

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

THAYS NOGUEIRA DA SILVA

**ANÁLISE METAGENÔMICA DE CINCO SOLOS DE FLORESTAS
BRASILEIRAS**

Dourados

Outubro/2012

THAYS NOGUEIRA DA SILVA

**ANÁLISE METAGENÔMICA DE CINCO SOLOS DE FLORESTAS
BRASILEIRAS**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado para a
obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia do
Curso de Biotecnologia da Universidade Federal da
Grande Dourados, UFGD.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira

Dourados

Outubro/2012

THAYS NOGUEIRA DA SILVA

**ANÁLISE METAGENOMICA DE CINCO SOLOS DE FLORESTAS
BRASILEIRAS**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia na Universidade Federal da Grande Dourados, pela comissão formada por:

Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira – Orientador
Universidade Federal da Grande Dourados

Profª. Dra. Gisele Jane de Jesus
Universidade Federal da Grande Dourados

Prof. Dr. Emerson Machado de Carvalho
Universidade Federal da Grande Dourados

Dourados, Outubro de 2012

RESUMO

O solo é um ambiente muito rico em diversidade de microrganismos. O grupo das bactérias é o que se apresenta em maior quantidade neste sistema e um grama de solo pode conter aproximadamente 10 bilhões de microrganismos e até 10 mil espécies diferentes. O conjunto de genomas presentes em uma dada microbiota é chamado de metagenoma e a abordagem metagenômica tem se mostrado uma alternativa para acessar os genes de bactérias de um determinado ambiente sem a necessidade de se utilizar o cultivo. Os objetivos do presente trabalho foram avaliar a diversidade bacteriana em cinco diferentes solos sob florestas brasileiras através da análise metagenômica do gene 16S rRNA; verificar se o processo de ranotação revelaria novos filós e observando se algum grupo bacteriano está presente em todos os solos bem como o total de filós que foram identificados. Para estas análises foi utilizada a ferramenta MG-RAST. Os solos denominados JAB FS, JAB SMS, JAB NFA, JAB EAA E FAOROMataAtlantica foram obtidos de trabalhos anteriores, todos provenientes de florestas brasileiras, e os arquivos com as sequências foram submetido as análises do MG-RAST, sob parâmetros pré-determinados e idênticos para todos os solos. Um total de 1239 sequências foi analisado, e todas eram provenientes do gene 16S rRNA. Foram encontrados quatorze filós pertencentes ao domínio Bacteria neste trabalho. Os filós encontrados em todos os solos em números significativos são Proteobacteria, Acidobacteria, Firmicutes, Verrucomicrobia, Actinobacteria e Bacteroidetes. Os filós Chloroflexi Planctomycetes, Chlamydiae, Spirochaetes, Tenericutes, Nitrospirae, Cyanobacteria e Gemmatimonadetes foram encontrados em menor número variando de solo para solo e quatro novos filós foram encontrados, quando comparados com os trabalhos dos quais foram obtidas as sequências, são eles: Chlamydiae, Spirochaetes, Tenericutes e Cyanobacteria.

Palavras-chave: metagenoma, 16S rRNA, bioinformática, microbiologia de solos

DEDICATÓRIA

A minha avó Aurora, por ter sido um exemplo de ser humano e de caráter, e a meu tio e padrinho Rogério, pela sabedoria, incentivo e acima de tudo, por sua infinita bondade.

A eles, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que com sua infinita bondade permitiu que eu chegasse até aqui.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira, pela transmissão de conhecimentos, pelo incentivo e, sobretudo pela paciência com a qual me tratou em todo esse tempo de orientação.

Ao meu pai, Luiz, pela educação, pelos valores e por seu imenso amor. À minha mãe e amiga, Rosani, fonte de inspiração e admiração, estando ao meu lado em todas as horas e me apoiando em todas as situações. À minha querida irmã Dani, pelo companheirismo e por me aguentar nas horas mais difíceis. A eles, o meu amor incondicional.

Ao Bruno, comigo desde o começo e a quem devoto os melhores sentimentos que possam existir. Obrigada pela paciência, ajuda com a formatação e companheirismo de sempre, te amo.

Aos meus avós, exemplos de vida e determinação. À minhas amadas tias Li e Tininha, pelos momentos de alegria e aconchego, e por nos presentear com o motivo de nossos melhores sorrisos, Manu e Laurinha, e a toda minha família pelo apoio.

À minha dinda, segunda mãe e amiga de todas as horas, pelo incentivo em todos os desafios e pela ajuda de sempre e de todas as formas. Tia Tê, se cheguei até aqui, você é uma das principais responsáveis.

À minha grande amiga, irmã e alma gêmea Pati, por me fazer uma pessoa melhor e estar presente em todos os momentos. Conhecer-te foi uma das melhores coisas que me aconteceram na faculdade e sou muito grata, por tudo.

Aos amigos da Biotec, que levarei para o resto da vida. E principalmente, aos integrantes da Elite Carioca. Não preciso citar nomes, quem é elite carioca sabe que é elite carioca! Sem vocês a faculdade não teria a menor graça e eu seria menos feliz. Foi uma honra estar com vocês durante esse tempo.

Aos queridos amigos, os antigos, mas que permanecem sempre em meu coração e em minha memória.

Ao Projeto Bem-me-Quer, por me proporcionar tantas emoções e fazer-me um ser humano melhor. Fazer alguém sorrir é e sempre vai ser o melhor remédio para meus problemas. E acima de tudo, aos amigos que fiz no projeto, pessoas com as quais eu tive

a honra de conviver e que encheram a minha vida de afeto, carinho e alegria. Aos bem-querianos, o meu mais profundo e sincero obrigada.

A todos, que contribuíram direta ou indiretamente para que eu realizasse esse trabalho.

Muito obrigada, de coração!

SUMÁRIO

RESUMO	3
LISTA DE FIGURAS	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. GERAL	13
2.2. ESPECÍFICO	13
3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	14
3.1. DIVERSIDADE MICROBIANA NO SOLO	14
3.2. O SURGIMENTO DA ABORDAGEM METAGENÔMICA.....	15
3.3. O USO DO GENE 16S NA METAGENÔMICA	16
3.4. BIOINFORMÁTICA	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1. ORIGEM DAS SEQUÊNCIAS	20
4.2. FERRAMENTAS UTILIZADAS	21
4.3. PARÂMETROS DO MG-RAST	22
4.3.1. Parâmetros da submissão das sequências.....	22
4.3.2. Paramêtros de análise	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	24
5.1. DISTRIBUIÇÃO DO DOMÍNIO BACTÉRIA	25
5.1.1. DISTRIBUIÇÃO DO FILO PROTEOBACTERIA.....	27
5.1.2. DISTRIBUIÇÃO DO FILO ACIDOBACTERIA	29
5.1.3. DISTRIBUIÇÃO DO FILO FIRMICUTES	30
5.1.4. DISTRIBUIÇÃO DO FILO VERRUCOMICROBIA	31
5.1.5. DISTRIBUIÇÃO DO FILO ACTINOBACTERIA	32
5.1.6. DISTRIBUIÇÃO DO FILO BACTEROIDETES.....	33
5.1.7. DISTRIBUIÇÃO DO FILO CHLOROFLEXI	34

5.1.8.	DISTRIBUIÇÃO DO FILO PLANCTOMYCETES	35
5.1.9.	DISTRIBUIÇÃO DO FILO CHLAMYDYAE.....	36
5.1.10.	DISTRIBUIÇÃO DO FILO SPIROCHAETES.....	36
5.1.11.	DISTRIBUIÇÃO DO FILO TENERICUTES	36
5.1.12.	DISTRIBUIÇÃO DO FILO NITROSPIRAE	37
5.1.13.	DISTRIBUIÇÃO DO FILO CYANOBACTERIA	37
5.1.14.	DISTRIBUIÇÃO DO FILO GEMMATIMONADETES	38
5.2.	ANÁLISE DE RAREFAÇÃO	38
6.	CONCLUSÃO	40
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO DO DOMÍNIO BACTERIA **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO DO FILO PROTEOBACTERIA 29
- FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO DO FILO ACIDOBACTERIA **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO DO FILO FIRMICUTES **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 5 - DISTRIBUIÇÃO DO FILO VERRUCOMICROBIA **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 6 - DISTRIBUIÇÃO DO FILO ACTINOBACTERIA **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 7 - DISTRIBUIÇÃO DO FILO BACTEROIDETES **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 8 - DISTRIBUIÇÃO DO FILO CHLOROFLEXI **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 9 - DISTRIBUIÇÃO DO FILO PLANCTOMYCETES **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 10 - DISTRIBUIÇÃO DO FILO NITROSPIRAE **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 11 - ANÁLISE DE RAREFAÇÃO **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

1. INTRODUÇÃO

O solo é um ambiente muito rico em diversidade de microrganismos. O grupo das bactérias é o que se apresenta em maior quantidade neste sistema e considerando as dimensões continentais do Brasil poucos estudos foram realizados sobre este tema (PEREIRA et al., 2006). Segundo Knietsch et al. (2003), um grama de solo pode conter aproximadamente 10 bilhões de microrganismos e até 10 mil espécies diferentes. Esta diversidade é muito importante, pois eles desempenham funções, sendo responsáveis pela maioria dos ciclos biogeoquímicos que formam o ambiente de oceanos e solos (VENTER et al., 2004), atuando nas transformações destes ciclos, como por exemplo na reciclagem de carbono, nitrogênio e fósforo de matéria morta, entre outros (SILVA, 2009).

O principal problema de se analisar estes microrganismos é que sua grande maioria apresenta falhas quando cultivados pelos métodos convencionais, e acredita-se que essa microbiota não cultivada realize funções vitais no ambiente, apresentando um enorme potencial biotecnológico (RIESENFELD et. al., 2004). Isso fez com que novas abordagens se tornassem necessárias para se conhecer as populações de microrganismos do solo, bem como o papel que desempenham nesse rico e complexo sistema.

Com o advento do Projeto Genoma Humano iniciado na década de 90, foram disponibilizados sequenciadores de DNA automáticos, capazes de gerar uma enorme quantidade de dados genômicos, tornando necessárias adaptações nos bancos de dados e nas ferramentas de análise. Devido a essa problemática, uma nova abordagem de caracterização de microrganismos, juntamente com análises computacionais dos dados obtidos por esta caracterização, tornou-se necessária para a elucidação de questões relativas a este tema.

Citado pela primeira vez por Handelsman et. al. (1998), metagenoma pode ser caracterizado pelo conjunto de genomas presentes em uma dada microbiota. Esta ciência foi desenvolvida como consequência da descoberta de que a diversidade procariótica é muito maior do que a previamente conhecida, e tem sido utilizada para caracterizar o genoma de microrganismos não cultiváveis, com o objetivo de conhecer melhor a ecologia microbiana global e encontrar possíveis organismos com potenciais biotecnológicos interessantes à pesquisas em diversas áreas. Como sugerido por Voget et al.(2003), a metagenômica também pode ser utilizada para analisar ambientes

buscando possíveis novos genes para prospecção e ainda para encontrar novas espécies de microrganismos que ainda não foram catalogadas. Apesar de ainda não existir uma metodologia universal para se cultivar e caracterizar todos os microrganismos presentes em um dado ecossistema, a metagenômica tem se mostrado uma alternativa para acessar os genes de bactérias de um determinado ambiente sem a necessidade de se utilizar o cultivo, extraindo o DNA diretamente da microbiota do solo, e posteriormente construindo uma biblioteca genômica a partir dos genomas obtidos desta extração.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

O objetivo do presente trabalho foi de avaliar a diversidade de bactérias em cinco diferentes solos brasileiros sob floresta através da análise metagenômica do gene 16S rRNA, utilizando a ferramenta MG-RAST.

2.2. ESPECÍFICO

1 - Observar se algum grupo bacteriano apresenta-se em comum entre todos os diferentes solos analisados.

2 - Avaliar se o processo de reanotação de sequências realizado permitiu a identificação de novos filos, quando comparado com os trabalhos dos quais foram retiradas as sequências utilizadas neste estudo.

3 – Avaliar se a ferramenta utilizada foi eficiente para a realização das análises.

3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1. DIVERSIDADE MICROBIANA NO SOLO

Os microrganismos habitam todos os ambientes da Terra e estima-se que $4 - 6 \times 10^{30}$ células microbianas estejam presentes nos solos do mundo (SLEATOR et al., 2008). Estimativas sugerem que um grama de solo pode conter cerca de 10 bilhões de microrganismos e possivelmente 10.000 espécies diferentes (KNIETSCH et al., 2003). A diversidade microbiana do solo é extremamente importante para a manutenção de sua boa qualidade, pois os microrganismos desempenham funções essenciais ao equilíbrio deste sistema, como a participação nos ciclos do carbono, nitrogênio e fósforo (BORNEMAN, 1996), atividades metabólicas relevantes para o crescimento das plantas, recuperação de áreas degradadas (NASCIMENTO e ARAUJO, 2004), entre outros. A diversidade metabólica e fisiológica desses microrganismos é a principal responsável pela capacidade que estes têm de se adaptar, ter sucesso e habitar todos os ambientes do planeta, desde águas termais a solos com alto teor de acidez (STEELE e STREIT, 2005).

Nos últimos 25 anos a Microbiologia tem sofrido severas modificações devido à constatação de que a maioria dos microrganismos não é facilmente cultivada em culturas puras e que ainda há muito a ser descoberto sobre o mundo microbiano. Uma grande proporção de microrganismos ainda não é cultivável, sendo uma problemática quando se tem o objetivo de acessar essa diversidade (LEVEAU, 2007). Através das técnicas de cultivo tradicional só era possível recuperar até no máximo 10% dos microrganismos presentes em uma amostra ambiental (HUGENHOLTZ et al., 1998), mas a verdadeira extensão da diversidade microbiana ainda é desconhecida, devendo exceder as estimativas prévias (DIMITROV, 2009). Antes da utilização de metodologias moleculares a diversidade taxonômica e genômica dos microrganismos era avaliada levando-se em conta apenas as características genotípicas e fenotípicas de organismos isolados e cultivados em laboratório (DIMITROV, 2009). Estes métodos não demonstravam a população completa de microrganismos presentes em uma determinada amostra ambiental, bem como a distribuição de espécies e táxons que a

amostra apresentava. A partir da década de 80, um grande número de metodologias moleculares baseadas no estudo de DNA começou a ser desenvolvida para análise de diversidade microbiana de solo e a partir do avanço dessas metodologias, uma infinidade de microrganismos foi caracterizada e um novo cenário de distribuição em diferentes habitats foi revelado (PEREIRA et al., 2006; SILVEIRA et al., 2006).

O solo de florestas constitui-se como um importante habitat, oferecendo um ambiente que favorece o desenvolvimento microbiano (PEÑA et al., 2005) e a participação dos microrganismos no funcionamento e sustentabilidade deste ecossistema é altamente reconhecida (MASON et al., 1980). Os microrganismos dos solos de florestas podem servir como indicadores biológicos para a compreensão da estabilidade e produtividade em um sistema (TURCO e BLUME, 1999), e os processos microbianos são uma parte integral da avaliação da qualidade destes solos. Estudos baseados na análise do 16S rRNA revelam que os filos mais representativos em solos florestais são Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Firmicutes, Planctomycetes, Verrucomicrobia e Bacteroidetes (ZHOU et al., 2009; DEANGELIS et al., 2010), porém existe uma infinidade de microrganismos que ainda precisa ser revelada. Por isso, a caracterização destas populações é de grande importância para se conhecer e entender melhor o papel que os microrganismos desempenham neste ambiente.

3.2. O SURGIMENTO DA ABORDAGEM METAGENÔMICA

A partir destas descobertas, novas abordagens se tornaram necessárias para se conhecer a vasta quantidade de informações presentes nos genomas dos microrganismos, e a metagenômica se mostrou a principal ferramenta para acessar esse potencial. Entende-se por metagenoma o genoma da microbiota total encontrada em um ambiente e metagenômica pode ser definida como o estudo da biodiversidade de um determinado ambiente baseado na extração do seu DNA total (RONDON et al., 2000), ou seja, de seu genoma. A adoção dessa abordagem tem se mostrado muito promissora quando se tem interesse em acessar a microbiota total do solo, permitindo análises da genômica funcional de seus membros, mesmo na ausência de cultivo e também tem sido aplicada na busca de genes e produtos gênicos com interesses biotecnológicos, que

possam ser utilizados e incorporados em processos industriais, visando melhorias e redução de custos nesses processos.

Além disso, a metagenômica tem aberto novas áreas de pesquisa, pois permite análises de heterogeneidade do genoma e evolução em contextos ambientais, acessando a diversidade microbiana de uma forma mais abrangente que os métodos convencionais.

A metodologia consiste na extração dos ácidos nucléicos totais de uma amostra, analisando as sequências-alvo nas amostras mistas de DNA de diferentes microrganismos (DIMITROV, 2009). Simplificadamente, o DNA de amostras ambientais é extraído, isolado e clonado, para posterior criação de bibliotecas metagenômicas. A abordagem elimina a etapa de cultivo, pois o DNA é extraído diretamente do ambiente, clonado em um vetor apropriado e introduzido em um hospedeiro cultivável, para posterior análise (IORI, 2008). Dentre os protocolos para isolar o DNA, os diretos e indiretos são os que se destacam. No método indireto antes da lise celular os microrganismos são separados fisicamente do substrato, e o DNA que é obtido é especificamente procarioto. Já no método direto não acontece separação prévia do substrato e no processo de lise são incluídos os microrganismos fortemente aderidos as partículas do solo, por isso este último é considerado mais vantajoso (SILVA, 2009). Após o isolamento e purificação do DNA extraído, a próxima etapa consiste em construir uma biblioteca com esse material a partir de pequenos insertos que serão clonados em vetores de diversos tamanhos, dependendo do tamanho da biblioteca a qual se deseja construir. A análise da biblioteca metagenômica pode ser baseada na sequência ou também baseada em atividade. A primeira não depende da expressão de genes clonados, porém se faz necessário o desenho de primers de PCR ou sondas de hibridização, derivados de regiões conservadas dos genes (FIESELER et al., 2007).

3.3. O USO DO GENE 16S NA METAGENÔMICA

A análise baseada em RNA ribossomal constitui atualmente um método de grande importância na microbiologia, e é usada na identificação de bactérias e na exploração da diversidade bacteriana de um determinado ambiente (HIGASHI, 2008). Para se conhecer detalhadamente a população microbiana de um ambiente, a análise

filogenética a partir do sequenciamento de genes que codificam a formação das subunidades do RNAr têm sido amplamente utilizada. Em 1996, PACE propôs a utilização do gene 16S rRNA para investigar a diversidade microbiana em amostras ambientais. O 16S rRNA serve como um sinal na medida da sistemática de procariotos. Sua subunidade satisfaz todas as exigências de uma molécula marcadora filogenética, só que em uma extensão ainda maior do que as descritas anteriormente (HIGASHI, 2008). A maior parte das espécies de procariotos descritas até hoje provêm de sequências de 16S rRNA (LUDWIG e KLENK, 2001).

O gene é composto por uma estrutura primária que contém regiões constantes e variáveis, permitindo uma ampla investigação para determinação de relações filogenéticas (PAIXÃO et al., 2010). O sequenciamento do 16S rRNA têm sido muito utilizado, pois fornece resultados muito satisfatórios na comparação de amostras de diferentes ambientes (PEREIRA et al., 2006; VAL-MORAES et al., 2009).

Estudos envolvendo as sequências deste gene juntamente a análises metagenômicas constituíram o pontapé inicial para a ligação da fisiologia e função da microbiota total do solo (RONDON et al., 1999). As regiões conservadas das sequências de rRNA do gene 16S podem ser usadas para estudar espécies distantemente relacionadas, e as regiões variáveis podem servir para analisar espécies proximamente relacionadas.

A metodologia consiste na extração do DNA metagenômico, e posterior amplificação do gene 16S RNAr por meio da Reação em Cadeia da Polimerase. O produto dessa amplificação é clonado em um vetor que é inserido em uma célula da *E. coli*, os clones são selecionados e o DNA plasmidial selecionado a partir desses clones é extraído e purificado. Os plasmídeos contendo o gene são então sequenciados e por fim as sequências são analisadas utilizando as ferramentas de Bioinformática.

3.4. BIOINFORMÁTICA

A bioinformática é uma ciência que teve sua origem através da junção de conhecimentos em informática e ciências biológicas. Busca solucionar os problemas da biologia molecular utilizando conceitos e métodos da ciência da computação (KOCH e FUELLEN, 2008). Com o anúncio do Projeto Genoma Humano, e os consequentes

avanços em termos de sequenciamento e geração de informações genéticas que este trouxe, uma grande quantidade de dados foram gerados, tornando necessárias adaptações de técnicas já existentes e criação de inúmeras outras para transformar essas informações em resultados passíveis de serem analisados.

Os primeiros algoritmos para alinhamento de sequências foram desenvolvidos na década de 70, caracterizando a primeira utilização dos métodos de Bioinformática. O termo Bioinformática apareceu de fato apenas em 1990, com o surgimento dos sequenciadores automáticos que geravam grande quantidade de dados experimentais nos projetos de sequenciamento, principalmente o Projeto Genoma Humano. Segundo Koch e Fuellen (2008), podemos dividir a Bioinformática em três principais áreas: abordagens relacionadas às sequências de aminoácidos ou de nucleotídeos do RNA e DNA; métodos de análises, classificação e predição relacionados à estrutura de proteínas, RNA e DNA e por fim, análise de sistemas moleculares computacionais, que está relacionada com a análise de redes moleculares e biológicas de sistemas computacionais.

Atualmente, a Bioinformática tem se constituído como uma ciência imprescindível para manipulação de dados biológicos, sendo responsável por realizar a aquisição, processamento, armazenamento, distribuição, análise e interpretação da informação biológica (CIOS et al., 2005). Toda essa informação obtida precisava ser armazenada e a partir dessa necessidade, diferentes bancos de dados biológicos foram criados para organizar essa informação. Dentre estes bancos de dados biológicos podemos citar *GenBank*, *EMBL*, *RDP Data Bases*, entre outros.

Além dos bancos de dados biológicos, existe ainda uma infinidade de ferramentas que são capazes de realizar análises das mais diversas características de microrganismos e pelos mais variados métodos.

Dentre estas ferramentas, o *MG-RAST* foi o escolhido para a execução desse trabalho. O *MG-RAST* ou *Anotação Rápida usando Tecnologia de Subsistemas para Metagenômica* consiste em um sistema disponível gratuitamente para o processamento de dados de sequências metagenômicas e envolve alguns tipos de análise, dentre as quais se destacam as comparações filogenéticas, anotações funcionais, entre outras, e cerca de 500 genomas já foram processados por sua versão beta. É um sistema de código aberto baseado em um quadro SEED para genômica comparativa. A submissão das sequências é feita no formato FASTA e estas são processadas automaticamente. Anotação de um ou mais genomas e metagenomas, comparação de metabolismos e

filogenética são alguns dos métodos fornecidos para acessar os diferentes tipos de dados existentes. O acesso aos dados é protegido por uma senha e todos os resultados gerados são disponibilizados para serem baixados no computador do usuário. Cada usuário efetua um registro para limitar o acesso ao seu conjunto de dados e obter informações se acaso ocorra algum problema no processamento dos mesmos. Quando está conectado o usuário pode acessar os metagenomas que enviou, os dados que proprietários permitiram acessar, os metagenomas públicos disponíveis e também pode disponibilizar seus dados a todos os usuários do sistema. O MG-RAST aceita diversos tipos de formatos, dentre eles os provenientes de sequenciamento por Sanger, formato FASTA, entre outros. O sistema foi implementado pela linguagem de programação *Perl* usando números de código aberto incluindo como componentes os modelos *SEED*, *NCBI BLAST*, *SQLife* e *SunGrid Engine*. Após a submissão dos dados, as sequências são normalizadas, gerando identificações internas únicas e removendo possíveis duplicações. Posteriormente, as sequências que tem o potencial para genes codificadores são comparadas através do *BLASTX* contra um banco de dados não redundante proveniente do banco de dados do INSDCS, centros de sequenciamento e outras fontes. Juntamente a essa análise, a sequência de dados é comparada com outros bancos de dados acessórios, usando algoritmos apropriados e critérios de seleção significativos. Após estas etapas, uma reconstrução filogenética da amostra é calculada e classificações funcionais dos PEGs (genes codificadores de proteínas) são computadas. Além das vantagens já citadas, o MG-RAST possui uma interface muito simplificada, o que facilita a navegação e análise de dados dos seus usuários. Outras ferramentas de comparação metagenômica foram incorporadas, permitindo a comparação com outros metagenomas e genomas de outros ambientes. O MG-RAST utiliza um sistema novo de anotação de genomas permitindo alterações nos parâmetros para sequências subjacentes tanto nas análises filogenéticas, quanto nas reconstruções metabólicas.

Portanto, o MG-RAST é uma ferramenta para análise de dados de sequências metagenômicas que tem sem mostrado extremamente eficaz, por ser gratuita e de domínio público, por não requerer um tipo específico de dados de sequência e não necessitar de requisitos para liberação ou controle de seus dados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ORIGEM DAS SEQUÊNCIAS

As cinco diferentes amostras de solo de floresta utilizadas no presente trabalho foram previamente analisadas nos trabalhos de Pereira (2003), Val-Moraes (2009), Silveira et al. (2006) e Faoro (2010). Um total de 1239 sequências foi utilizado para este trabalho.

O primeiro dos solos, denominado JAB FS, proveniente do trabalho “Diversidade bacteriana de um latossolo sob cultivo intensivo e floresta através de análise metagenômica”, foi coletado na fazenda Lagoa do Fogão, localizada no município de Guaíra. A cidade situa-se ao norte do estado de São Paulo, e apresenta 20°20' S de latitude, 48°23' W de longitude e uma altitude de 500 metros em relação ao nível do mar. Sua precipitação média anual é de 1330 mm, com temperatura mínima de 17 °C e máxima de 30 °C, em média. Classificado como Latossolo Variação Una (LVUna), o solo é coberto por floresta original e é caracterizado como não perturbado, pois não sofreu interferência humana. Doze amostras simples foram coletadas ao acaso, em ziguezague e com profundidade de 0 a 20 cm, sendo posteriormente homogeneizadas e formando apenas uma amostra composta de todas as outras anteriores (PEREIRA, 2003).

O solo denominado JAB SMS, proveniente do trabalho “Diversidade de bactérias de solo sob vegetação natural e cultivo de hortaliças”, foi coletado em uma mata situada na microbacia do Córrego Taquara Branca, no município de Sumaré, no estado de São Paulo, que apresenta latitude de 22° 49' 13” S e longitude de 47° 16' 08” W. Sua supressividade foi avaliada pelo método de crescimento de patógeno e todas as análises foram realizadas no Departamento de Solos e Adubos da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal. A amostra foi retirada da vegetação natural e caracteriza-se como solo de mata supressiva (VAL-MORAES et al, 2009).

Já os solos denominados JAB NFA e JAB EAA, provenientes do trabalho “Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis”, foram extraídos em maio de 2002, em duas áreas situadas a 21 ° 14'S de latitude e 48 ° 17 'W de longitude, distantes 500 metros uma da outra e próximas a

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista. O solo NFA foi coletado de uma área de mata nativa, classificada como floresta tropical estacional semidecidual latifoliada e também como Latossolo Vermelho A moderado, caulínítico-oxídico, eutroférico e com textura altamente argilosa. O solo EAA a partir de *Eucalyptus arboretum*, cultivados desde 1969 e classificado Latossolo vermelho, A moderado, caulínítico hipoférico e textura média, e sem ser submetido a qualquer prática agrícola. A amostragem ocorreu aleatoriamente em forma de zigzag em 20 pontos diferentes com profundidade entre 0 e 20 cm. Todas as amostras foram homogeneizadas, resultando em uma única amostra composta por todos os solos. A extração do DNA metagenômico bem como o sequenciamento seguiu o padrão dos anteriormente citados (SILVEIRA et al., 2006).

A amostra de solo FAORO-MataAtlantica, proveniente do trabalho “ Influence of Soil Characteristics on the Diversity of Bacteria in the Southern Brazilian Atlantic Forest”, foi coletada na porção de Mata Atlântica paranaense localizada na Rodovia PR 410, conhecida como “Estrada da Graciosa”, numa profundidade entre 0 e 20 cm. O DNA total do solo foi extraído das dez amostras utilizando o *UltraClean Soil DNA Kit* da MO BIO Laboratories e o gene 16S foi amplificado por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase, posteriormente clonado para que se construísse uma biblioteca genômica do mesmo. Por fim, o DNA foi sequenciado utilizando-se o método de Sanger (FAORO et. al., 2010).

A amostra de solo JAB FS é composta por 115 sequências parciais de DNA linear não cultivável do gene 16S, e cada uma apresenta em média um tamanho de 469 pares de bases. A amostra de solo JAB SMS é composta por 124 sequências parciais de DNA linear não cultivável do gene 16S, e cada uma apresenta entre 400 e 894 pares de bases. A amostra de solo JAB EAA é composta por 149 sequências parciais de DNA linear não cultivável do gene 16S, e cada uma apresenta entre 364 e 430 pares de bases. A amostra de solo JAB NFA é composta por 96 sequências parciais de DNA linear não cultivável do gene 16S, e cada uma apresenta entre 371 e 430 pares de bases. A amostra de solo FAORO-MataAtlantica é composta por 754 sequências parciais de DNA linear não cultivável do gene 16S, e cada uma apresenta entre 241 e 341 pares de bases.

4.2. FERRAMENTAS UTILIZADAS

Os arquivos foram transformados para o formato FASTA utilizando o programa BioEdit (HALL, 2001) e analisadas usando o programa MG-RAST.

4.3. PARÂMETROS DO MG-RAST

Todos os solos foram submetidos a análises usando o programa MG-RAST, sob os seguintes parâmetros.

4.3.1. Parâmetros da submissão das sequências

O arquivo contendo as sequências foi submetido ao MG-RAST no formato FASTA através do procedimento descrito a seguir. Primeiramente, foi efetuado um registro de usuário, pelo qual foi obtida uma senha para se acessar o programa. Após esta etapa, o envio de arquivo foi iniciado com a submissão das sequências ao programa. Todas as sequências foram normalizadas para fazer uma comparação de maneira proporcional ao número de cada filo. Todas as sequências são provenientes do gene 16S rDNA, não houve remoção de sequências duplicadas, pois todas as sequências são oriundas de sequenciamento pelo método de Sanger e portanto não se tem um grande número de sequências em comparação com as novas tecnologias de sequenciamento. Não houve filtragem por tamanho de sequência e também não houve filtragem por ambiguidade. Não foi utilizado o Bowtie (LANGMEAD et al., 2009), que é um alinhador de sequências para fazer comparação em organismos modelos. Findadas estas etapas, a análise das sequências pôde ser iniciada.

4.3.2. Paramêtros de análise

Todos os conjuntos de sequências foram analisados usando os mesmos parâmetros.

O MG-RAST fornece um conjunto de 14 bancos de dados biológicos, sendo que 10 são relativos a proteínas e 4 são específicos para sequências ribossomais. Entre esses últimos podemos citar o RDP Database, Greengenes, LSU, SSU. Para este trabalho, o banco de dados utilizado foi o RDP Database. Após a escolha do banco de dados, os parâmetros foram selecionados e serão descritos a seguir.

O valor máximo de corte escolhido para o ‘*e-value*’ foi de $1e^{-5}$, pois é um valor significativamente bom e não prejudicou a efetividade da análise como um todo. Este valor expõe que a chance do alinhamento ter ocorrido ao acaso seja de 0,0001. O valor mínimo de identidade para corte foi de 60% e o comprimento mínimo de alinhamento para corte foi de 20 nucleotídeos. Os dois últimos parâmetros foram escolhidos empiricamente, de modo que trouxessem resultados confiáveis e o mínimo de perdas de sequências. Todos os conjuntos de sequências foram normalizados para valores entre 0 e 1 para permitir a comparação de amostras de diferentes tamanhos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Algumas sequências apareceram como provenientes de organismos eucariotos, porém por elas serem provenientes exclusivamente do gene 16S e por este gene ser encontrado apenas em organismos procariotos, conclui-se que estas sequências apresentaram qualidade ruim e a isso se deve sua classificação errônea como eucariotos. Além disso, foram utilizados parâmetros mínimos de análise da qualidade de sequências de modo a se descartar o menor número de sequências possível. Isso foi feito para evitar a possibilidade de que boas sequências fossem descartadas. O sequenciamento pelo método de Sanger era relativamente caro na época em que os estudos no qual o presente trabalho se baseou foram realizados, portanto estes usavam pequeno número de sequências em suas bibliotecas metagenômicas.

O solo FAORO-MataAtlantica, representado pelo código 4489122.3, continha 742 sequências, totalizando 212,180 pares de bases com um comprimento médio de 285 pares de bases. Todas as sequências passaram no controle de qualidade e 655 (88,3%) continham genes de RNA ribossômico, e 87 sequências (11,7%) não possuíam genes de rRNA, segundo avaliação realizada pelo MG-RAST.

O solo JAB_SMS, representado pelo código 4489012.3, continha 124 sequências totalizando 104,589 pares de bases com um comprimento médio de 843 pares de bases. Todas as sequências passaram no pouco adstringente controle de qualidade e 121 (97,6%) continham genes de RNA ribossômico e 3 (2,4%) não possuíam genes de rRNA.

O solo JAB_EAA, representado pelo código 4489011.3, continha 149 sequências totalizando 63,970 pares de bases com um comprimento médio de 429 pares de bases. Todas as sequências passaram no controle de qualidade e 144 (96,6%) continham genes de RNA ribossômico e 5 (3,4%) não possuíam genes de rRNA.

O solo JAB_NFA, representado pelo código 4489010.3, continha 91 sequências totalizando 32, 281 pares de bases com um comprimento médio de 360 pares de bases. Todas as sequências passaram no controle de qualidade e 81 (89%) continham genes de RNA ribossômico e 10 (11%) não possuíam genes de rRNA.

O solo JAB_FS, representado pelo código 4474478.3, continha 116 sequências totalizando 56,321 pares de bases com um comprimento médio de 485 pares de bases. De todas as sequências, 3 (2,6%) não passaram no controle de qualidade. Das

sequências que passaram, 105 (90,5%) continham genes de RNA ribossômico e 8 (6,9%) não possuíam genes de rRNA.

5.1. DISTRIBUIÇÃO DO DOMÍNIO BACTÉRIA

Na distribuição por filos foram observadas as seguintes porcentagens de sequências que são provenientes de bactérias: FAOROMataAtlantica 100%; JAB_SMS 73,4%, JAB_EAA 76%, JAB_NFA 63,7% E JAB_FS 67,3%. Como proposto por Carl Woese (WOESE, 1987), o domínio Bacteria possuía onze filos compostos por indivíduos cultivados e caracterizados. Neste estudo foram observados quatro novos filos quando comparados com os trabalhos anteriores dos quais foram retiradas as sequências utilizadas neste trabalho, porém ainda há muito a ser caracterizado (DUNBAR et. al, 2002; COTTRELL et. al, 2005). Os filos encontrados em todos os solos em números significativos são Proteobacteria, Acidobacteria, Firmicutes, Verrucomicrobia, Actinobacteria e Bacteroidetes. Outros filos foram encontrados em menor número variando de solo para solo, estando mais presentes em uns e quase não estando presentes em outros. São os filos Chloroflexi, Planctomycetes, Chlamydiae, Spirochaetes, Tenericutes, Nitrospirae, Cyanobacteria e Gemmatimonadetes. Os filos encontrados exclusivamente no presente trabalho, quando em comparação com os trabalhos nos quais as amostras de solos foram previamente obtidas, foram Chlamydiae, Spirochaetes, Tenericutes e Cyanobacteria. Os dados foram normalizados para valores entre 0 e 1, para permitir a comparação de amostras de diferentes tamanhos. A distribuição dos filos em cada solo pode ser observada na figura a seguir.

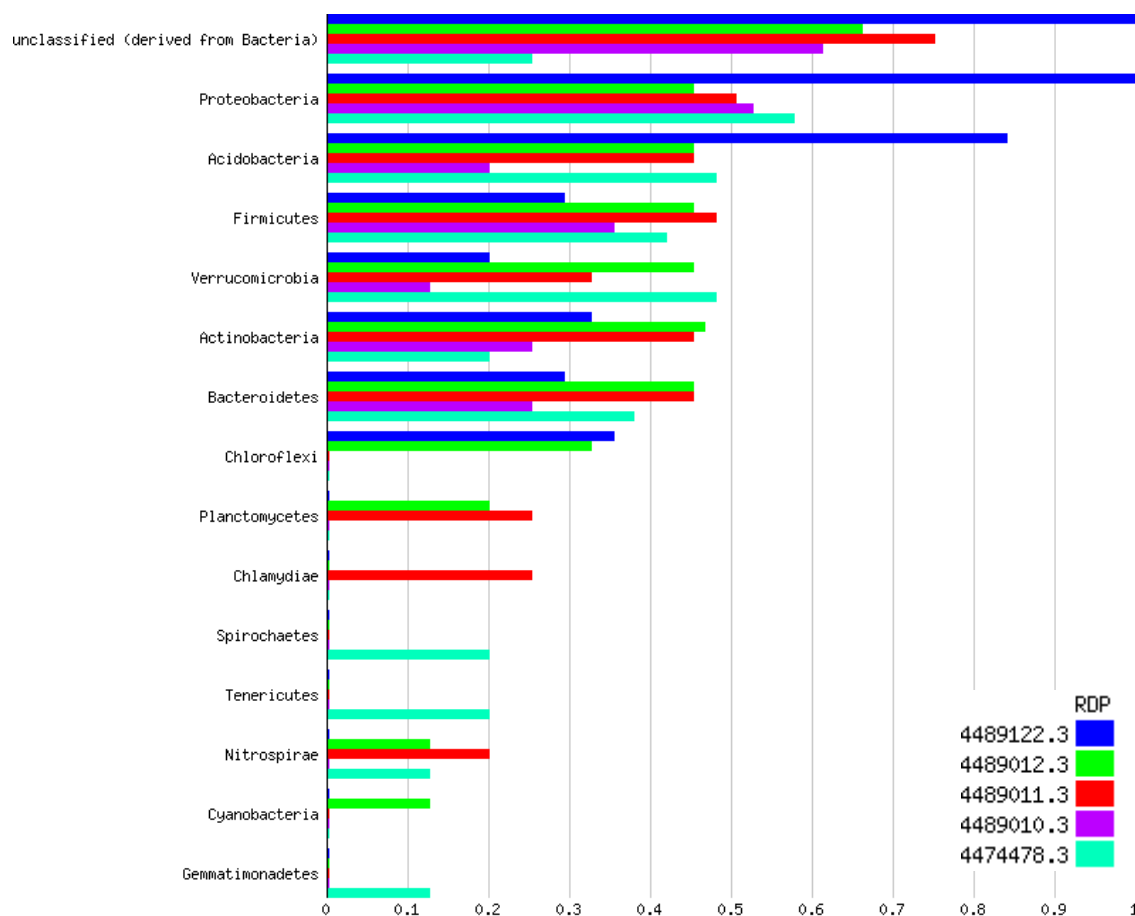


Figura 1 – Comparação da distribuição do domínio Bacteria realizada pelo programa MG-RAST utilizando o banco de dados RDPDataBase. O solo representado pela cor azul é o FAOROMataAtlantica (código 4489122.3 – Mata Atlântica); pela cor verde é o JAB_SMS (código 4489012.3 – solo de mata supressivo); pela cor vermelha é o JAB_EAA (código 4489011.3 – solo de eucalipto); pela cor lilás o JAB_NFA (código 4489010.3 – floresta tropical) e pela cor azul-claro o JAB FS (código 4474478.3 – floresta original).

O filo mais representativo no presente trabalho proveniente do solo FAORO_MataAtlantica foi o Proteobacteria, apresentando um valor de 0,984 de identificação, diferente dos resultados obtidos por FAORO et. al (2010), onde o filo Acidobacteria foi o filo mais representativo, apresentando uma porcentagem de 63% de identificação. Já no solo JAB_SMS, Actinobacteria foi o filo mais representativo, apresentando um valor de 0,459 já VAL MORAES et. al (2009) constatou que o filo Acidobacteria era o mais representativo, apresentando 18,2% de identificação. No solo JAB_EAA o filo mais representativo foi o Proteobacteria, apresentando um valor de identificação de 0,496 de identificação, porém SILVEIRA et. al (2006) obtiveram um

resultado diferente, onde o filo mais representativo foi Acidobacteria, com uma porcentagem de 25% de identificação. No solo JAB_NFA o filo mais representativo foi o Proteobacteria, apresentando uma porcentagem de identificação de 51,7% do que foi constatado por SILVEIRA et. al (2006), onde o filo mais representativo foi o Acidobacteria, com uma porcentagem de identificação de 44,78%. Por fim, o filo mais representativo no solo JAB_FS foi o Proteobacteria, apresentando um valor de 0,568 de identificação diferente do resultado apresentado por PEREIRA (2003), onde Acidobacteria foi o filo mais representativo, apresentando 26,8% de identificação. Nota-se um aumento muito significativo na população de bactérias do filo Proteobacteria e isso ocorre possivelmente devido a transformação dos solos de floresta em pastagens, ocasionando o aumento da população deste filo (PEREIRA, 2003; BONERMAN e TRIPLETT, 1997).

5.1.1. DISTRIBUIÇÃO DO FILO PROTEOBACTERIA

No filo Proteobacteria foram identificadas várias classes de bactérias. É o maior e mais diversificado grupo de bactérias cultivadas existentes, ocorrendo nos ambientes mais variados (PEREIRA, 2003). Este filo apresenta-se em grande quantidade em solos perturbados (FAORO et. al, 2010), porém neste trabalho foi o filo mais representativo entre todos os solos de florestas analisados, indicando que ele também está presente em grande quantidade em solos de florestas. Os microrganismos pertencentes a este filo possuem importante papel na ciclagem global de nitrogênio e também são responsáveis pela primeira etapa do processo de nitrificação, o que possivelmente justifica o grande número de bactérias deste filo presentes em solos de florestas (KOWALCHUK et. al., 1997; NUGROHO et. al., 2005). Algumas bactérias foram identificadas como pertencentes a este filo, porém não conseguiram ser caracterizadas dentro de nenhuma classe, sob um valor de identificação de 0,406 no solo FAORO_MataAtlantica, 0,155 nos solos JAB_EAA e JAB_FS e pouco mais que 0,01 nos solos JAB_SMS e JAB_NFA. A classe Gammaproteobacteria apresentou valor de 1 de identificação no solo FAORO_MataAtlantica, 0,135 no solo JAB_SMS, 0,35 no solo JAB_EAA, 0,35 no solo JAB_NFA e 0,314 no solo JAB_FS. Os microrganismos desta classe desenvolvem-se melhor em solos com grandes quantidades de nutrientes disponíveis,

pois são bactérias com altas taxas de crescimento (ZILLI et. al., 2003). A classe Gammaproteobacteria apresenta morfologia incluindo hastes, cocos, barras curvas e filamentos (SCHULZ et. al., 1999) e inclui entre seus membros a espécie *Escherichia coli* além de outros patógenos bem conhecidos, como *Salmonella* e *Pseudomonas*, amplamente distribuídas em águas e solos (WILLIAMS et. al., 2010). A *Escherichia coli* é representante do grupo dos coliformes e sua presença em amostras ambientais é um indicador de qualidade do ambiente em questão, pois indica a qualidade sanitária do solo e da água (TURCO e BLUME, 1999). A classe Deltaproteobacteria apresentou 0,706 de identificação no solo FAORO_MataAtlantica, 0,35 no solo JAB_SMS, 0,271 no solo JAB_EAA, 0,215 no solo JAB_NFA e 0,486 no solo JAB_FS. Algumas bactérias desta classe caracterizam-se como redutoras de sulfato (GARRITY e HOLT, 2001) e o solo FAORO_MataAtlantica apresenta um alto teor de sulfatos, o que explica a predominância de espécies desta classe neste solo. Este grupo também tem sido comumente encontrado em camadas superiores do solo da Mata Atlântica, devido ao fato de essas camadas apresentarem alto teor de matéria orgânica (AXELROOD et. al., 2002). A classe Alphaproteobacteria apresentou 0,637 de identificação no solo FAORO_MataAtlantica, 0,314 no solo JAB_SMS, 0,314 no solo JAB_EAA, 0,35 no solo JAB_NFA e 0,314 no solo JAB_FS. Os organismos desta classe habitam principalmente ambientes aquáticos e algumas espécies são responsáveis pela degradação de hidrocarbonetos aromáticos (GARRITY e HOLT, 2001). A classe Betaproteobacteria apresentou 0,469 de identificação no solo FAORO_MataAtlantica, 0,135 no solo JAB_SMS, 0,215 no solo JAB_EAA, 0,35 no solo JAB_NFA e 0,271 no solo JAB_FS. Essa classe possui bactérias quimioautotróficas e quimioheterotróficas, encontradas principalmente na água e no solo, sendo algumas patogênicas ao organismo humano (GARRITY e HOLT, 2001).

Todas as classes do filo Proteobacteria foram encontradas em maior quantidade no solo FAOROMataAtlantica, que é caracterizado por um pH menor ou igual a 4,5, nível de saturação de alumínio elevado, baixa saturação de bases e baixa quantidade de matéria orgânica, classificando o solo como distrófico e infértil (FAORO et.al., 2010). Essas condições o tornam favorável para o desenvolvimento de microrganismos decompositores que possibilitam o aproveitamento de nutrientes e sais minerais, fazendo deste solo um ambiente ideal para bactérias do filo Proteobacteria (LIMA, 2011), e confirmando os resultados obtidos no presente estudo. Estes resultados podem ser observados na figura 2.

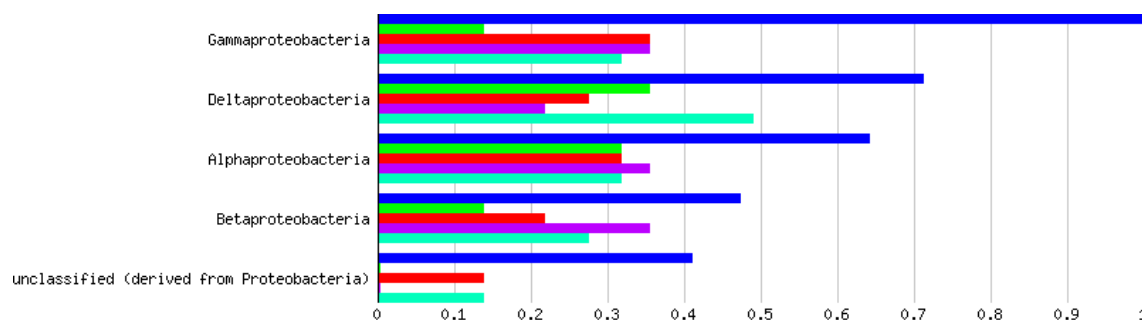


Figura 2 - Comparação da distribuição do filo Proteobacteria realizada pelo programa MGRAST utilizando o banco de dados RDPDataBase. O solo representado pela cor azul é o FAORO_MataAtlantica (código 4489122.3 – Mata Atlântica); pela cor verde é o JAB_SMS (código 4489012.3 – solo de mata supressivo); pela cor vermelha é o JAB_EAA (código 4489011.3 – solo de eucalipto); pela cor lilás o JAB_NFA (código 4489010.3 – floresta tropical) e pela cor azul claro o JAB_FS (código 4474478.3 – floresta original).

5.1.2. DISTRIBUIÇÃO DO FILO ACIDOBACTERIA

No filo Acidobacteria foram identificadas algumas classes de bactérias. Este filo foi reconhecido em 1995 por HIRASHI (HIRASHI et. al., 1995) e é um importante componente ecológico em diversos ecossistemas, destacando-se em comunidades de solo (HUGENHOLTZ et. al, 1998). Desenvolve-se bem em solos com elevada acidez (HIRASHI et. al, 1995), característica presente nos solos de florestas e a razão por ser um dos filios mais representativos neste trabalho. Algumas bactérias foram identificadas como pertencentes a este filo, porém não puderam ser caracterizadas em nenhuma classe, com valores de 0,01 no solo FAORO_MataAtlantica, 0,254 no solo JAB_SMS, 0,254 no solo JAB_EAA, 0,160 no solo JAB_NFA e 0,320 no solo JAB_FS. A classe Solibacteres apresentou um valor de identificação de 1 no solo FAORO_MataAtlantica, 0,320 no solo JAB_SMS, 0,320 no solo JAB_EAA, 0,01 no solo JAB_NFA e 0,414 no solo JAB_FS. A classe Acidobacteria, apresentou um valor de identificação de 0,761 no solo FAORO_MataAtlantica, 0,449 no solo JAB_SMS, 0,449 no solo JAB_EAA, 0,160 no solo JAB_NFA e 0,414 no solo JAB_FS.

Os microrganismos deste filo apresentam-se amplamente nos solos analisados, mas foram encontrados em menor número na amostra de solo NFA, que tem como

característica um pH mais alto (6,2), quando em comparação com os outros solos. Este resultado corrobora com a literatura, pois as bactérias deste filo desenvolvem-se melhor em ambientes em que o pH é mais ácido. Estes resultados podem ser observados na figura 3.

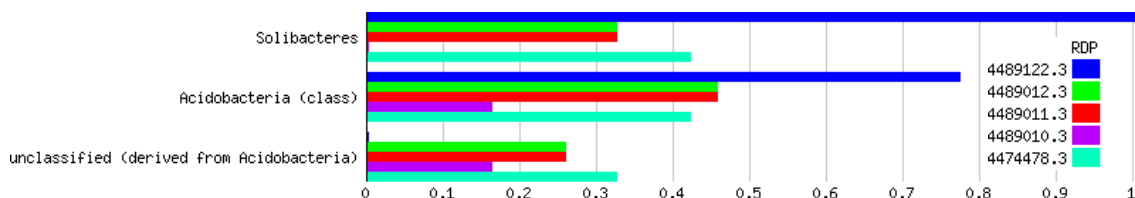


Figura 3 - Comparação da distribuição do filo Acidobacteria realizada pelo programa MG-RAST utilizando o banco de dados RDPDataBase. O solo representado pela cor azul é o FAOROMataAtlantica (código 4489122.3 – Mata Atlântica); pela cor verde é o JAB_SMS (código 4489012.3 – solo de mata supressivo); pela cor vermelha é o JAB_EAA (código 4489011.3 – solo de eucalipto); pela cor lilás o JAB_NFA (código 4489010.3 – floresta tropical) e pela cor azul-claro o JAB FS (código 4474478.3 – floresta original).

5.1.3. DISTRIBUIÇÃO DO FILO FIRMICUTES

No filo Firmicutes foram encontradas três classes de bactérias. As bactérias desse filo caracterizam-se como gram-positivas aeróbicas e anaeróbicas e apresentam baixo teor de guanina/citosina (CANNAVAN, 2007). Seu metabolismo se caracteriza por homofermentação, heterofermentação e respiração, e apresentam rápido desenvolvimento quando existem quantidades suficientes de nutrientes, porém, só prevalecem quando a disponibilidade de nutrientes ocorre em áreas de baixa competição. Devido a esses fatores, as bactérias desse filo têm sido observadas em ambientes instáveis, passando por transição em suas características (ATLAS e BARTHA, 1997). Os microrganismos deste filo são considerados estrategistas ‘r’, pois se multiplicam rapidamente no ambiente em que vivem, quando há a presença de grande quantidade de nutrientes (ATLAS e BARTHA, 1997). Grande parte dos microrganismos deste filo são celulolíticos e desempenham um papel importante na degradação de resíduos da celulose (SANTOS, 2010), e isso explica o fato deste filo ter sido amplamente observado no presente estudo. A classe Baccilli apresentou um valor de identificação inexpressivo no solo FAORO_MataAtlantica, 0,965 no solo JAB_SMS,

1 no solo JAB_EAA, 0,558 no solo JAB_NFA e 0,558 no solo JAB_FS. A classe Clostridia apresentou um valor de identificação de 0,648 no solo FAORO_MataAtlantica, 0,279 no solo JAB_SMS, 0,279 no solo JAB_EAA, 0,558 no solo JAB_NFA e 0,783 no solo JAB_FS. A classe Erysipelotrichi apresentou um valor de 0,279 no solo JAB_EAA, estando ausente nos demais solos analisados.

Os microrganismos deste filo estão amplamente distribuídos em todos os solos analisados no presente estudo, porém em maior quantidade na amostra de solo EAA. Estes resultados podem ser observados no gráfico da figura 4.

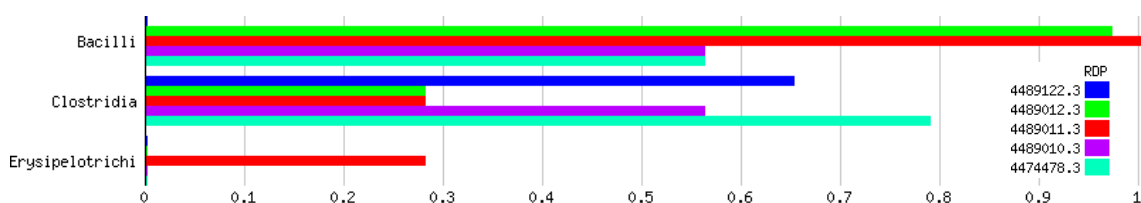


Figura 4 - Comparação da distribuição do filo Firmicutes realizada pelo programa MG-RAST utilizando o banco de dados RDPDataBase. O solo representado pela cor azul é o FAOROMataAtlantica (código 4489122.3 – Mata Atlântica); pela cor verde é o JAB_SMS (código 4489012.3 – solo de mata supressivo); pela cor vermelha é o JAB_EAA (código 4489011.3 – solo de eucalipto); pela cor lilás o JAB_NFA (código 4489010.3 – floresta tropical) e pela cor azul-claro o JAB FS (código 4474478.3 – floresta original).

5.1.4. DISTRIBUIÇÃO DO FILO VERRUCOMICROBIA

No filo Verrucomicrobia foram identificadas três classes de bactérias. Este filo foi proposto por HEDLUND et. al. em 1997 e a maioria de seus representantes encontram-se em comunidades de solo. As bactérias pertencentes a este filo são gram-negativas e apresentam sensibilidade a penicilina (HEDLUND et al., 1997). Este filo está altamente distribuído em diversos ambientes e na maioria das vezes, em grande quantidade (HUGENHOLTZ et al., 1996). Algumas bactérias foram identificadas como pertencentes a este filo, porém não foram caracterizadas em nenhuma classe, sob um valor de 0,815 no solo JAB_FS e não foram identificadas nos demais solos. A classe Verrucomicrobiae apresentou um valor de 0,315 no solo FAORO_MataAtlantica, 0,886 no solo JAB_SMS, 0,732 no solo JAB_EAA, ausente no solo JAB_NFA e 1 no solo JAB_FS. A classe Spartobacteria estava ausente no solo FAORO_MataAtlantica,

apresentou um valor de identificação de 0,815 no solo JAB_SMS, 0,315 no solo JAB_EAA, 0,315 no solo JAB_NFA e 0,631 no solo JAB_FS. A classe Opiritae apresentou um valor de identificação de 0,315 no solo FAORO_MataAtlantica e apenas 1 sequência foi identificada como pertencente a esta classe em todos os demais solos.

Os microrganismos pertencentes a este filo estão amplamente distribuídos em todos os solos analisados neste estudo, porém foram encontrados em menor número no solo NFA. Lindstrom et al. (2004), investigaram os fatores que afetam a composição bacteriana em um lago na Suécia e constataram que ambientes com alto teor de fósforo favorecem a proliferação de microrganismos do filo Verrucomicrobia. Apesar deste fato, o solo NFA foi a amostra em que os microrganismos deste filo foram encontrados em menor quantidade, e este apresenta um alto teor de fósforo em sua composição, o que sugere que outros componentes possam interferir na ocorrência deste filo. Estes resultados podem ser observados na figura 5.

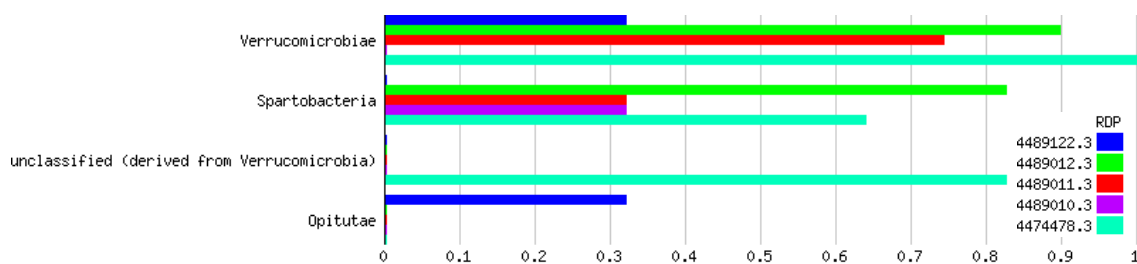


Figura 5 - Comparação da distribuição do filo Verrucomicrobia realizada pelo programa MG-RAST utilizando o banco de dados RDPDataBase. O solo representado pela cor azul é o FAOROMataAtlantica (código 4489122.3 – Mata Atlântica); pela cor verde é o JAB_SMS (código 4489012.3 – solo de mata supressivo); pela cor vermelha é o JAB_EAA (código 4489011.3 – solo de eucalipto); pela cor lilás o JAB_NFA (código 4489010.3 – floresta tropical) e pela cor azul-claro o JAB FS (código 4474478.3 – floresta original).

5.1.5. DISTRIBUIÇÃO DO FILO ACTINOBACTERIA

No filo Actinobacteria foi encontrada uma classe de bactérias. As bactérias desse filo são Gram positivas e possuem alto teor de guanina/citosina (STACKEBRANDT et al., 1997). Tem como uma de suas principais características a produção de antibióticos, podendo controlar diversos grupos bacterianos (KELLER e ZENGLER, 2004). Possuem ainda papel importante na decomposição de matéria orgânica e formação de

húmus e estão distribuídas em ecossistemas terrestres e aquáticos (GOODFELLOW e WILLIAMS, 1983). A classe Actinobacteria apresentou um valor de identificação de 0,473 no solo FAORO_MataAtlantica, 1 no solo JAB_SMS, 0,945 no solo JAB_EAA, 0,196 no solo JAB_NFA e apenas 2 sequências foram identificadas nesta classe no solo JAB_FS, o que não representa um valor significativo.

Os microrganismos pertencentes a este filo foram encontrados amplamente distribuídos em todos os solos analisados neste trabalho, porém em maior quantidade nos solos SMS e EAA. Estes resultados podem ser observados na figura 6.

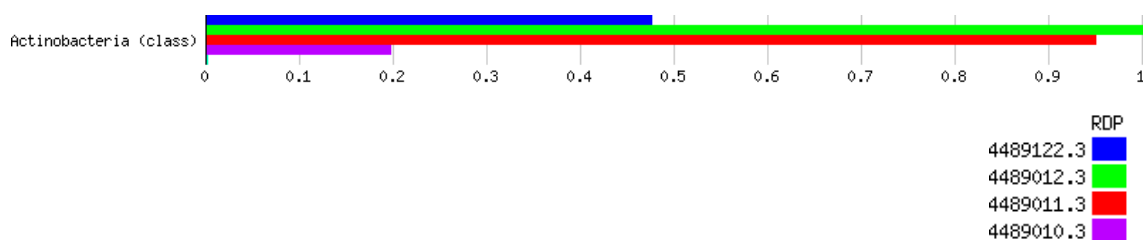


Figura 6 - Comparação da distribuição do filo Actinobacteria realizada pelo programa MG-RAST utilizando o banco de dados RDPDataBase. O solo representado pela cor azul é o FAOROMataAtlantica (código 4489122.3 – Mata Atlântica); pela cor verde é o JAB_SMS (código 4489012.3 – solo de mata supressivo); pela cor vermelha é o JAB_EAA (código 4489011.3 – solo de eucalipto); pela cor lilás o JAB_NFA (código 4489010.3 – floresta tropical) e pela cor azul-claro o JAB FS (código 4474478.3 – floresta original).

5.1.6. DISTRIBUIÇÃO DO FILO BACTEROIDETES

No filo Bacteroidetes foram encontradas quatro classes de bactérias. As bactérias desse filo estão presentes na microbiota intestinal de humanos e outros animais (PISTELLI e COSTA, 2010) e caracterizam-se como bastonetes ou cocobacilos gram-negativos, anaeróbios, sacarolíticos, não formadores de esporos, não pigmentados e têm o ácido acético e o ácido succínico como produto final do metabolismo de glicose (TORTORA et al., 2006). Apresentam características quimiorganotróficas, degradando polímeros como quitina, pectina e celulose (KIRCHMAN, 2002). A classe Sphingobacteria apresentou um valor de identificação de 0,602 no solo FAORO_MataAtlantica, 0,845 no solo JAB_SMS, 1 no solo JAB_EAA, 0,602 no solo JAB_NFA e 0,845 no solo JAB_FS. A classe Cytophagia apresentou um valor de identificação de 0,301 no solo FAORO_MataAtlantica, 0,602 no solo JAB_SMS, 0,477 no solo JAB_EAA, ausente no solo JAB_NFA e 0,301 no solo JAB_FS. A classe

Bacteroidia apresentou um valor identificação de 0,301 no solo JAB_SMS e ausente nos demais solos analisados. A classe Flavobacteria apresentou uma porcentagem de identificação de 0,301 no solo JAB_SMS e ausente nos demais solos analisados.

Os microrganismos pertencentes a este filo estão amplamente distribuídos em todos os solos analisados no presente estudo, porém em maior número nos solos SMS e EAA. Estes resultados podem ser observados no gráfico da figura 7.

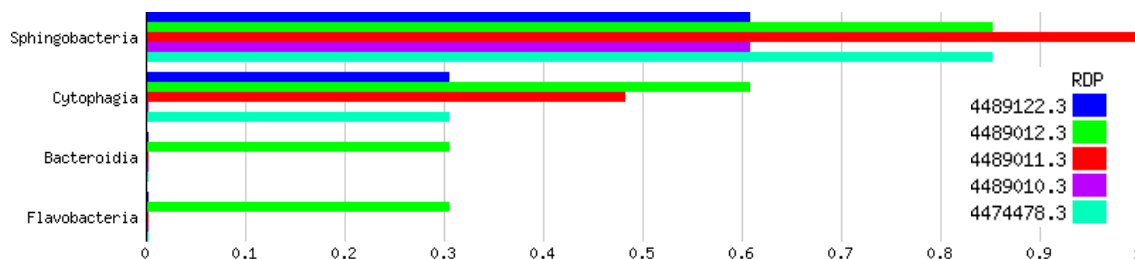
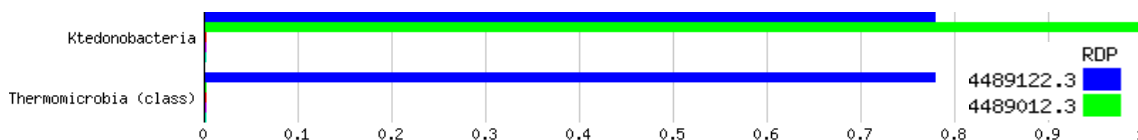


Figura 7 - Comparação da distribuição do filo Bacteroidetes realizada pelo programa MG-RAST utilizando o banco de dados RDPDataBase. O solo representado pela cor azul é o FAOROMataAtlantica (código 4489122.3 – Mata Atlântica); pela cor verde é o JAB_SMS (código 4489012.3 – solo de mata supressivo); pela cor vermelha é o JAB_EAA (código 4489011.3 – solo de eucalipto); pela cor lilás o JAB_NFA (código 4489010.3 – floresta tropical) e pela cor azul-claro o JAB FS (código 4474478.3 – floresta original).

5.1.7. DISTRIBUIÇÃO DO FILO CHLOROFLEXI

No filo Chloroflexi foram encontradas duas classes de bactérias. As bactérias pertencentes a este filo têm sido encontradas em biorreatores anaeróbios e desempenham função importante na degradação de matéria orgânica, pois são constantemente encontradas nos grânulos de lama no interior destes biorreatores. Atuam também, direta ou indiretamente, na degradação do butirato (GRILO, 2009). Também têm sido encontradas em sistemas aquáticos e locais onde há a presença de enxofre elementar, tais como águas termais ou sedimentos de rios e lagos e ainda em estações de tratamento de esgoto (SEVIOUR e BLACKAAL, 1999). A classe Ktedonobacteria apresentou um valor de identificação de 0,774 no solo FAORO_MataAtlantica, 1 no solo JAB_SMS e ausente nos demais solos analisados. A classe Thermomicrobia apresentou uma porcentagem de identificação de 0,774 no solo FAORO_MataAtlantica e ausente nos demais solos analisados.

Os microrganismos pertencentes a este filo foram encontrados em números significativos apenas nos solos FAOROMataAtlantica e SMS, diferente dos resultados obtidos por Val-Moraes et al. (2009), onde não foram encontrados microrganismos deste filo no solo de floresta (SMS). Estes resultados podem ser observados na figura 8.



–**Figura 8** - Comparação da distribuição do filo Chloroflexi realizada pelo programa MG-RAST utilizando o banco de dados RDPDatabase. O solo representado pela cor azul é o FAOROMataAtlantica (código 4489122.3 – Mata Atlântica) e pela cor verde é o JAB_SMS (código 4489012.3 – solo de mata supressiva).

5.1.8. DISTRIBUIÇÃO DO FILO PLANCTOMYCETES

No filo Planctomycetes foi encontrada uma classe de bactérias. Este filo é caracterizado por bactérias aeróbias, presentes em sua maioria em ambientes aquáticos (CANHOS et al., 1997). Porém, as bactérias desse filo também têm sido observadas em solo de mata supressivo (VAL-MORAES, 2008), em solo de floresta nativa (SILVEIRA et al., 2006), em terra preta antropogênica da Amazônia Central e Oriental (CANNAVAN, 2006) e em uma estação de tratamento de água (CHOUARI et al., 2003). A classe Planctomycetacia apresentou um valor de identificação de 1 no solo JAB_EAA e apenas 2 sequências foram identificadas nesta classe no solo JAB_SMS, o que não representa um valor significativo.

Os microrganismos pertencentes a este filo foram encontrados em números significativos apenas nos solos SMS e EAA. Estes resultados podem ser observados na figura 9.

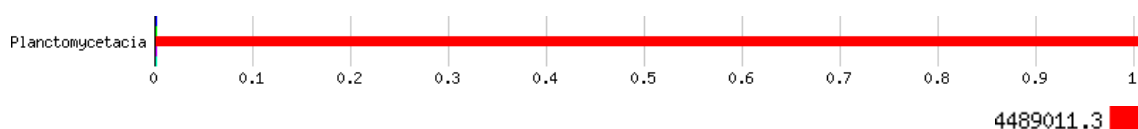


Figura 9 - Comparação da distribuição do filo Planctomycetes realizada pelo programa MG-RAST utilizando o banco de dados RDPDatabase. O solo representado pela cor vermelha é JAB_EAA(código 4489011.3 – solo de eucalipto);

5.1.9. DISTRIBUIÇÃO DO FILO CHLAMYDYAE

No filo Chlamydiae foi encontrada uma classe de bactérias. Os microrganismos pertencentes a este filo caracterizam-se como obrigatoriamente intracelulares (CAVALIER-SMITH, 2006) e estão entre os patógenos mais difundidos no mundo, e as infecções causadas por estas bactérias vem ocasionando um prejuízo econômico sem precedentes todos os anos. Entre estes patógenos, podemos citar *Chlamydia trachomatis* e *Chlamydia pneumoniae* (WYRICK, 2000). A classe Chlamydiae apresentou apenas 3 sequências identificadas em todos os solos analisados e este resultado não apresenta um valor significativo para a análise.

5.1.10. DISTRIBUIÇÃO DO FILO SPIROCHAETES

No filo Spirochaetes, observado depois da reanotação das sequências, foi encontrada uma classe de bactérias. As bactérias pertencentes a esse filo possuem metabolismo anaeróbio e aeróbio facultativo, tem vida livre e são mais comumente encontradas em ambientes aquáticos. Algumas espécies são patogênicas e nocivas a humanos (CANHOS et al., 1997). Têm sido encontradas em reatores anaeróbios em condições mesofílicas (HERNON et al., 2006). A classe Spirochaetes exibiu apenas 2 sequências identificadas em todos os solos analisados e este resultado não apresenta um valor significativo para a análise.

5.1.11. DISTRIBUIÇÃO DO FILO TENERICUTES

No filo Tenericutes foi encontrada uma classe de bactérias. Este filo foi recentemente separado do filo Firmicutes e seus microrganismos caracterizam-se pela ausência de uma parede celular rígida (SANTOS, 2010). A classe Mollicutes apresentou

2 sequências identificadas em todos os solos analisados e este resultado não apresenta um valor significativo para a análise.

5.1.12. DISTRIBUIÇÃO DO FILO NITROSPIRAE

No filo Nitrospirae foi encontrada uma classe de bactérias. As bactérias desse filo caracterizam-se como aeróbicas gram-negativas e atuam no ciclo de nitrogênio em ambientes aquáticos por meio da oxidação de nitratos (GU et al. 2004) e também têm sido encontradas em amostras de solos (DUNBAR et al., 2002). A primeira bactéria representante desse filo foi caracterizada em 1995, em uma tubulação de ferro de um sistema de aquecimento, e foi denominada *Nitrospira moscovienses*, caracterizada como gram-negativa e oxidante de nitrogênio (ALTMANN et al., 2003). A classe Nitrospira apresentou um valor de identificação de 1 no solo JAB_EAA e 2 sequências identificadas nos demais solos analisados e este resultado não apresenta um valor significativo para a análise.

Os microrganismos pertencentes a este filo foram encontrados em números significativos apenas no solo EAA. Estes resultados podem ser observados na figura 10.

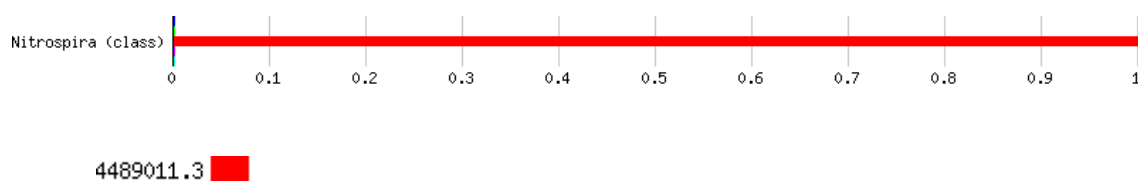


Figura 10 - Comparação da distribuição do filo *Nitrospirae* realizada pelo programa MG-RAST utilizando o banco de dados RDPDataase. O solo representado pela cor vermelha é o JAB_EAA (código 4489011.3 – solo de eucalipto);.

5.1.13. DISTRIBUIÇÃO DO FILO CYANOBACTERIA

No filo Cyanobacteria as bactérias foram identificadas como pertencentes a este filo, porém não foram identificadas em nenhuma classe, sob valor de identificação pouco significativo em todos os solos analisados, totalizando apenas 1 sequência identificada. Os microrganismos desta classe são diazotróficos, ou seja, fixam o nitrogênio atmosférico, suprimindo suas necessidades (NIXON et al., 1996).

5.1.14. DISTRIBUIÇÃO DO FILO GEMMATIMONADETES

No filo Gemmatimonadetes foi encontrada uma classe de bactérias. Este filo ocorre em diferentes ambientes, dentre eles sedimentos marinhos, lodos industriais e solos (NUNES, 2006) e também foi encontrado em solo de terra preta antropogênica da Amazônia (CANNAVAN, 2007). Uma das poucas espécies isoladas até o momento é a *Gemmatimonas aurantiaca*, bactéria gram-negativa, mesofílica e aeróbica, encontrada no lodo de um sistema de tratamento de esgotos (ZHANG et al., 2003). A classe Gemmatimonadetes apresentou um valor de identificação pouco significativo em todos os solos analisados.

5.2. ANÁLISE DE RAREFAÇÃO

A análise de rarefação serve para demonstrar se as amostras utilizadas neste trabalho foram suficientes pra representar todas as comunidades bacterianas presentes nos solos. Os solos sequenciados há mais tempo apresentam um número menor de sequências devido aos custos de sequenciamento da época, quando comparados com solos mais recentes. Portanto, os solos com menor número de sequências possivelmente foram prejudicados na amostragem de populações, o que pode ser observado na análise de rarefação. A ferramenta MG-RAST fornece uma análise de rarefação apenas em nível de espécies, tornando necessário o sequenciamento de um maior número de indivíduos para que a análise se torne mais robusta. Se a análise fosse a nível de classe e filo, provavelmente as curvas seriam diferentes, porque é mais difícil obter toda a diversidade de espécies de um ambiente do que obter toda a diversidade de gêneros e

filos de um determinado ambiente. Os resultados da análise de rarefação estão expressos no gráfico a seguir.

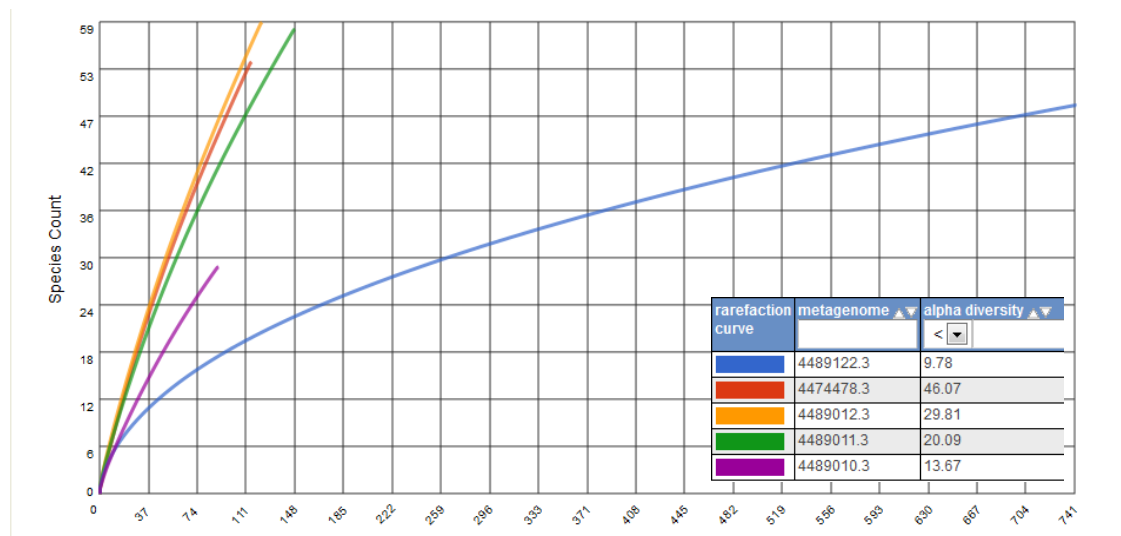


Figura 11 - Curvas de rarefação para a riqueza estimada de espécies dos cinco solos comparados, obtidas pela ferramenta web MG-RAST. O solo representando pela cor azul é o FAOROMataAtlantica (código 4489122.3), pela cor vermelha é o JAB FS (código 4474478.3), pela cor laranja é o JAB SMS (código 4489012.3), pela cor verde é o JAB EAA (código 4489011.3) e pela cor lilás é o JAB NFA (código 4489010.3).

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que:

1 – Foi encontrado um total de 14 filos, são eles: *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Chlamydiae*, *Spirochaetes*, *Tenericutes*, *Nitrospirae*, *Cyanobacteria* e *Gemmatimonadetes*.

2 – Dos 14 filos encontrados, 6 estavam presentes em todos os solos: *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes*.

3 - Dentre todos os filos observados, 4 foram encontrados exclusivamente no presente trabalho, quando em comparação com os trabalhos anteriores dos quais foram retiradas as sequências utilizadas neste estudo. São eles: *Chlamydiae*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* e *Cyanobacteria*. Esse resultado indica que o processo de reanotação foi eficiente.

4 – A ferramenta MG-RAST foi satisfatória e todas as análises atenderam os objetivos e expectativas iniciais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTMANN, D.; STIEF, P.; AMANN, R.; BEER, D. D.; SCHRAMM, A. In situ distribution and activity of nitrifying bacteria in freshwater sediment. **Environmental Microbiology**, vol. 5, n. 9, p. 798-803, 2003.

ATLAS, R. M., BARTHA, R. **Microbial Ecology; Fundamentals and Applications**. Addison-Wesley Pub, 306 páginas, 1998.

AXELROOD, P. E.; CHOW, M. L.; RADOMSKI, C. C.; McDERMOTT, J. M.; DAVIES, J. Molecular characterization of bacterial diversity from British Columbia forest soils subjected to disturbance. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 655-674, 2002.

BEARE, M. H.; COLEMAN, D.C.; CROSSLEY, J.R.; HENDRIX, P.F.; ODUM, E.P. A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. **Plant and soil**, v.170, p. 5-22, 1995.

BORNEMAN, J.; SKROCH, P.W.; O'SULLIVAN, K.M.; PALUS, J.A.; RUMJANEK, N.G.; JANSEN, J.L.; NIENHUIS, J.; TRIPLETT, E.W. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 935-946, 1996.

BORNEMAN, J.; TRIPLET, E. W. Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n 7, p. 2647-2653, 1997.

CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P.; VAZOLLER, R. F.; PELLIZARI, V. H. **Diversidade no domínio *bactéria***. In: Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX, v.1, p.1-13. Fapesp, São Paulo, 1997.

CANNAVAN, F. S. **Diversidade das comunidades bacterianas em solos de terra preta antropogênica da Amazônia Central e Oriental**. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP, 2007.

CAVALIER-SMITH, T. Rooting the tree of life by transition analyses. **Biology Direct** **1**, v. 19, 2006.

CHOUARI, R.; LE PASLIER, D.; DAEGELEN, P.; GINESTET, P.; WEISSENBACH, J.; SGHIR, A. Novel Major Bacterial Candidate Division within a Municipal Anaerobic Sludge Digester. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, p. 7354–7363, 2003.

CIOS, K. J. et al. Computational intelligence in solving bioinformatics problems. **Artificial Intelligence in Medicine**, Elsevier, v. 35, p. 1- 8, 2005.

COTTRELL, M. T., WAIDNER, L.A., YU, L. E KIRCHMAN, D.L. Bacterial diversity of metagenomic and PCR libraries from Delaware River. **Environmental Microbiology**, v.7, n. 12, p. 1883-1895, 2005.

DEANGELIS, K.M.; GLADDEN, J.M.; ALLGAIER, M.; D’HAESELEER, P.; FORTNEY, J.L.; REDDY, A.; HUGENHOLTZ, P.; SINGER, S.W.; GHEYNST, J.S.V.; SILVER, W.L.; SIMMONS, B.A.; HAZEN, T.C. Strategies for enhancing the effectiveness of metagenomic based enzyme discovery in lignocellulolytic microbial communities. **BioEnergy Research**, v. 3, p. 146-158, 2010.

DIMITROV, MAURÍCIO ROCHA. **Construção de biblioteca metagenômica e prospecção de genes para a síntese de polihidroxicanoatos**. 100 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, 2009.

DUNBAR, J.; BARNS, S. M.; TICKNOR, L. O.; KUSKE, C.R. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 6, p. 3035-45, 2002.

FAORO, H. **Determinação da biodiversidade de *Archaea* e *Bacteria* da Mata Atlântica Paranaense**. 183f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

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

FIGESELER, L.; HENTSCHEL, U.; GROZDANOV, L.; SCHIRMER, A.; WEN, G.; PLATZER, M.; HRVATIN, S.; BUTZKE, D.; ZIMMERMANN, K.; PIEL, J. Widespread occurrence and genomic context of unusually small polyketide synthase genes in microbial consortia associated with marine sponges. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 2144–2155, 2007.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. H. A road map to the manual. IN: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, G. M. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. Berlin: Springer, 721 p., 2001.

GOMES, E.S.; NAVARRETE, A.A.; LEMOS, E.G.M.; TSAI, S.M.; MOREIRA, F.M.S. A nova ciência da metagenômica: revelando os segredos do planeta microbiano. **Boletim Informativo da SBCS**, janeiro – abril, 2009.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T. Ecology of *Actinomycetes*. **Annual Review of Microbiology**, v. 37, p. 189-215, 1983.

GRILO, ANDRÉ MANUEL SARDINHA. **Caracterização molecular de populações microbianas em reactores anaeróbios**. 49 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Universidade de Lisboa. Lisboa, 2009.

GU, A. Z.; HEDLUND, B. P.; STALEY, J. T.; STRAND, S. E.; STENSEL, H. D. **Analysis e comparison of the microbial community structures of two enrichment cultures capable of reductively dechlorinating TCE and cis-DCE**. *Environmental Microbiology*, v. 6, n. 1, p. 45-54, 2004.

HALL, TOM. **BioEdit version 5.0.6**. Department of Microbiology, North Carolina State University. Estados Unidos, 2001.

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

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

HEDLUND, B. P.; GOSINK, J.; STALEY, J. T. Verrucomicrobia a new division of the Bacterial containing three new species of *Prostheco bacter*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 72, p. 29-38, 1997.

HERNON, F.; FORBES, C.; COLLERAN, E. Identification of mesophilic and thermophilic fermentative species in anaerobic granular sludge. **Water Science and Technology**, v. 54, p. 19-24, 2006.

HIGASHI, S. **Classificação de bactérias com base no gene ribossomal 16S utilizando redes neurais artificiais**. 106f. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

HIRASHI, A.; KISHIMOTO, N.; KOZAKO, Y. Phylogenetic position of the menaquinonecontaining acidophilic chemo organotroph *Acidobacterium capsulatum*. **FEMS Microbiology Letter**, Amsterdam, v. 132, p. 91-94, 1995.

HUNGENHOLTZ, P.; PACE, N.R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Trends in Biotechnology**, v.14, p. 190-197, 1996.

HUGENHOLTZ, P.; PITULLE, C.; HERSHBERGER, K. L.; PACE, N. R. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 366-76, 1998.

IORIS, R. M. **Construção e triagem de uma biblioteca metagenômica de solo da Floresta Atlântica Paranaense**. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR, 2008.

JESUS, E.C.; MARSH, T.L.; TIEDJE, J.M.; MOREIRA, F.M.S. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **The ISME Journal**, p. 1-8, 2009.

KELLER, M.; ZENGLER, K. Tapping into microbial diversity. **Nature Review Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 141-150, 2004.

KIRCHMAN, D. L. The ecology of Cytophaga Flavobacteria in aquatic environments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 39, p. 91–100, 2002.

KNIETSCH, A.; BOWIEN, S.; WHITED, G.; GOTTSCHALK, G.; DANIEL, R. Identification and characterization of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase- and diol dehydratase-encoding genes from metagenomic DNA libraries derived from

enrichment cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 3048-3060, 2003.

KOCH, I.; FUELLEN, G. A review of bioinformatics education in germany. **Briefings in Bioinformatics**, v. 9, p. 232-242, 2008.

KOWALCHUK, G. A.; STEPHEN, J. R.; DE BOER, W.; PROSSER, J. I.; EMBLEY, T. M.; WOLDENDORP, J. W. Analysis of *betaproteobacteria* ammonia-oxidizing bacterial in coastal sand dunes using denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR amplified 16S rDNA fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 1489-1497, 1997.

LANGMEAD, B.; TRAPNELL, C.; POP, M.; SALZBERG, S. L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome **Genome Biology**, 2009.

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

LIMA, JÚLIA ELIDIA DE. **Diversidade de bactéria e Archaea em solos de Mata Atlântica no estado de São Paulo**. 84f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP, 2011.

LINDSTRÖM, E. S.; VREDE, K.; LESKINEN, E. Response of a member of the Verrucomicrobia, among the dominating bacteria in a hypolimnion, to increased phosphorus availability. **Journal of Plankton Research**, v. 26, n. 02, p. 241-246, 2004.

LUDWIG, W.; KLENK, H-P. Overview: A phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. (Eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, p. 49-65, Berlin, 2001.

MASON, W.S.; SEAL, G.; SUMMERS, J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. **Journal of Virology**, v. 36, p. 829-836, 1980.

MEYER, F.; PAARMANN, D.; SOUZA, M. D.; OLSON, R.; GLASS, E. M.; KUBAL, M.; PACZIAN, T.; RODRIGUEZ, A.; STEVENS, R.; WILKE, A.; WILKENING, J.; EDWARDS, R. A. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, p.1-8, 2008.

NASCIMENTO, C.W.A.; ARAÚJO, J.C.T. Redistribuição entre frações e teores disponíveis de zinco em solos incubados com lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, n.4, 2004.

NIXON, S. W.; AMMERMAN, J. W.; ATKINSON, L. P.; BEROUNSKY, V. M.; BILLEN, G.; BOICOURT, W. C.; BOYNTON, W. R.; CHURCH, T. M.; DITORO, D. M.; ELGREM, R. The fate of nitrogen and phosphorus at the land-sea margin of the north Atlantic ocean. **Biogeochemistry**, v. 35, p. 141-180, 1996.

NUGROHO, R. A.; ROLING, W. F. M.; LAVERMAN, A. M.; ZOOMER, H. R.; VERHOEF, H. A. Presence of *Nitrospira* cluster 2 bacteria corresponds to N transformation rates in nine acid Scot pine forest soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, p. 473-481, 2005.

NUNES, G. L. Diversidade e estrutura de comunidades de *Bacteria* e *Archaea* em solo de mangue contaminado com hidrocarbonetos de petróleo. 84f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP, 2006.

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

PAIXÃO, D. A. A.; DIMITROV, M. R.; PEREIRA, R. M.; ACCORSINI, F. B.; VIDOTTI, M. B.; LEMOS E. G. M. Molecular analysis of the bacterial diversity in a specialized consortium for diesel oil degradation. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 34, p. 773-781, 2010.

PEÑA, M. L. P.; MARQUES, R.; JAHNEL, M. C.; DOS ANJOS, A. Respiração microbiana como indicador da qualidade de solo em ecossistema florestal. América do Norte, 35, set. 2005. Disponível em: <http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/floresta/article/view/2435/2037>. Acesso em: 30 Maio de 2012.

PEREIRA, RODRIGO MATHEUS. **Diversidade bacteriana de um latossolo sob cultivo intensivo e floresta através de análise metagenômica**. 86f. 72f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária). Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, SP, 2003.

PEREIRA, R.M.; SILVEIRA, E.L.; SCAQUITTO, D.C.; CARARETO-ALVES, L.M.; LEMOS, E.G.M. Avaliação da população de possíveis rizobactérias em solos sob espécies florestais. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, vol.32, p. 1921-1927, 2008.

PEREIRA, R.M.; SILVEIRA, E.L.; SCAQUITTO, D.C.; PEDRINHO, E.A.N.; VALMORAES, S.P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES, L.M.; LEMOS, E.G.M. Molecular characterization of bacterial populations of diferente soils. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2006.

PISTELLI, G. C.; COSTA, C. E. M. Bactérias intestinais e obesidade. **Revista saúde e pesquisa**, v. 3, n. 1, p. 115-119, 2010.

RIESENFELD, C. S.; SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annual Review of Genetics*, v. 38, p. 525-552, 2004.

RONDON, M. R.; GOODMAN, R.M.; HANDELSMAN, J. The earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. ***Trends in Biotechnology***, v. 17, p. 403-409, 1999.

RONDON, M. R.; AUGUST, P. R.; BETTERMANN, A. D.; BRADY, S. F.; GROSSMAN, I. A.; LILES, M. R.; LOIACONO, K. A.; LYNCH, B. A.; MACNEIL, I. A.; MINOR, C.; TIONG, C. L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M. S.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R. M. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. ***Applied and Environmental Microbiology***, v. 66, p. 2541-2547, 2000.

SANTOS, ADRIANA LOPES DOS. **Diversidade molecular microbiana de lixiviados de aterros**. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ, 2010.

SCHULZ, H. N.; BRINKHOFF, T.; FERDELMAN, T. G.; MARINE, M. H.; TESKE, A.; JORGENSEN, B. B. Dense populations of a giant sulfur bacterium in Namibian shelf sediments, ***Science***, v. 284, p. 493-495, 1999.

SEVIOUR, R. J.; BLACKALL, L. L. Current taxonomic status of filamentous bacteria found in activated sludge plants. In the microbiology of activated sludge. Seviour, R. J., Blackall, L.L. (ed), **Kluwer Academic Publishers**, p. 122-146, 1999.

SILVA, RITA DE CÁSSIA BARRETO DA. **Prospecção de genes de interesse biotecnológico: uma abordagem metagenômica**. 44 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2009.

SILVEIRA, E.L.; PEREIRA, R.M.; SCAQUITTO, D.C.; PEDRINHO, E.A.N.; VAL-MORAES, S.P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES, L.M.; LEMOS, E.G.M. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.10, p.1507-1516, 2006.

SLEATOR, R. D.; SHORTALL, C.; HILL, C. Metagenomics. **Letters in Applied Microbiology**, ISSN 0266-8254, p. 1-6, 2008.

STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. L. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 479-491, 1997.

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

TORSVIK, V. et al. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. **Journal of Biotechnology**, v. 64, p. 53-62, 1998.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Procariotos: Domínio Bacteria e Archaea. In: **MICROBIOLOGIA**. Oitava edição p. 305-333. Artmed. São Paulo, SP, 2006.

TURCO, R. F.; BLUME, E. Indicators of soil quality. In: SIQUEIRA, J. O; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. G. R.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Org.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS ; Lavras: UFLA/DCS, p. 529-549, 1999.

VAL-MORAES, SILVANA POMPÉIA DO. Impacto do lodo de esgoto na comunidade bacteriana do solo: avaliação por microarranjo de DNA. 171 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2008.

VAL-MORAES, S. P.; VALARINI, M. J.; GHINI, R.; LEMOS, E. G. M.; CARARETO-ALVES, L. M. Diversidade de bactérias de solo sob vegetação natural e cultivo de hortaliças. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 1, p. 7-16, jan-mar, 2009

VENTER, J. C.; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J. F.; HALPERN, A. L.; RUSCH, D.; EISEN, J. A.; WU, D.; PAULSEN, I.; NELSON, K. E.; NELSON, W. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. **Science**, v. 304, p. 66-74, 2004.

VOGET, S.; LEGGEWIE, A.; UESBECK, A.; RAASCH, C.; JAEGER, K. –E.; STREIT, W. R. Prospecting for novel Biocatalysts in a soil metagenome. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 6235-6242, 2003.

WILLIAMS, K. P.; GILLESPIE, J. J.; SOBRAL, B. W. S.; NORDBERG, E. K.; SNYDER, E. E.; SHALLOM, J. M.; DICKERMAN, A. W. Phylogeny of *Gammaproteobacteria*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 9, p. 2305-2314, 2010.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiology Reviews**, v. 51, p. 221–271, 1987.

WYRICK, PRISCILLA, B. Intracellular survival by Chlamydia. **Cell Microbial**, v. 2, p. 275-282, 2000.

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

ZHOU, J.; HUANG, Y.; MO, M. Phylogenetic analysis on the soil bacteria distributed in karst forest. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol.40, no.04. São Paulo,SP, 2009.