3.2 Comunidades de microrganismos do solo .....	13
3.3 Perfil ecológico baseado no <i>16S rRNA</i> .....	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	17
4.1 Coleta do solo .....	17
4.2 Análise do solo.....	17
4.3 Extração do DNA metagenômico .....	17
4.4 Amplificação por PCR do gene <i>16S rRNA</i> .....	18
4.5 Purificação dos amplicons 16S rDNA .....	18
4.6 Reação de ligação do inserto no vetor .....	19
4.7 Transformação em Célula de <i>Escherichia Coli</i> DH10B.....	20
4.8 Extração de DNA Plasmidial .....	20
4.9 Reação de PCR e sequenciamento do inserto 16S rDNA.....	20
4.10 Análises das sequências obtidas.....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23
5.1 Características do solo .....	23
5.2 Perfis das bactérias encontrados no solo.....	24
6. CONCLUSÃO .....	30
7. REFERÊNCIAS .....	31

## 1. INTRODUÇÃO

Em 1975, o cultivo de cana de açúcar (*Saccharum* sp.) teve sua produção estimulada, devido à criação do Programa de Nacional do Alcool (PROÁLCOOL), cujo objetivo principal era incentivar a produção de etanol visando alternativas para enfrentar a crise do petróleo. Desde então, o açúcar que era o principal produto derivado da cultura da cana, cedeu lugar ao etanol que deixou de ser um produto secundário (FLEXOR, 2007; FONSECA, 2008; OLIVEIRA, 2010). O aumento da produção agrícola da cultura da cana e industrial de seus derivados ocasionou uma acentuada produção de resíduos, sendo o principal deles a vinhaça; a qual é gerada de 10 a 18 litros, para cada litro de etanol produzido. Esse efluente apresenta elevada carga orgânica, alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO) o que aliado com o baixo pH, caracteriza uma grande capacidade poluidora para fontes de água. (PEREIRA et al., 1992; BARROS et al., 2010). Para minimizar os efeitos danosos deste resíduo, atualmente tem-se usado um processo chamado de fertirrigação, no qual a vinhaça é disposta no solo *in natura* sem qualquer tipo de tratamento (LEITE, 1999; PAULINO, et al. 2002). Alguns dias após essa aplicação no solo os efeitos observados são: elevação do pH, aumento da capacidade de troca catiônica (CTC) e aumento da atividade microbiana (SILVA et al., 2007; GIACHINI e FERRAZ, 2009).

O solo é o maior depósito de vida do planeta, sendo estimado que em 1 grama de solo possa estar contido mais de  $10^9$  microrganismos. Isto representa cerca de  $10^4$  genomas diferentes e menos de 1% desta diversidade pode ser cultivada por métodos tradicionais de microbiologia, problema que pode ser evitado com uma abordagem metagenômica, visto que a metagenoma, extrai o DNA de todos os microrganismos presentes no solo. Baseado nesta dinâmica apresentada pelos organismos presentes no solo, técnicas moleculares, tais como as que amplificam o gene *16S rRNA*, são comumente aplicados na análise dos impactos ocasionados na diversidade microbiana desses ecossistemas, além de gerar informações suficientes para caracterizar a interação dessas comunidades com os nutrientes e condições a que são expostas. O gene *16S rRNA* apresenta uma estrutura de 1542 pares de bases (pb) e a análise total ou parcial deste gene permite obter informações suficientes para a realização de estudos filogenéticos de confiança (AMANN et al, 1995; SCHLOSS e HANDELSMAN, 2003; TORSVIK e OVREAS, 2002; DANIEL, 2005; MADIGAN *et al.*, 2010; PESSOA FILHO, 2010; DELMONT et al., 2011).

## 2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho consistiu na caracterização da diversidade microbiana procariótica de solo extraído do canal de irrigação da vinhaça, por meio da abordagem do marcador molecular *16S rRNA* metagenômico.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Vinhaça

A partir da década de 70 com a primeira crise do petróleo, foi necessária a criação do Programa Nacional do Alcool (PROÁLCOOL), para suprir a demanda por combustíveis, e o objetivo do programa foi substituir o consumo de derivados de hidrocarbonetos por combustíveis renováveis, no caso o etanol. O PROÁLCOOL foi responsável pela expansão do cultivo de cana no Brasil (CARVALHO e CARRIJO, 2007). A cana de açúcar é um dos principais produtos da agricultura brasileira e ela tem um grande destaque sócio econômico em nosso país.

O Brasil ocupa hoje a segunda posição na produção mundial de etanol, atrás dos Estados Unidos. O país produziu na safra 2009/2010 cerca de 25,7 bilhões de litros de etanol (MAPA, 2011). Com o aumento na produção cresceu também a quantidade de resíduos, sendo o principal deles a vinhaça e a quantidade produzida varia de acordo com o teor alcoólico do vinho fermentado, variando de 10 a 18 litros para cada litro de etanol (BAFFA et al., 2009).

A vinhaça apresenta elevada carga orgânica e grande quantidade de nutrientes, especialmente o potássio (K). Essas características fazem com que esse resíduo tenha sua principal utilização como fertilizante nas plantações de cana de açúcar (PREZOTTO, 2009). A utilização de vinhaça nas lavouras tem crescido muito em todas as regiões do país, se firmando como a melhor alternativa para não contaminar rios e cursos d'água (BARROS, 2012).

A vinhaça é aplicada no solo sem tratamento ou remediação, fazendo com que nos dez primeiros dias da aplicação o pH fique consideravelmente baixo, após esse período observa-se o aumento podendo alcançar valores maiores do que sete; este efeito pode estar ligado a ação dos microrganismos na decomposição da matéria orgânica. A utilização deste resíduo proporciona ao solo vários benefícios, entre eles o aumento da capacidade de troca catiônica (CTC) e da retenção de água. Biologicamente, a vinhaça proporciona aumento da população e atividade microbiana do solo, pois quando a matéria orgânica existente neste resíduo agroindustrial incorpora-se ao solo, ocorre a colonização por fungos, que se desenvolvem bem em pHs baixos. Estes, por sua vez, transformam a carga orgânica em húmus, neutralizando o pH do solo e assim abrindo caminho para proliferação bacteriana, as quais necessitam de pHs mais neutros. As

bactérias são responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio, entre outros ciclos biogeoquímicos (SILVA, 2007; OLIVEIRA, 2010).

### **3.2 Comunidades de microrganismos do solo**

A evolução dos microrganismos ocorre há aproximadamente 4 bilhões de anos e há pelo menos 2 bilhões de anos atrás eles eram a única forma de vida na terra. Devido a sua longa história evolutiva e a necessidade de adaptação aos mais diferentes ambientes os microrganismos acumulam uma impressionante diversidade genética, que é muito maior do que a dos outros organismos. Desta maneira os microrganismos apresentam o repertório mais rico em diversidade química e molecular na natureza, constituindo a base de processos ecológicos, como os ciclos biogeoquímicos e a cadeia trófica (ZILLI et al., 2003).

O estudo da diversidade de procariotos vem se destacando devido à importância destes organismos para o funcionamento da biosfera, pois são fundamentais na ciclagem de nutrientes, nos ciclos biogeoquímicos, síntese de produtos naturais, biocatálise, conversão de energia e processos de biorremediação devido a sua enorme versatilidade metabólica. Através de processos evolutivos os procariotos colonizaram e dominaram a maior parte dos ecossistemas terrestres. O solo como um recurso natural não renovável comporta uma grande extensão da biodiversidade que necessita ser descoberta, ele possui uma biota que contém uma diversidade maior do que qualquer outro ecossistema estimando-se que um grama de solo possa conter mais de 10 bilhões de microrganismos (COSTA, 2011; DANIEL, 2005).

Entende-se por diversidade biológica a variedade de espécies em um determinado ecossistema, assim como, os vários genótipos dentro de uma mesma espécie. A diversidade biológica nos solos pode ser explicada pelo elevado número de espécies e suas contribuições com os processos bioquímicos no ambiente e ela pode ter um papel importante na manutenção da qualidade dos solos auxiliando na identificação de alterações presentes no ambiente. Estudos apontam que os microrganismos são os seres vivos mais comuns da biosfera (NUNES, 2006; WHITMAN et al., 1998). A TABELA 1 mostra a abundância de microrganismos em diferentes tipos de solos.

TABELA 1 - Abundância de microrganismos em diferentes tipos de solos.

FONTE DE DNA	CÉLULAS POR cm <sup>3</sup>
Solo de Floresta	4,8 x 10 <sup>9</sup>
Solo de Floresta (procariotos cultiváveis)	1,7 x 10 <sup>7</sup>
Solo de Pastagem	1,8 x 10 <sup>10</sup>
Solo Arável	2,1 x 10 <sup>10</sup>
Sedimento Marinho	3,1 x 10 <sup>9</sup>
Sedimento Marinho (fazenda de peixes)	7,7 x 10 <sup>9</sup>
Tanque de Cristalização de sal (22% de salinidade)	6,0 x 10 <sup>9</sup>

\*Os dados são estrapolações de resultados obtidos por microscopia de fluorescência.

(FAORO, 2006).

O metabolismo e a sobrevivência dos microrganismos do solo são diretamente influenciados por mudanças desses ambientes. Variações na disponibilidade de água, pH, o tipo e as propriedades do solo afetam a microbiota presente no ambiente. Portanto, o estudo da diversidade procariótica em diferentes ambientes é essencial para o entendimento da função desses microrganismos e como eles se adaptam a cada solo (COSTA, 2011; DANIEL, 2005).

A diversidade de microrganismos pode diminuir ou ter seu funcionamento afetado em decorrência de atividades antrópicas, o que resulta em desequilíbrios ecológicos de consequências imprevisíveis e até na extinção de espécies essenciais na manutenção do ecossistema. A poluição dos solos afeta a comunidade de microrganismos podendo reduzir a abundância de espécies, extinguindo indivíduos não adaptados ao estresse imposto e também favorecendo o enriquecimento de espécies mais adaptadas. O tempo que o ecossistema leva para retornar ao seu estado inicial define sua resiliência; quanto maior esse tempo, menor sua resiliência, embora, a relação entre a diversidade das comunidades de microrganismos e sua resiliência não esteja bem definida (ATLAS, 1984; CURY, 2002).

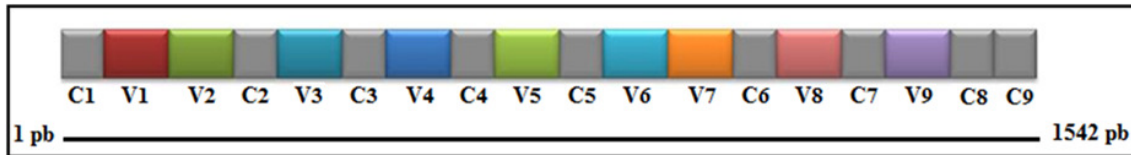
### 3.3 Perfil ecológico baseado no *16S rRNA*

Na busca por conhecimento do mundo microbiano intensificaram-se os estudos acerca dos microrganismos e para resultados confiáveis tornou-se necessário a escolha de um relógio molecular ideal para as inferências sobre relações evolutivas entre os microrganismos. O RNA ribossômico (rRNA) é muito utilizado para análises filogenéticas, especialmente em procariotos, ele possibilitou maior entendimento sobre a diversidade desses organismos nos mais diversos ecossistemas. O sequenciamento do gene *16S rRNA*, e o seu uso como um marcador molecular trouxe um enfoque filogenético à taxonomia bacteriana e forneceu informações importantes sobre a relação taxonômica, o papel ecológico e a evolução de procariotos encontrados em amostras ambientais, sem necessitar de isolamento ou cultivo. Os seres vivos são classificados em três domínios de acordo com análises do rRNA, são eles: *Bactéria*, *Archaea* e *Eucaria*, os dois primeiros são exclusivamente microrganismos procarióticos (WOESE, 1987; PACE, 1997; COSTA, 2011).

As moléculas de rRNA são evolutivamente muito antigas e constituem parte dos ribossomos, estrutura fundamental na vida dos organismos vivos pois é responsável pela síntese proteica. O grande interesse evolutivo em torno dos RNAs ribossomais para estudos filogenéticos é devido a algumas características: os rRNAs são indispensáveis na síntese protéica, sendo assim, são funcionalmente e evolutivamente homólogos nos seres vivos, estes genes não são passíveis a transferência lateral, esses genes possuem sequências de nucleotídeos altamente conservadas, no entanto possui frações variáveis o que permite a diferenciação entre gêneros diferentes (WOESE, 1987).

O gene *16S rRNA*, tem sido utilizado para análises de diversidade de microrganismos em amostras ambientais, pois apresenta as características necessárias para uma análise de confiança. Em bactérias esse gene intercala 9 regiões conservadas e 9 regiões variáveis (FIGURA 1). Essas regiões de alta variação apresentam tamanho entre 50 e 100 bases, as áreas variáveis podem ser utilizadas em estudos das relações evolutivas entre organismos próximos, enquanto as conservadas podem revelar relações antigas entre duas moléculas (PETROSINO, 2009).

FIGURA 1 - Regiões conservadas e variáveis do gene *16S rRNA*. Regiões conservadas (C1 – C9) são mostradas em cinza, regiões variáveis (V1 – V9), estão em cores diferentes.



Adaptado: (PETROSINO, 2009)

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Coleta do solo**

A coleta do solo foi realizada na fazenda Itaquerê, pertencente à Usina Santa Fé, localizada na cidade de Nova Europa. O local de coleta está a 480 metros de altitude, nas coordenadas 21°49'35,17"S e 48°36'41,06" O, era utilizado como um canal de irrigação que transportava a vinhaça da usina até o ponto de aplicação na área de plantio. O solo foi coletado a uma profundidade de 0 a 20 cm. Foram utilizados tubos tipo PVC com as medidas de 0 a 20 cm, previamente tratados em hipoclorito de sódio 5%, lavados com água corrente e secos. Imediatamente após a coleta, as extremidades dos tubos foram vedadas com fita adesiva para preservar o solo. A coleta foi realizada aproximadamente 15 dias após o término da safra, portanto não havia vinhaça no local.

### **4.2 Análise do solo**

A análise química do solo foi realizada pelo Laboratório de Análise de Solo e Planta do Departamento de Solos e Adubos, localizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista de Jaboticabal. A amostra foi seca protegida da umidade conforme orientação do laboratório, durante um mês antes de serem enviadas para a análise.

### **4.3 Extração do DNA metagenômico**

A extração do DNA metagenômico presente na amostra de solo foi realizada utilizando-se o FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit (for soil) (BIO 101-QUANTUM BIOTECHNOLOGIES), seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. Posteriormente realizou-se uma eletroforese em gel de agarose 0,8% para averiguar a eficiência da extração. Ao final, as amostras foram mantidas a -20°C.

#### 4.4 Amplificação por PCR do gene *16S rRNA*

Para amplificação do gene *16S rRNA*, foi utilizada a reação em cadeia da polimerase (PCR). A reação de PCR foi realizada utilizando 30 ng de DNA metagenômico previamente extraído dos microrganismos presentes no solo, a reação continha: tampão de PCR 1X, (20 mM Tris-HCl pH 8,4, contendo 50 mM KCl), 200  $\mu$ M de cada dNTP, 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 7,5 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 1U de Taq DNA polimerase e água MILLI-Q autoclavada para completar um volume final da reação de 20  $\mu$ L. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a ampliação de gene da subunidade ribossomal 16S estão assim descritas em (YOUNG et al.; 1991): o primer Forward Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3'), que corresponde a região 20 – 43 da sequência do *16S rRNA* de *Escherichia Coli* e o primer Reverse Y2 (5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'), que corresponde a região 361 - 338. A amplificação do gene *16S rRNA* foi realizada em um termociclador MJ Research, Inc., modelo PTC-100 utilizando-se a seguinte sequência de ciclos: 2 minutos a 95°C, 35 ciclos de 45 segundos à 95°C, 45 segundos à 65°C e 1 minuto e 30 segundos à 72°C e uma extensão final por 5 minutos a 72°C. O perfil eletroforético dos fragmentos amplificados foi realizado aplicando-se uma alíquota da reação de um gel de agarose 1,5%. Como padrão de tamanho molecular foi usado 1 kb DNA “Ladder” (GIBCO Life Technologies); as eletroforeses foram conduzidas à voltagem constante de 80 V, durante aproximadamente 90 minutos. Os géis foram visualizados e registrados através do sistema de documentação de géis (GEL DOC BIO-RAD).

#### 4.5 Purificação dos amplicons 16S rDNA

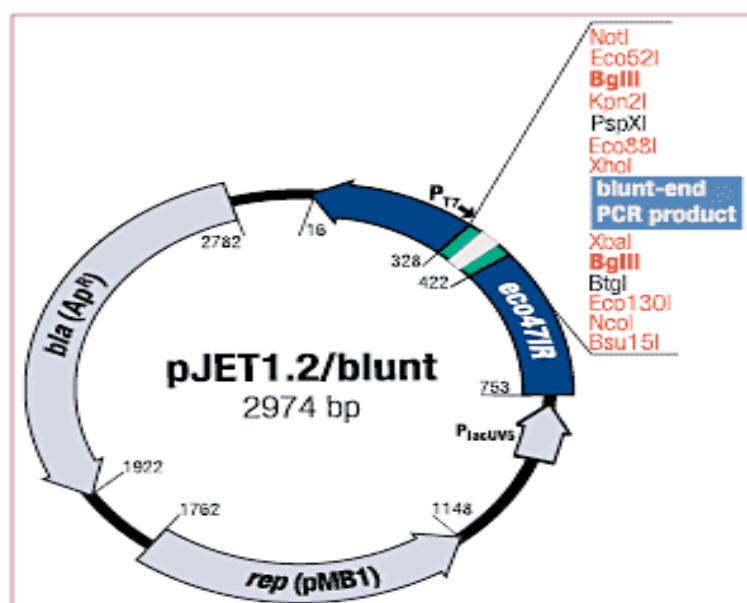
A purificação dos fragmentos correspondentes ao gene *16S rRNA* foi realizada após três reações de PCR com volume final de 15  $\mu$ L cada, totalizando 45  $\mu$ L de reação da amostra de solo, o amplicon resultante tem tamanho de aproximadamente 350 bases. Para a purificação do fragmento amplificado foram adicionados 55  $\mu$ L de tampão de carregamento ao volume final de 100  $\mu$ L. O produto amplificado foi separado em gel 1% de agarose com baixo ponto de fusão (Low Melting Point). Ao lado da canaleta contendo o padrão molecular de 1 kb (Invitrogen), uma alíquota de 8  $\mu$ L de amostra foi aplicada. O volume restante da amostra foi aplicado nas canaletas ao lado. A

eletroforese foi realizada utilizando: tampão TBE 1X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3), sem a presença de brometo de etídeo no gel e no tampão, durante 4 horas, a 60 V constante. Ao término da eletroforese, as canaletas contendo o padrão molecular e às alíquotas das amostras foram separadas do gel e coradas com brometo de etídeo (0,5 mg/mL), durante 10 minutos. A visualização do perfil eletroforético do gel foi feita em luz UV e a região dos fragmentos foi marcada. As canaletas foram, novamente, unidas ao gel e a região correspondente ( $\cong$  350 bases) no gel foi cortada. O gel cortado foi colocado em microtubos previamente pesados. Foi realizada uma purificação dos fragmentos seguindo o protocolo do Wizard PCR Clean-Up System (Promega), o DNA foi estocado overnight em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ , o material genético foi quantificado em espectrofotômetro modelo nanodrop 1000 (Thermo Scientific), apresentando a concentração final de  $26,3 \text{ ng}/\mu\text{L}$  e relação 260/280 de 1,86.

#### 4.6 Reação de ligação do inserto no vetor

O produto de PCR purificado de  $\cong$  350 bases foi utilizado para a reação de ligação utilizando o vetor pJET (Fermentas) (FIGURA 2), o qual apresenta gene de resistência a ampicilina. A reação de ligação foi realizada utilizando os parâmetros [1:3] para inserto / vetor ( $15 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ).

FIGURA 2 - Mapa do vetor pJET 1.2/blunt



(CloneJET™ PCR Cloning Kit - Fermentas)

#### **4.7 Transformação em Célula de *Escherichia Coli* DH10B**

O produto da ligação foi adicionado a um tubo estéril contendo 200 µL de célula competente (*Escherichia coli* DH10B). A mistura foi gentilmente homogeneizada e plaqueada em seguida. As células foram cultivadas em placas de petri contendo meio de cultura sólido LB (Luria-Bertani) e ampicilina (50 mg / ml), totalizando 5 placas. As placas foram incubadas a 37°C durante 16 h. Após incubação, os clones transformados foram repicados com auxílio de palitos estéreis e transferidos para placas de 96 poços, em cada poço da placa foi adicionado 120 µL de meio LB com ampicilina (50 mg / ml), a placa foi selada com adesivo e perfurada para a aeração das células, foram feitas 6 placas num total de 576 clones. Os clones foram incubados a 37°C, por 16 horas. Após o cultivo das células, adicionou-se 120 µL de glicerol 40% a cada poço. As placas foram seladas com adesivo e estocadas a -80°C.

#### **4.8 Extração de DNA Plasmidial**

Após o estoque das placas, foi realizada a extração do DNA plasmidial das células clonadas, utilizando-se dos seguintes métodos: em uma placa com 96 amostras foi adicionado 1 ml de meio LB com ampicilina (50 mg /ml), e com a ajuda de um replicador estéril foi feita a replicação das 6 placas, as quais foram selada com adesivo e perfuradas para a aeração das células e mantidas sob agitação orbital por 20 horas a 37°C. Após este período as placas foram centrifugadas a 3.220 x g, por 6 minutos a 20°C. A extração plasmidial foi realizada com o auxílio do kit Wizard® MagneSil® Plasmid Purification System (Promega, U.S.A.) e do equipamento epMotion® 5075 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). As amostras foram analisadas para confirmação da extração em gel de agarose 0,8%.

#### **4.9 Reação de PCR e sequenciamento do inserto 16S rDNA**

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o oligonucleotídeo iniciador específico para a região flanqueadora do inserto, primer “forward” do vetor CloneJET™. Para a reação utilizou-se: 5 pmol do iniciador “forward” do vetor; 130 ng do produto clonado; 1 µL de bigDYE (reagente terminador fluorescente para

sequenciamento) e 4  $\mu\text{L}$  tampão de reação. A reação totalizou um volume de 10  $\mu\text{L}$  e foi conduzida em termociclador seguindo os ciclos de cada reação separadamente. A reação contou com 25 ciclos consistindo de 96°C por 10 s (desnaturação); 52°C por 10 s (pareamento) e 60°C por 4 min (extensão). Após amplificação, a amostra foi precipitada com 80  $\mu\text{L}$  de isopropanol 75% e lavada com 180  $\mu\text{L}$  de etanol 70% por 2 vezes. O produto foi seco em temperatura ambiente durante 1 h. Em seguida adicionou-se 9  $\mu\text{L}$  de Hi-Dye formamida para desnaturação das fitas de DNA a 95°C por 5 min, e imediatamente as mesmas foram mantidas no gelo por 5 min. O seqüenciamento automático foi realizado em um aparelho 3700 DNA Analyser ABI Prism (Applied Biosystems).

#### 4.10 Análises das sequências obtidas

Após o sequenciamento os eletroferogramas obtidos foram analisados utilizando o programa “Phred/Phrap/Consed” (GORDON *et al.*, 1998). Este programa analisa os gráficos do sequenciador e gera um arquivo no formato “FASTA”. Com o auxílio do programa contGEN, foram selecionadas apenas as sequências com mais de 250 bases com qualidade phred acima de 20. As regiões que continham sequências de vetor foram retiradas utilizando o banco de dados online UniVec (VecScreen – The univec database, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>), em seguida, as sequências foram submetidas ao conjunto de softwares DECIPHER (WRIGHT *et al.*, 2011), para retirada de sequências quimeras.

Para análises de similaridade as sequências foram depositadas em dois bancos de dados *online*, um deles é o banco internacional de genes, através do site National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando a ferramenta BLASTn (ALTSCHUL *et al.* 1997), e o outro, Ribossomal Database Project II (RDP II) (COLE, *et al.* 2009), utilizando a ferramenta *Classifier* (WANG, *et al.* 2007). Para o alinhamento e tratamento das sequências brutas, utilizou-se o programa BioEdit versão 7.0.9.0 (HALL, 1999), As sequências editadas foram submetidas ao programa MEGA 5 ©1993-2011 (TAMURA *et al.*, 2011), onde foi elaborada uma árvore de distância taxômica utilizando *Neighbor Joining* e *Bootstrap* de 1.000 repetições. Este software está disponível para download em: <http://www.megasoftware.net/>, O alinhamento também foi utilizado para construir uma matriz de distâncias, usando o programa DNAdist

(FALSENSTEN, 1989), e esta matriz foi utilizada como entrada de dados para o programa DOTUR (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2005) para análise de suficiência amostral da diversidade.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Características do solo

O solo coletado foi submetido a análises para conhecimento de suas propriedades químicas (TABELA 2).

TABELA 2 - Análise química do solo

<i>Análises físico-químicas do solo</i>										
AMOSTRA	pH (CaCl <sub>2</sub> )	Matéria Orgânica (g/dm <sup>3</sup> )	P (resina) (mg/dm <sup>3</sup> )	K	Ca	Mg	H + Al (mMol <sub>e</sub> /dm <sup>3</sup> )	SB	T	V
				-----						%
3A	6,4	19	26	10,3	106	26	12	142,3	154,3	92

Na amostra coletada o pH encontra-se próximo à neutralidade, o que é de se esperar, pois, o solo foi coletado no início do ano de 2011 quando a safra de cana de açúcar já havia terminado e há pelo menos 15 dias não passava mais vinhaça no canal de irrigação. Segundo Graciano (2007) nos primeiros dias após aplicação da vinhaça há uma acidificação imediata do solo e passado esse período existe uma elevação no pH, devido a colonização dos microrganismos.

A amostra analisada 3A (Solo do canal de irrigação de vinhaça) mostrou grande quantidade de matéria orgânica em relação a um solo de cultura de cana sem aplicação de vinhaça e profundidade de 0 – 20 cm (OMORI, 2011), resultado esperado já que o solo do canal de irrigação estava exposto as propriedades da vinhaça, que apresenta elevada carga orgânica a qual é encontrada na forma coloidal, sendo rapidamente decomposta pelos microrganismos presentes no solo. Desta maneira a elevada quantidade de material orgânico não terá efeitos persistentes no solo devido a esta intensa atividade microbiana (GARIGLIO, 2008).

Soma de Bases (SB) é a soma dos valores de potássio (K<sup>+</sup>), magnésio (Mg<sup>2+</sup>) e Cálcio (Ca<sup>2+</sup>), enquanto a capacidade de troca catiônica potencial do solo (T) representa a capacidade total de troca de cátions (CTC<sub>total</sub>) no solo (SB + H<sup>+</sup> + Al<sup>3+</sup>). A capacidade apresentada pelo solo de troca de íons representa uma tendência à liberação de vários nutrientes, reduzindo ou até evitando efeitos tóxicos causados pela aplicação de fertilizantes, favorecendo assim a manutenção da fertilidade por um longo período. A

razão entre SB e T, demonstra a porcentagem de saturação por bases (V%), quanto maior o valor de V mais a CTC se ocupa com os cátions essenciais (SB) e pode-se dizer que este solo é bom para nutrição de plantas, caso contrário quanto mais a CTC se ocupar com cátions potencialmente tóxicos ( $H^+$ ,  $Al^{3+}$ ), mais pobre será o solo (LOPES e GUILHERME, 1992; RONQUIM, 2010). Pode-se dizer, com base nestas informações, que a amostra analisada provém de um solo com boa qualidade agrícola, tendo em vista seus resultados da análise química para saturação por bases ( $V= 92\%$ ).

## 5.2 Perfis das bactérias encontrados no solo

Dentre as sequências obtidas para os amplicons 16S rDNA, 30 sequências alcançaram qualidade suficiente para as análises feitas. Utilizando essas sequências foi construída uma árvore (FIGURA 3) baseada na distância taxonômica dos organismos estudados. Utilizando o RDP II construíram-se gráficos de frequência de filos (FIGURA 4), frequência de classes (FIGURA 5) e frequência de ordem (FIGURA 6) para caracterizar os indivíduos presentes na amostra. Com o auxílio do software DOTUR, foi possível determinar o número de unidades taxonômicas operacionais (UTOs), construindo uma curva de rarefação (FIGURA 7).

Foram identificadas diferentes bactérias não cultiváveis e também ainda não classificadas, as quais foram agrupadas em dez diferentes grupos monofiléticos (FIGURA 3). Para a maioria destes grupos foi observado similaridade com bactérias já caracterizadas e descritas na literatura, como: *Caulobacter* sp. para o grupo de Alphaproteobacteria; *Shigella flexneri* para Gammaproteobacteria, *Paenibacillus* sp. para Firmicutes, *Acidobacteria GP1* e *GP13* para Acidobacteria, *Gemmatimonas* sp. para Gemmatimonadetes; e *Streptomyces sparsogenes*, *Dactylosporangium aurantiacum* para Actinobacteria.



depositadas nos bancos de dados não possuem informações suficientes para uma classificação, informando apenas que são bactérias do solo. Isso reforça a ideia de que o mundo microbiano ainda é pouco conhecido, por esse motivo a construção de árvores para tentar identificar os filios destas bactérias torna-se importante (PEREIRA, 2003; CANNAVAN, 2007).

As 30 bactérias presentes na árvore estão classificadas dentro de 5 filios diferentes, são eles: Acidobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Gemmatimonadetes e Proteobacteria. O filo proteobacteria foi o com maior número de representantes (43,3%) seguido de Actinobacteria (23,3%) e Acidobacteria (23,3%), Firmicutes (6,7%) e Gemmatimonadetes (3,3%). Os resultados obtidos no Classifier (RDP II) (FIGURA 4) ficaram próximos aos gerados através do MEGA 5 para filios, com o aparecimento de um novo grupo de bactérias não classificadas (10,0%) os restantes ficaram da seguinte maneira: Proteobacteria (40,0%), Acidobacteria (23,3%), Actinobacteria (16,7%), Firmicutes (6,7%) e Gemmatimonadetes (3,3%).

Solos com grande quantidade de nutrientes apresentam seleção positiva de Proteobacteria, que são bactérias com alta taxa de crescimento e é o filo mais abundante em amostras de solo, enquanto Acidobacteria se desenvolvem bem em solos ácidos, com baixo teor de nutrientes e com alto teor de substratos recalcitrantes. Elas têm baixa taxa de crescimento, mas alta capacidade de competir por substratos. Esses filios juntos podem ser utilizados como indicativo das condições nutricionais do solo, a partir da razão entre o número de Proteobacteria e Acidobacteria (ZILLI et al., 2003; PEREIRA, 2003) . Com os resultados obtidos através da construção da árvore e também dos gráficos, pode-se dizer que o solo estudado é de boa qualidade microbiológica, pois o número de Proteobacteria é aproximadamente 2 vezes maior do que o número de Acidobacteria.

O filo Actinobacteria apresenta bactérias de alto teor de G+C, é considerado muito importante devido as suas características de produção de diversos antibióticos, tendo grande importância biotecnológica. O filo Firmicutes apresenta bactérias com baixo teor de G+C, está separado em dois grupos filogeneticamente distintos, classificados de acordo com o teor de G+C no DNA. O gênero *Bacillus* pertence a esse filo e já foi descrito com grande potencial de solubilizar fósforo no solo (VALMORAES et al., 2009). O DNA metagenômico representa o material genético extraído de todos os microrganismos presente no solo e, como esse ambiente conserva a maior biodiversidade do planeta e cerca de 1% dos microrganismos existentes são conhecidos,

é comum encontrar sequência de microrganismos que ainda não foram classificados taxonomicamente. Este fato justifica o número de 10,0% de microrganismos não classificados na amostra (HANDELSMAN, 2004).

FIGURA 4 - Frequência de Filos observada utilizando como parâmetro de análise a ferramenta Classifier do banco de dados RDP II.

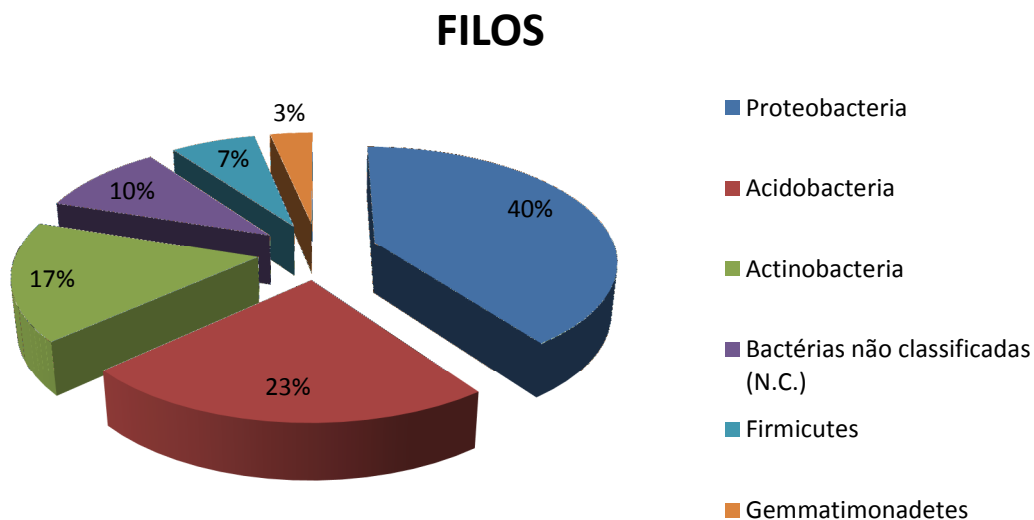
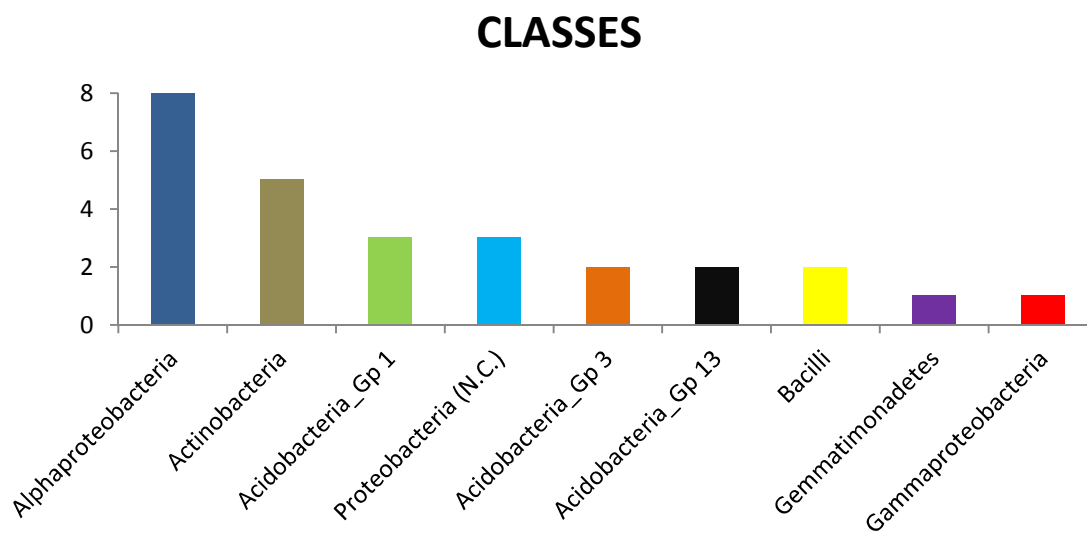
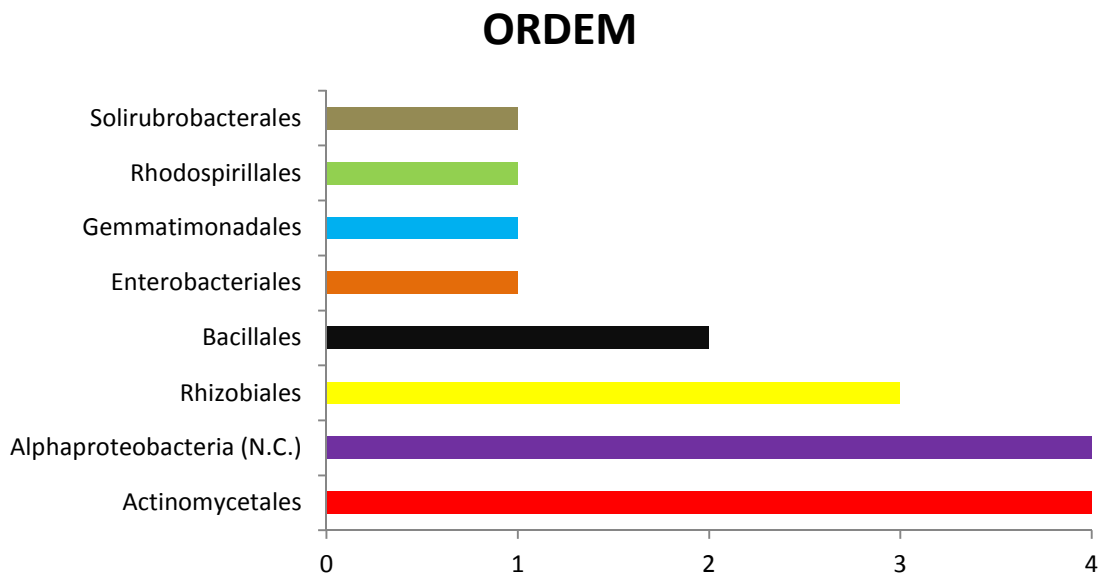


FIGURA 5 - Frequência de Classes observada utilizando como parâmetro de análise a ferramenta Classifier do banco de dados RDP II.



N.C.: Não Classificados

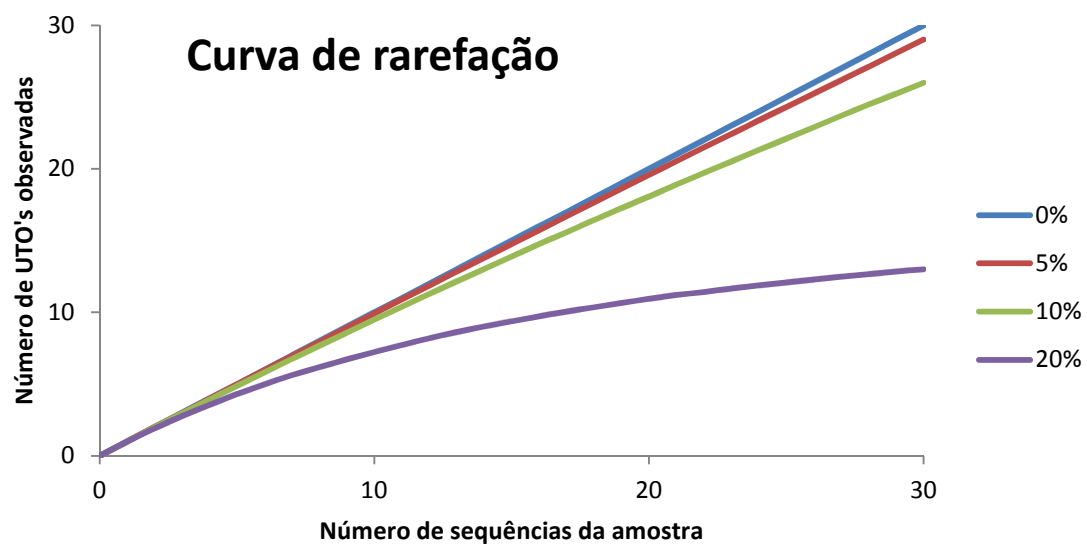
FIGURA 6 - Frequência de Ordens observada utilizando como parâmetro de análise a ferramenta *Classifier* do banco de dados RDP II.



N.C.: Não Classificados

Interessante observar que para quase todas as sequências uma UTO específica foi correspondente, contabilizando 29 unidades taxonômicas operacionais (UTOs) em 30 sequências analisadas (FIGURA 7). Curvas de rarefação fornecem uma estimativa quantitativa relacionada ao tamanho da amostra e do quanto ela refletiu a diversidade aparente dentro de uma comunidade. Nesta análise a riqueza de filotipos foi verificada por meio do método de rarefação ao nível de 95% de similaridade, a curva foi ascendente não atingindo o platô, o resultado apresentado indica que o número de sequências analisadas não é suficiente para representar a comunidade total do ambiente analisado, resultado esperado já que um grama de solo pode apresentar de 2000 a 5000 UTOs, (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2006; ROESCH, 2007; CANNAVAN, 2007; ROESCH et al., 2007). Contudo, é provável que a diversidade total deste ambiente seja alcançada com menos de 2000 UTOs, visto que na curva de rarefação o resultado de 20% de diferença já mostre indícios de que logo atingirá o platô. Este pensamento é sustentado no fato de que o solo ficou exposto por um longo período a condições adversas, devido ao escoamento de vinhaça, isso pode ter causado impacto negativo na comunidade de microrganismos do ambiente estudado.

FIGURA 7 - Curvas de rarefação calculadas pelo programa DOTUR usando 95%, 90% e 80% de similaridade para o agrupamento das sequências 16S rDNA.



## 6. CONCLUSÃO

- Uma boa representação da diversidade foi alcançada, consistindo em cinco filos diferentes: Proteobactéria como maior representante, Acidobacteria, Actinobacteria, Firmicutes e Gemmatimonadetes;
- A análise apresentou também microrganismos não classificados, por se tratar de uma amostra metagenômica.
- A análise de solo mostrou boa capacidade de troca de cátions (CTC) no solo;
- Utilizando microrganismos como bioindicadores, o ambiente estudado apresenta bons resultados qualificadores;

## 7. REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** n. 25, p. 3389 - 3402, 1997.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews.** v. 59, n. 1, p. 143 – 169, 1995.
- ATLAS, R.M. Use of microbial diversity measurements to assess environmental stress. In: KLUG M.J.; REDDY C. A. **Current perspectives in microbial ecology.** Washington: American Society for Microbiology, 1984. p.540 - 545.
- BAFFA, D. C. F.; FREITAS, R. G.; BRASIL, R. P. C. O uso da vinhaça na cultura da cana-de-açúcar. **Nucleus – Edição Especial**, 2009. Disponível em: <<http://www.nucleus.feituverava.com.br/index.php/nucleus/issue/view/Edi%C3%A7%C3%A3o%20Especial>>. Acessado em: 06 jan. 2012.
- BARROS, R. P. Diversidade de fungos em um vertissolo com adição de vinhaça na cultura de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). **UNIABEU.** Belford Roxo, v. 5, n. 10, p. 181 – 196, 2012.
- BARROS, R. P.; VIÉGAS, P. R.; SILVA, T. L.; SOUZA, R. M., BARBOSA, L.; VIÉGAS, R. A.; BARRETTO, M. C. V.; MELO, A. S. Alterações em atributos químicos de solo cultivado com cana-de-açúcar e adição de vinhaça. **Pesq. Agropec. Trop.**, v. 40, n. 3, p. 341 - 346, 2010.
- CANNAVAN, F. S. **Diversidade das comunidades bacterianas em solos de terra preta antropogênica da Amazônia Central e Oriental.** 2007. 116 f. Dissertação (Mestrado), Centro de Energia Nuclear na agricultura – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- CARVALHO, S. P.; CARRIJO, E. L. O. A produção de álcool: do PROÁLCOOL ao contexto atual. In: XLV CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL (SOBER) "Conhecimentos para Agricultura do Futuro", 13., 2007, Londrina. **Anais...**
- COLE, J. R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R. J.; KULAMSYED- MOHIDEEN, A. S.; MCGARRELL, D. M.; MARSH, T.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Res.** n.37, p. 141 - 145, 2009.
- COSTA, P. S. **Diversidade molecular de procariotos em solo de cupinzeiro e seu agente *Cornitermes cumulans*.** 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação em genética, Instituto de ciências biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, 2011.

CURY, J. C. **Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo.** 2002. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo – USP, Piracicaba, 2002.

DANIEL, R. The Metagenomics of Soil. **Nature Reviews**, v. 3, p. 470 - 478, 2005.

DELMONT, T. O.; ROBE, P.; CECILLON, S.; CLARK, I. M.; CONSTANCIAS, F.; SIMONET, P.; HIRSCH, P. R.; VOGEL, T. M. Accessing the soil metagenome for studies of microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 1315–1324, 2011.

FALSENSTEN, J. PHYLIP-Phylogeny inference package (version 3.2). **Cladistics**, 5:164-166, 1989.

FAORO, H. **Determinação da biodiversidade de Archaea e bactéria da mata atlântica paranaense.** 2006. 183 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

FLEXOR, G. A conturbada trajetória do álcool combustível no Brasil e seus desafios atuais. **Observatório de políticas públicas para a agricultura (OPPA)**, n.2, jun., 2007.

FONSECA, V. M.; BRAGA, S. R. Para além da geopolítica do etanol – Novos discursos e velhas práticas do setor canavieiro no Brasil. **Revista pegada**, v.9, n.1, jun. 2008.

GARIGLIO, H. A. A. **Alterações físicas e químicas e mobilidade de solutos em solos submetidos à aplicação de vinhaça proveniente da fabricação de álcool carburante.** 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, 2008.

GIACHINI, C. F.; FERRAZ, M. V. Benefícios da utilização de vinhaça em terras de plantio de cana-de-açúcar - revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de agronomia**. Ano VII, n. 15, 2009.

GRACIANO, W. P. **Delineamento das condições biológicas e físico-químicas para biodigestão de vinhaça.** 2007. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Exatas, Naturais e Tecnológicas – Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2007.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** n.41, p. 95 – 98, 1999.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiol. Molec. Biol. Rev.** 68(4): 669-685, 2004.

LEITE, G. F. Avaliação econômica da adubação com vinhaça e da adubação mineral de soqueiras de cana-de-açúcar na usina monte alegre Ltda. - Monte Belo – MG. **R. Un. Alfenas**, n.5, p. 189 - 181, 1999.

LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G. Interpretação de Análise do Solo: Conceitos e Aplicações. **ANDA - Associação Nacional para Difusão de Adubos**, Boletim Técnico n° 2, São Paulo, 1992.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de BROCK**. Porto Alegre: Artmed, 12 ed., 2010.

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento 2011. Comércio Exterior Brasileiro. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/desenvolvimento-sustentavel/agroenergia/estatistica>. Acesso em 23 jan. 2013.

NUNES, G. L. **Diversidade e estrutura de comunidades de bactéria e Archaea em solo de mangue contaminado com hidrocarbonetos de petróleo**. 2006. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo – USP, Piracicaba, 2006.

OLIVEIRA, B. G. **Vinhaça da cana de açúcar: fluxos de gases de efeito estufa e comunidades de Archaea presente no sedimento do canal de distribuição**. 2010. 97f. Dissertação (Mestrado) – Microbiologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

OMORI, W. P. **Identificação de superóxido dismutase em isolados e bibliotecas metagenômicas de solos contaminados com vinhaça**. 2011. 114 f. Trabalho de graduação – Faculdade de Tecnologia - FATEC, Jaboticabal, 2011.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science** 276, 734 - 740, 1997.

PAULINO, A. F.; MEDINA, C. C.; ROBAINA, C. R. P.; LAURANI, R. A. Produções agrícola e industrial de cana-de-açúcar submetida a doses de vinhaça. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, n. 2, p. 145 – 150, 2002.

PEREIRA, J. P.; ALVARENGA, E. M.; TOSTES, J. R. P.; FONTES, L. E. F. Efeito da adição de diferentes dosagens de vinhaça a um latossolo vermelho-amarelo distrófico na germinação e vigor de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 14, n. 2, p. 147 - 150, 1992.

PEREIRA, R. M. **Diversidade bacteriana de um latossolo sob cultivo intensivo e floresta através da análise metagenômica**. 2003. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal, 2003.

PESSOA FILHO, M. A. C. P. **Metagenômica e sua aplicação no estudo de diversidade e função de microrganismos de solos do cerrado**. Planaltina: Documentos – Embrapa Cerrados. 2010. Disponível em: [www.cpac.embrapa.br/download/1742/t](http://www.cpac.embrapa.br/download/1742/t). Acesso em: 06 jan. 2012.

PREZOTTO, P. **Biodegradação do carbono orgânico, mineralização do nitrogênio e alterações químicas em solos tratados com vinhaça**. 2009. 67 f. Dissertação de (mestrado) - Curso de pós-graduação em agricultura tropical e subtropical, Instituto Agrônomo (IAC), Campinas, 2009.

ROESCH, L.F. W. **Diversidade de Bactérias diazotróficas associadas a plantas de milho cultivadas no estado do Rio Grande do Sul**. 2007. 165 f. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

ROESCH, L. F. W.; FULTHORPE, R. R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A. K. M.; KENT, A. D.; DAROUB, S. H.; CAMARGO, F. A. O.; FARMERIE, W. G.; TRIPLETT, E. W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **ISME Journal**. v. 1, n. 4, p. 283 – 290, 2007.

RONQUIM, C. C. Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 8**, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) - Monitoramento por Satélite, Campinas, 2010.

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

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Appl. Environ. Microbiol.**, n. 71, p. 1501 - 1506, 2005.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Toward a census of bacteria in soil. **PLoS Computational Biology**. v. 2, 2006.

SILVA, M. A. S. da; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. **Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, Campina Grande, v.11, p. 108-114, 2007.

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

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

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

WHITMAN, W.B.; COLEMAN, D.C.; WIEBE, W.J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v.95, p.6578-6583, 1998.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, Illinois, v. 51, n. 2, p. 221 – 271, 1987.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the Phototrophic Rhizobium Strain BTail by Polymerase Chain Reaction-Based Sequencing of a 16S rRNA Gene Segment. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 7, p. 2271 – 2277, 1991.

ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Caderno de ciência & tecnologia**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.