



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIA EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE BIOTECNOLOGIA

MARIANA FRANCELINO GRANIG

Análise da diversidade bacteriana em solos.

São Carlos
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIA EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE BIOTECNOLOGIA

MARIANA FRANCELINO GRANIG

Análise da diversidade bacteriana em solos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientação: Prof. Dr. Euclides Matheucci Junior

São Carlos
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Mariana Francelino Granig, realizada em 12/07/2018:

Prof. Dr. Euclides Matheucci Junior
UFSCar

Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza
UFSCar

Profa. Dra. Karina Yanágui de Almeida
CTC

Agradecimentos

Essa dissertação de mestrado não teria bons frutos sem a ajuda e apoio de muitas pessoas. Em primeiro lugar, agradeço a Deus por sempre me guiar e colocar as pessoas corretas no meu caminho, além de sempre me mostrar através da fé que eu sou capaz mesmo com tantas adversidades. Segundo, agradeço ao meu orientador Dr. Euclides Matheucci Jr. Por sempre ter aceitado me orientar, pelos ensinamentos e por me motivar sempre. Desejo agradecer também, aos meus pais que sempre me apoiaram em todas as decisões da minha vida e por me darem força para nunca desistir dos meus objetivos. E por fim, agradeço aos meus amigos que estiveram ao meu lado em todos os momentos me dando apoio.

RESUMO

Desde a antiguidade o solo sempre teve uma importância muito alta para os primitivos, visto que o solo era utilizado para produção de alimentos entre outras peculiaridades. Diante disso, com o passar dos tempos o interesse nos estudos do solo foram ganhando destaque como o estudo relacionados a formação do solo e os microrganismos presentes. Com isso, foi descoberto que muitos microrganismos presentes no solo tinham características benéficas, e isso gerou o interesse ainda maior por entender melhor tudo o que estava relacionado ao solo. Levando em consideração todos esses pontos, sabe-se que no Brasil existe um Sistema Brasileiro de Classificação de Solos, que possibilita entender quais os tipos de solos existentes e suas características. Isso é essencial para poder entender que tipo de microrganismo é capaz de se desenvolver, qual cultura pode ser plantada, e como se deu a formação desse solo. Porém, para obter uma interpretação cada vez mais consistente sobre um solo leva-se em consideração análises de macro e micronutrientes, pedogênese, e ultimamente surgiu uma nova análise para corroborar com todos esses dados, a metagenômica. Sendo assim, juntando todas essas análises é possível compreender todas as interações existente no solo, inclusive qual a diversidade de microrganismos presente. Para compreender todas as interações existentes no solo foram coletadas amostras nas dependências do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC-SP), sendo estas representadas por três solos diferentes, e nestas amostras foram realizadas análises físico-químicas e análises metagenômicas, as quais foram baseadas no sequenciamento contemplando as regiões V3 e V4 do gene 16S RNAr através do protocolo Illumina MiSeq, e posteriormente análises de bioinformática. A partir de todos os dados coletados e processados via software, estes foram confrontados com o banco de dados de bactérias “Silva”, e isso permitiu determinar a diversidade bacteriana de cada tipo de solo levando em consideração os níveis de taxonomia. Por fim, todas as análises foram correlacionadas para compreender todas as interações existentes em cada tipo de solo.

Palavras-chave: solo, microrganismos, pedogênese, metagenômica, sequenciamento, diversidade bacteriana

Abstract

Since ancient times the soil has always had a very high importance for the primitive, since the soil was used for food production among other peculiarities. Given this, over time the interest in soil studies were gaining prominence as the study related to soil formation and microorganisms present. With this, it was discovered that many microorganisms present in the soil had beneficial characteristics, and this generated the greater interest to better understand everything that was related to the soil. Taking into account all these points, it is known that in Brazil there is a Brazilian Soil Classification System, which makes it possible to understand what types of soils exist and their characteristics. This is essential in order to understand what type of microorganism is capable of developing, what crop can be planted, and how the soil was formed. However, to obtain an increasingly consistent interpretation of a soil, macro and micronutrient analyzes, pedogenesis, and lately a new analysis has emerged to corroborate all the data, the metagenomics. Therefore, joining all these analyzes is possible to understand all interactions in the soil, including the diversity of microorganisms present. In order to understand all interactions in the soil, samples were collected at the Sugarcane Technology Center (CTC-SP), and these were represented by three different soils, and in these samples physical-chemical analyzes and metagenomic analyzes were performed, which were based on the sequencing by contemplating the V3 and V4 regions of the 16S RNAr gene through the Illumina MiSeq protocol, and later bioinformatics analyzes. From all the data collected and processed through software, these were confronted with the "Silva" bacterial database, and this allowed to determine the bacterial diversity of each type of soil taking into account the levels of taxonomy. Finally, all analyzes were correlated to understand all interactions in each type of soil.

Keywords: soil, microorganisms, pedogenesis, metagenomics, sequencing, bacterial diversity

Lista de Figuras

Figura 1 - Gene 16S RNAr	16
Figura 2 - Mapa de satélite com a marcação dos três talhões, no CTC	19
Figura 3 - Coleta das amostras de solo	20
Figura 4 - Imagem de satélite do talhão 17 com os 5 pontos de coleta	20
Figura 5 - Imagem de satélite do talhão 103 com os 5 pontos de coleta	21
Figura 6 - Imagem de satélite do talhão 224 com os 5 pontos de coleta	21
Figura 7 - Amostras nos tubos de extração: solos 17 x 103 x 224.....	24
Figura 8 - Fluxograma do trabalho para as análises de Bioinformática.....	27
Figura 9 - Triângulo textural de solo	31
Figura 10 - Gráfico de nutrientes em função do pH	32
Figura 11 - Gráfico referente ao R1 (sense).....	37
Figura 12 - Gráfico referente ao R2 (antisense).....	38
Figura 13 - Gráfico de rarefação	39
Figura 14 - Gráfico de Componentes Principais por talhão: 17 X 103 X 224.....	40
Figura 15 - Gráfico de OTU: Taxonomia Filo.....	41
Figura 16 - Gráfico de OTU: Taxonomia Classe.....	41
Figura 17 - Gráfico de OTU: Taxonomia Ordem	42
Figura 18 - Gráfico de OTU: Taxonomia Família	42
Figura 19 - Gráfico de OTU: Taxonomia Gênero.....	43
Figura 20 - Gráfico de OTU: Taxonomia Espécie.....	43
Figura 21 - Gráfico de Distribuição de bactérias por Gênero em cada talhão	44

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Denominação dos pontos dos talhões de acordo com as coordenadas geográfica..	22
Tabela 2 - Quantificação das amostras de acordo com os talhões.....	25
Tabela 3 - Sequência dos Primers de Amplificação	26
Tabela 4 - Sequência dos Primers dos adaptadores	26
Tabela 5 - Valor Q Score ou Phred Score	28
Tabela 6 - Análise do solo: pH x M.O (matéria orgânica) x CTC (troca de cátions) x V% x N (nitrogênio)	29
Tabela 7 - Análise Física do Solo	29
Tabela 8 - Análise de Qualidade (Trimagem)	35
Tabela 9 - Merged reads	35
Tabela 10 - Classificação do pH em análise com CaCl ₂	45

Sumário

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	10
2. OBJETIVO	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Escolha das amostras de solo	18
3.2. Coleta das amostras de solo	19
3.3. Processamento das amostras	22
3.4. Quantificação e concentração das amostras.....	24
3.5. Sequenciamento das amostras.....	25
3.6. Análise de Bioinformática	26
4. RESULTADOS	29
4.1. Análises do solo	29
4.2. Análises de Bioinformática.....	35
4.2.3. Análises de Qualidade	35
4.2.4. Análise de Q-Score.....	37
4.2.5. Análise de Rarefação	38
4.2.6. Análise de PCA	39
4.2.7. Análises de OTU	41
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	45
5.1. Análises do solo	45
5.2. Análises de Metagenômica	46
6. CONCLUSÃO.....	50
7. REFERÊNCIAS	51

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A cana-de-açúcar é uma cultivar com grande importância para o Brasil devido a sua produtividade. Além disso, essa cultivar pode ser plantada em diferentes solos, os quais podem estar em diferentes climas, representando assim uma versatilidade na hora do plantio.

Devido a versatilidade para ser cultivada, a cana de açúcar tornou-se uma das melhores opções de fonte de energia renovável com a intenção de reduzir a emissão de gases poluentes. (Maule *et al.*, 2001)

De acordo com Andreot *et al.* (2017), a interação de microrganismos e plantas são de extrema importância para a sua sobrevivência e reprodução. Além disso, sabe-se que a microbiota é formada por organismos procarionte e eucariontes, como por exemplo bactérias, e que estes têm correlação direta ao metabolismo, nutrição e fisiologia da planta. Diante disso, qualquer exposição da planta a patógenos, temperaturas adversas, produtos químicos ou antibióticos modificam a microbiota do solo, o que pode acarretar danos a alguns mecanismos de desenvolvimento da planta.

Segundo LEPSCH (2010, p. 11), os homens primitivos enxergavam o solo como meio de locomoção, crescimento de vegetais e frutos, barro para construção de objetos e pigmentos para pinturas rupestres. As classificações dos solos eram baseadas nos que forneciam melhores frutos e nos que forneciam matéria-prima para as pinturas rupestres e confecção de objetos. Porém, com o passar dos anos, os humanos começaram a se fixar em alguns territórios, e desta maneira iniciou-se o cultivo de plantas para obter alimentos. Desse modo, cada vez mais foi aumentando o interesse pela agricultura, e por consequência o conhecimento do solo.

Com o aumento do interesse por entender melhor os solos, foi criada um ramo da ciência a “pedologia”, o que permite determinar que o solo é um corpo dinâmico e organizado. Por causa dessa conclusão, ele criou mais um ramo da ciência, a “pedogênese”, a qual permite estudar a formação dos solos. Enquanto haviam estudos sobre a formação do solo, em contrapartida haviam estudos sobre a origem das espécies biológicas. Com isso, foi possível fazer algumas correlações sobre a influência dos organismos na formação dos solos. (LEPSCH, 2010; p.16)

Segundo FERREIRA (2014), os microrganismos foram os primeiros seres a colonizarem a Terra, e com o tempo se tornaram o grupo abundante e diversificado de organismos, os quais habitavam praticamente todos os tipos de ambientes, inclusive os que extrapolam o limite de sobrevivência de animais e plantas. Diante disso, sabe-se que há um número muito grande de microrganismos na Terra, em torno de $4-5 \times 10^{30}$ células no solo, porém fica difícil determinar todos porque existem alguns limitantes como os métodos tradicionalmente utilizados para isolamento e cultivo de microrganismos em laboratório, devido aos meios e condições de cultivo, as quais são incompatíveis com o ambiente natural. Além disso, outro fator limitante é não ter um material completo de referência de taxonomia disponível que permita identificar todos os tipos de microrganismos encontrados no solo.

Levando em consideração todas as dificuldades para estudar as interações solo-microrganismos, muitas análises foram sendo desenvolvidas, a fim de tentar minimizar todos os fatores limitantes. Com isso, a pedogênese; análises de macro e micronutrientes, metagenômica foram ganhando destaque, e assim permitir correlacionar todos os dados e compreender todas as interações no solo. E para isso ter uma correlação primeiro é necessário avaliar as características dos solos, e depois realizar as outras análises, e assim conseguir construir uma linha de raciocínio e obter um resultado que corrobore para interpretar as interações solo- microrganismos.

No Brasil há vários tipos de solos, de acordo com o SISTEMA BRASILEIRO DE CLASSIFICAÇÃO DE SOLOS (Embrapa, 2006), sendo que cada um tem uma característica, a qual determina qual é a melhor cultivar a ser plantada, buscando sempre o melhor desempenho e produtividade. Os tipos de solos são argissolos, cambissolos, chernossolos, espodossolos, gleissolos, latossolos, luvisolos, neossolos, nitossolos, organossolos, planossolos, plintossolos, vertissolos, entretanto todos esses grupos podem ser fracionados em subgrupos.

Levando-se em consideração a classificação de solos existe uma ferramenta que se chama Triângulo Textural de Solo, a qual é utilizada para interpretar a análise textural de solo, a qual raramente sofrerá modificação quando comparada as análises químicas. Essa ferramenta permite relacionar a textura com a macro e microporosidade., visto que a macroporosidade refere-se a drenagem de água no solo e a micro refere-se ao armazenamento de água no solo. Além disso, a textura da solo influencia as características químicas do solo como teor de matéria orgânica e sua taxa de decomposição, capacidade de armazenamento de nutrientes e resistência à mudança de pH. Outra particularidade da análise de textura do solo

está relacionada a classificação pedogênica, visto que a relação de argila e silte fornece uma estimativa do grau de transformação dos constituintes minerais de um solo. (Oliveira, 2011)

De acordo com OLIVEIRA *et al.* (2007), a grande maioria dos solos brasileiros tem caráter ácido, o que resulta em baixa concentração de cálcio, magnésio e potássio. A falta de cálcio juntamente com alto teor de alumínio prejudica o crescimento do sistema radicular e isto leva a um comprometimento da cana como um todo.

Diante da disponibilidade de nutrientes, um importante é o nitrogênio (N), o qual está intimamente ligado a nutrição e fisiologia da planta. Isso deve-se ao fato desse elemento ser constituinte das proteínas e ácidos nucleicos, sendo ele e o potássio (P), absorvidos em maiores quantidades pela cana. Outra característica do N é propiciar a longevidade das folhas, o que acarreta alta absorção de gás carbônico, gerando acúmulo de massa seca. Além disso, a absorção do N está ligada a disponibilidade do fósforo (P), ou seja, plantas com alto teor de fósforo, apresentam absorção praticamente constante de N; já plantas com deficiência de P não conseguem absorver N. (OLIVEIRA *et al.* 2007)

Segundo JACOBY *et al.* (2017), três mecanismos evidenciam a importância da microbiota do solo, no desenvolvimento da planta. Os três mecanismos são sinalização hormonal; cepas microbianas patogênicas repelentes e aumentar a biodisponibilidade de nutrientes transmitidos pelo solo. Levando em consideração o terceiro mecanismo, alguns microrganismos são capazes de metabolizar alguns nutrientes, os quais se apresentam vinculados a moléculas orgânicas, e desta maneira torna-os biodisponíveis. Por isso, é importante que a microbiota do solo esteja equilibrada para que nenhuma etapa do desenvolvimento da planta seja afetada, já que os nutrientes que precisam sofrer metabolização são N, P e S, e estes estão intimamente ligados a processos essenciais ao crescimento da planta. Por isso, é de extrema importância entender como os microrganismos, presentes no solo, interferem na performance do cultivar, e se há algum mecanismo que possibilite desenvolver mais um órgão, a ponto de atingir um objetivo mais rapidamente. Tudo isso é capaz através do sequenciamento da metagenômica do solo, que nos permite verificar quais são as comunidades de bactérias estão presentes em cada tipo de solo, e com isso pode-se determinar qual é o melhor ambiente de cultivo de acordo com seus objetivos.

Levando em consideração a microbiota do solo, mais que 99% dos microrganismos não podem ser cultivados em laboratório, o que não permite estudos exploratórios sobre eles. Por isso, estudos baseados em análises diretas da diversidade de bactérias no meio ambiente, permitiram mostrar uma diversidade rica de organismos não cultiváveis e estudados em laboratório. E para conseguir realizar as análises diretas foi

necessário entender as limitações de cada cultura, o que propiciou o desenvolvimento de muitas tecnologias. Diante disso, surgiu a metagenômica que é considerada o método mais viável e que possibilita acessar todas as riquezas de informações dos microrganismos, contribuindo para que os cientistas entendam a ecologia microbiana e o potencial biotecnológico. Além disso, a metagenômica é uma análise considerada funcional e taxonômica de genomas microbianos coletivos contidos em amostras de solos, água, entre outros. Seu processo é combinar estatisticamente análises em separado e análise genômica, a fim de obter um resultado mais abrangente do material genético de um organismo, a partir de um DNA ambiental. (FERREIRA, 2014)

Segundo LEPSCH (2010, p. 11), os homens primitivos enxergavam o solo como meio de locomoção, crescimento de vegetais e frutos, barro para construção de objetos e pigmentos para pinturas rupestres. As classificações dos solos eram baseadas nos que forneciam melhores frutos e nos que forneciam matéria-prima para as pinturas rupestres e confecção de objetos. Porém, com o passar dos anos, os humanos começaram a se fixar em alguns territórios, e desta maneira iniciou-se o cultivo de plantas para obter alimentos. Desse modo, cada vez mais foi aumentando o interesse pela agricultura, e por consequência o conhecimento do solo.

Com o aumento do interesse por entender melhor os solos, foi criada um ramo da ciência a “pedologia”, o que permite determinar que o solo é um corpo dinâmico e organizado. Por causa dessa conclusão, ele criou mais um ramo da ciência, a “pedogênese”, a qual permite estudar a formação dos solos. Enquanto haviam estudos sobre a formação do solo, em contrapartida haviam estudos sobre a origem das espécies biológicas. Com isso, foi possível fazer algumas correlações sobre a influência dos organismos na formação dos solos. (LEPSCH, 2010; p.16)

Segundo FERREIRA (2014), os microrganismos foram os primeiros seres a colonizarem a Terra, e com o tempo se tornaram o grupo abundante e diversificado de organismos, os quais habitavam praticamente todos os tipos de ambientes, inclusive os que extrapolam o limite de sobrevivência de animais e plantas. Diante disso, sabe-se que há um número muito grande de microrganismos na Terra, em torno de $4-5 \times 10^{30}$ células no solo, porém fica difícil determinar todos porque existem alguns limitantes como os métodos tradicionalmente utilizados para isolamento e cultivo de microrganismos em laboratório, devido aos meios e condições de cultivo, as quais são incompatíveis com o ambiente natural. Além disso, outro fator limitante é não ter um material completo de referência de taxonomia disponível que permita identificar todos os tipos de microrganismos encontrados no solo.

Levando em consideração todas as dificuldades para estudar as interações solo-microrganismos, muitas análises foram sendo desenvolvidas, a fim de tentar minimizar todos os fatores limitantes. Com isso, a pedogênese; análises de macro e micronutrientes, metagenômica foram ganhando destaque, e assim permitir correlacionar todos os dados e compreender todas as interações no solo. E para isso ter uma correlação primeiro é necessário avaliar as características dos solos, e depois realizar as outras análises, e assim conseguir construir uma linha de raciocínio e obter um resultado que corrobore para interpretar as interações solo- microrganismos.

No Brasil há vários tipos de solos, de acordo com o SISTEMA BRASILEIRO DE CLASSIFICAÇÃO DE SOLOS (Embrapa, 2006), sendo que cada um tem uma característica, a qual determina qual é a melhor cultivar a ser plantada, buscando sempre o melhor desempenho e produtividade. Os tipos de solos são argissolos, cambissolos, chernossolos, espodossolos, gleissolos, latossolos, luvisolos, neossolos, nitossolos, organossolos, planossolos, plintossolos, vertissolos, entretanto todos esses grupos podem ser fracionados em subgrupos.

Levando-se em consideração a classificação de solos existe uma ferramenta que se chama Triângulo Textural de Solo, a qual é utilizada para interpretar a análise textural de solo, a qual raramente sofrerá modificação quando comparada as análises químicas. Essa ferramenta permite relacionar a textura com a macro e microporosidade., visto que a macroporosidade refere-se a drenagem de água no solo e a micro refere-se ao armazenamento de água no solo. Além disso, a textura da solo influencia as características químicas do solo como teor de matéria orgânica e sua taxa de decomposição, capacidade de armazenamento de nutrientes e resistência à mudança de pH. Outra particularidade da análise de textura do solo está relacionada a classificação pedogênica, visto que a relação de argila e silte fornece uma estimativa do grau de transformação dos constituintes minerais de um solo. (Oliveira, 2011)

De acordo com OLIVEIRA *et al.* (2007), a grande maioria dos solos brasileiros tem caráter ácido, o que resulta em baixa concentração de cálcio, magnésio e potássio. A falta de cálcio juntamente com alto teor de alumínio prejudica o crescimento do sistema radicular e isto leva a um comprometimento da cana como um todo.

Diante da disponibilidade de nutrientes, um importante é o nitrogênio (N), o qual está intimamente ligado a nutrição e fisiologia da planta. Isso deve-se ao fato desse elemento ser constituinte das proteínas e ácidos nucléicos, sendo ele e o potássio (P), absorvidos em maiores quantidades pela cana. Outra característica do N é propiciar a longevidade das folhas, o que acarreta alta absorção de gás carbônico, gerando acúmulo de

massa seca. Além disso, a absorção do N está ligada a disponibilidade do fósforo (P), ou seja, plantas com alto teor de fósforo, apresentam absorção praticamente constante de N; já plantas com deficiência de P não conseguem absorver N. (OLIVEIRA *et al.* 2007)

Segundo JACOBY *et al.* (2017), três mecanismos evidenciam a importância da microbiota do solo, no desenvolvimento da planta. Os três mecanismos são sinalização hormonal; cepas microbianas patogênicas repelentes e aumentar a biodisponibilidade de nutrientes transmitidos pelo solo. Levando em consideração o terceiro mecanismo, alguns microrganismos são capazes de metabolizar alguns nutrientes, os quais se apresentam vinculados a moléculas orgânicas, e desta maneira torna-os biodisponíveis. Por isso, é importante que a microbiota do solo esteja equilibrada para que nenhuma etapa do desenvolvimento da planta seja afetada, já que os nutrientes que precisam sofrer metabolização são N, P e S, e estes estão intimamente ligados a processos essenciais ao crescimento da planta. Por isso, é de extrema importância entender como os microrganismos, presentes no solo, interferem na performance do cultivar, e se há algum mecanismo que possibilite desenvolver mais um órgão, a ponto de atingir um objetivo mais rapidamente. Tudo isso é capaz através do sequenciamento da metagenômica do solo, que nos permite verificar quais são as comunidades de bactérias estão presentes em cada tipo de solo, e com isso pode-se determinar qual é o melhor ambiente de cultivo de acordo com seus objetivos.

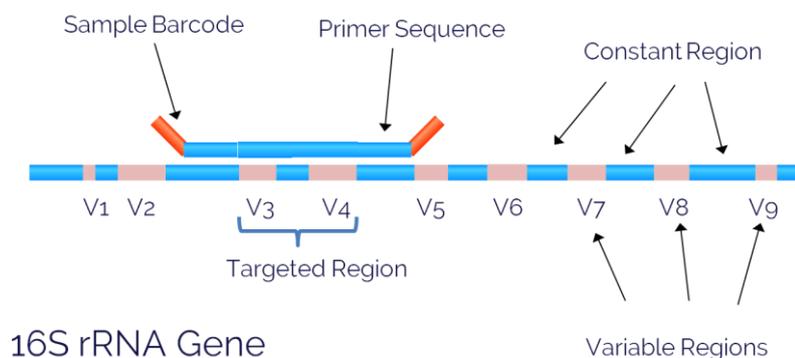
Levando em consideração a microbiota do solo, mais que 99% dos microrganismos não podem ser cultivados em laboratório, o que não permite estudos exploratórios sobre eles. Por isso, estudos baseados em análises diretas da diversidade de bactérias no meio ambiente, permitiram mostrar uma diversidade rica de organismos não cultiváveis e estudados em laboratório. E para conseguir realizar as análises diretas foi necessário entender as limitações de cada cultura, o que propiciou o desenvolvimento de muitas tecnologias. Diante disso, surgiu a metagenômica que é considerada o método mais viável e que possibilitar acessar todas as riquezas de informações dos microrganismos, contribuindo para que os cientistas entendam a ecologia microbiana e o potencial biotecnológico. Além disso, a metagenômica é uma análise considerada funcional e taxonômica de genomas microbianos coletivos contidos em amostras de solos, água, entre outros. Seu processo é combinar estatisticamente análises em separado e análise genômica, a fim de obter um resultado mais abrangente do material genético de um organismo, a partir de um DNA ambiental. (FERREIRA, 2014)

Uma das ferramentas para análise de metagenômica é a plataforma de sequenciamento Illumina, a qual tem a capacidade de produzir milhões de leituras curtas, em

apenas uma única corrida. Por ser uma plataforma com uma capacidade profunda e baixo custo, é utilizada para sequenciamento de genoma completo, perfil de comunidades microbianas e sequenciamento de regiões do gene 16S rRNA. Além disso, essa plataforma pode gerar um aumento exponencial na taxa de erros ao longo das leituras e pode gerar leituras de par a par, sendo que essas leituras par a par correspondentes podem ser mescladas em um fragmento. Essa peculiaridade permite correção de erros de sequenciamento e uma maior qualidade na produção de sequências. (ZHAHG *et al.* 2014)

O estudo metagenômico é normalmente realizado através do sequenciamento do gene 16s r RNA, à qual é formada por 9 regiões sendo conservadas e não conservadas, como pode ser observada na Figura , porém o estudo é focado nas regiões V3 e V4. A partir do delineamento dessas regiões, é realizado PCR para amplificar região de 460pb, utilizando iniciadores para as regiões específicas V3 e V4. A partir disso, os produtos gerados foram aplicados para a construção da biblioteca metagenômica, e todo esse sequenciamento seguiu o protocolo da plataforma Illumina MiSeq. (ZHAHG *et al.* 2014)

Figura 1 - Gene 16S RNAr



Fonte: <http://www.lcsclences.com/discovery/applications/genomics/16s-rrna-gene-sequencing-landing/16s-gene/>

O sequenciamento gera muitos dados biológicos, muitas vezes complexo, e para conseguir compreender melhor o resultado é necessário utilizar ferramentas de bioinformática.

Uma das ferramentas de bioinformática para compreender se o sequenciamento foi representativo diante das amostras é a análise de rarefação. Essa análise baseia-se em uma curva cumulativa que contrasta o número acumulado de tipos observados pelo número de indivíduos amostrados. Com isso, as curvas eventualmente alcançariam uma reta, ou seja, o

chamado platô, o qual determinaria a riqueza da comunidade, permitindo assim a análise da diversidade de uma comunidade. (PEIXOTO, 2013)

De acordo com PEIXOTO (2013), a análise de rarefação permite a comparação da riqueza biológica observada entre as amostras desiguais de um mesmo habitat.

Outra ferramenta de bioinformática é a análise de PCA, a qual segundo VASCONCELOS (2017), é utilizada quando uma representação gráfica não é possível, sendo assim considerada um método estatístico de múltiplas variáveis, permitindo a identificação das relações entre as características extraídas dos dados.

No caso deste trabalho, o banco de dados utilizado para construir as OTUs foi o SILVA. Esse banco de dados contém um conjunto muito rico de informações, as quais estão associadas à sequência. Essas informações incluem classificações taxonômicas em vários níveis de taxonomia, alinhamento de múltiplas sequências, de modo a obter a mais recente nomenclatura válida. (QUAST *et al.* 2012)

De acordo com QUAST *et al.* (2012) as sequências analisadas são verificadas de acordo com a qualidade, e os dados correspondentes são disponibilizados via arquivos ARB, em formato FASTA, e os valores separador por vírgula. Isso permite que o resultado possa ser acessado diretamente pelo site da SILVA. A exportação desses arquivos facilita a integração do SILVA como fonte de dados de referência em análises de sequenciamento de próxima geração (NGS), MOTHUR, QIIME ou MG-RAST. Outra peculiaridade desse banco de dados é que ele funciona como lançamento, ou seja, cada lançamento recebe uma numeração e isso depende da liberação do EMBL-Bank, do qual os dados da sequência são extraídos, e isto fica permanentemente disponível para download no site da SILVA. Essa liberação de dados é estruturada em dois conjuntos referindo-se a dois genes, sendo SILVA Pacr (banco de dados SILVA inteiros para o respectivo gene) e SILVA Ref (subconjunto do Parc referindo-se apenas as sequências quase completas de alta qualidade).

O bando de dados SILVA é a base para construção de OTUs, as quais referem-se a uma análise de agrupamento. Segundo BRAUN (2008), as OTUs servem para permitir a construção de uma árvore filogenética, a qual consiste em estimar as relações de ancestralidade para um determinado número de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs), sejam populações, famílias, gêneros ou espécies, podendo basear-se em caracteres morfológicos, funcionais ou moleculares. Isso permite representar a história evolutiva das OTUs dessa árvore filogenética.

2. OBJETIVO

- Realizar a metagenômica de três tipos de solo
- Realizar Sequenciamento Illumina, baseado na análise das regiões V3 e V4 do gene 16S rRNA
- Correlacionar as análises de macro e micronutrientes, análise textural e Metagenômica
- Obter Diversidade Bacteriana nos solos, e verificar se há alguma similaridade entre eles.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Escolha das amostras de solo

O CTC possui uma área de cultivo grande, o que permitiu escolher talhões (áreas demarcadas de plantação), os quais possuem plantação de cana-de-açúcar, referentes a variedade CTC15, bem distantes para ter um resultado mais consistente, além disso poder comparar melhor os resultados pelo fato de apresentarem a mesma variedade plantada.

Abaixo, Figura 1, há a representação por satélite mostrando a localização de cada talhão coletado (17,103 e 224), mostrando a localização de cada um. Em contrapartida, o talhão 17 apresentava cana com tamanho baixo; 103 sem cana e 224 com cana alta.

Figura 2 - Mapa de satélite com a marcação dos três talhões, no CTC



Fonte: GOOGLE EARTH

3.2. Coleta das amostras de solo

As amostras foram coletadas na cidade de Piracicaba – São Paulos, no Centro de Tecnologia Canavieira (CTC).

A coleta foi realizada utilizando-se um trado, o qual perfurou o solo em 30cm, a partir da base, como pode ser verificado na Figura 3. Posteriormente a coleta, as amostras de cada ponto foram armazenadas em saco plástico, devidamente identificado com o número do talhão e do ponto de coleta (1, 2, 3 e 4 – extremidades; 5 – central), e transportadas via terrestre. Após isso, retirou-se uma alíquota para realizar os ensaios e o restante das amostras foram armazenadas em freezer -80°C.

Figura 3 - Coleta das amostras de solo



a) perfurando o solo com o trado a 30cm de altura b) dispensando o solo em um recipiente para homogeneizar

As coletas das amostras de solo foram realizadas em 3 locais diferentes (solos diferentes) e para melhor representatividade foi utilizado um GPS para marcar as coordenadas de cada ponto, representados nas Figuras 4,5 e 6. Além disso, para cada talhão (local delimitado por um número e relacionado a um tipo de solo) foram coletados 5 pontos, representado na Tabela 1, respectivamente.

Figura 4 - Imagem de satélite do talhão 17 com os 5 pontos de coleta



Figura 5 - Imagem de satélite do talhão 103 com os 5 pontos de coleta

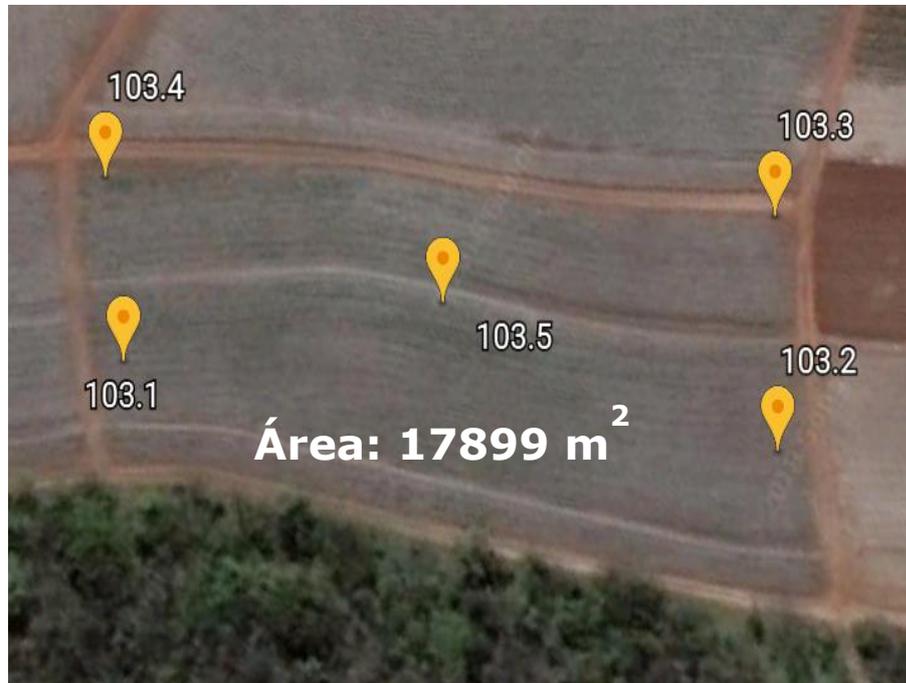


Figura 6 - Imagem de satélite do talhão 224 com os 5 pontos de coleta



Tabela 1 - Denominação dos pontos dos talhões de acordo com as coordenadas geográfica

Talhão	Pontos	Coordernadas	Localização	Tipo de solo
17	1	S 22°41'43.3" W 47°33'27.4"	extremidade	Latossolo vermelho amarelo
	2	S 22°41'43.3" W 47°33'27.5"	extremidade	
	3	S 22°41'43.2" W 47°33'28.3"	extremidade	
	4	S 22°41'43.2" W 47°33'28.4"	extremidade	
	5	S 22°41'43.2" W 47°33'27.9"	centro	
103	1	S 22°42'31.0" W 47°33'45.7"	extremidade	Nitossolo Háplico
	2	S 22°42'36.4" W 47°33'42.7"	extremidade	
	3	S 22°42'35.4" W 47°33'41.0"	extremidade	
	4	S 22°42'30" W 47°33'44.5"	extremidade	
	5	S 22°42'33.2" W 47°33'43.5"	centro	
224	1	S 22°41'16.5" W 47°33'08.3"	extremidade	Argisolo vermelho-amarelo
	2	S 22°41'23" W 47°33'15.2"	extremidade	
	3	S 22°41'21.9" W 47°33'09.1"	extremidade	
	4	S 22°41'25.1" W 47°33'15.3"	extremidade	
	5	S 22°41'23.4" W 47°33'11.3"	centro	

3.3. Processamento das amostras

Após a coleta dos 5 pontos, fez uma mistura de todos, em um único tubo, e realizou-se análises físico-química (macro e micronutrientes e nitrogênio), através da empresa Pirasolo-Piracicaba. As amostras, acondicionadas em freezer à -80°C, foram transportadas em isopor com gelo.

A extração de DNA foi realizada seguindo as informações do fabricante, através da metodologia do protocolo **“PowerSoil DNA Isolation Kit”** (AFONSO, 2016). Esse Kit é composto por 6 soluções, as quais são denominadas C1 à C6, além de filtros e tubos de 2mL.

Composição do Kit:

- C1: contém um detergente SDS e alguns agentes de ruptura, os quais são utilizados para lizar as células das amostras, a fim de obter o DNA.
- C2: contém reagentes que auxiliam na precipitação de partículas que não se referem ao DNA, a fim de obter um DNA puro.
- C3: composição similar a C2, porém com um reagente adicional, o qual auxilia na precipitação de partículas que não se referem ao DNA, a fim de obter um DNA puro.

- C4: solução com alta concentração de sal, a qual será utilizar para remover qualquer partícula que ainda esteja na solução, permitindo que apenas o DNA seja aderido ao filtro.
- C5: solução de etanol para realizar a lavagem, e desta maneira passe pelo filtro todas as partículas que não são DNA.
- C6: solução de eluição de DNA.

No tubo de extração, contendo micropartículas, foram adicionados 0,25g de amostra de solo e agitou. Posteriormente, foram adicionados 60 μL da solução C1, homogeneizou-se e centrifugou os tubos por 1 minutos a 4.000rpm. Transferiu-se 500 μL do sobrenadante para um tubo limpo de 2mL e adicionou-se 250 μL da solução C2 e foram agitados por 5 segundos. As amostras foram incubadas a 4°C por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 4.000rpm e transferiu-se 600 μL do sobrenadante para um novo tubo de 2mL. Após isso, foram adicionados 200 μL da solução C3 e agitou-se rapidamente. As amostras foram incubadas, novamente, a 4°C por 5 minutos. Realizou-se uma nova transferência de 750 μL do sobrenadante para um tubo limpo de 2mL, e foram adicionados 1200 μL da solução C4 e homogeneizou-se por 5 segundos. Ao final dessa etapa, foram aliquoteados 650 μL da solução C4, no tubo filtro “Spin Filter” e centrifugou-se por 1 minuto a 4.000rpm (etapa repetida 2 vezes). Adicionou-se 500 μL da solução C5 e centrifugou-se por 30 segundo a 4.000rpm. Posterior a isso, descartou-se o sobrenadante e centrifugou por 1 minuto a 4.000rpm, e colocou-se o filtro em um novo tubo de 2mL. Foram adicionados 100 μL da solução C6 no centro do filtro e centrifugou-se por 30 segundos a 4.000rpm. Após essa etapa, descartou-se o filtro, e eluiu-se o DNA em 100 μL de água Milli-Q autoclavada.

Figura 7 - Amostras nos tubos de extração: solos 17 x 103 x 224



3.4. Quantificação e concentração das amostras

As amostras foram quantificadas utilizando o equipamento *Quibt*, o que mostrou um baixo rendimento em $\text{ng}/\mu\text{L}$. Diante disso, foi realizada uma nova extração, utilizando o mesmo protocolo citado acima, em duplicada para cada amostra, e realizou-se uma nova quantificação, o que mostrou que ainda o rendimento foi baixo. Posteriormente a essas etapas, a alternativa foi realizar a concentração das amostras no equipamento *Speed Vac* até atingir a concentração necessária ($5\text{ng}/\mu\text{L}$) em um volume final de $25\ \mu\text{L}$, para realizar o protocolo de sequenciamento *Illumina*,

O processo de concentração das amostras foi realizado utilizando 15 tubos, em triplicata de cada amostra, e cada um contendo em torno de $90\ \mu\text{L}$. Esses tubos foram colocados no equipamento *Speed Vac* à 45°C por 30 minutos. Os 30 minutos foram fracionados em intervalos menores de tempo sendo 5 minutos para os 45 tubos, e posteriormente ao término desse tempo juntou-se as três réplicas, em um único tubo, e deixou-se por mais 10 minutos. Conferiu-se o volume, o qual deveria ser de $25\ \mu\text{L}$, e deixou-se por mais 5 minutos. Ao final desse tempo, verificou-se que algumas amostras já tinham o volume desejado (17.5 e 103.4), e diante disso, estas duas amostras não participaram das etapas seguintes. As amostras restantes foram colocadas novamente no equipamento *Speed Vac* e permaneceram por mais 5 minutos a 45°C . Verificou-se novamente o volume dos

tubos, e apenas as amostras do talhão 224 não tinham atingido o volume final de 25 μL . Portanto, as amostras do talhão 224 permaneceram por mais 5 minutos no Speed Vac a 45°C, e desta forma foi obter o volume final desejado.

Durante o término de cada etapa, foi verificado o volume, a fim de obter um final de 25 μL para conseguir obter uma concentração em torno de 5ng/ μL , e uma nova quantificação foi realizada, como pode ser observado na tabela 2.

Tabela 2 - Quantificação das amostras de acordo com os talhões

Amostras	Concentração (ng/ μL)	Amostras	Concentração (ng/ μL)	Amostras	Concentração (ng/ μL)
17.1	6,1	103.1	1,7	224.1	9,3
17.2	6,6	103.2	4,4	224.2	5,1
17.3	5,8	103.3	7,7	224.3	7,2
17.4	4,8	103.4	10,1	224.4	6,2
17.5	7,3	103.5	4,8	224.5	6,3

3.5. Sequenciamento das amostras

As amostras de DNA extraídas, congeladas a temperatura de -80°C, foram enviadas a empresa DNA Consult, em São Carlos, em isopor com blocos de gelo, para realizar o procedimento de Sequenciamento Illumina 16s, e a partir dos dados gerados, conseguir identificar as comunidades de bactérias presentes nos diferentes solos.

A montagem da biblioteca 16S baseia-se em conter as sequências dos iniciadores correspondentes as regiões V3 e V4 do gene 16s rRNA criando um amplicon de aproximadamente 460pb. (Fernandes, 2015)

As sequências dos primers Forward e Reverse, sentido 5', correspondem aos fragmentos abaixo:

Tabela 3 - Sequência dos Primers de Amplificação

Primers de Amplificação	Sentido 5' → 3'
16S Amplicon PCR Forward	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG
16S Amplicon PCR Reverse	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

Além dos primers de amplificação, o protocolo contém com as sequências dos adaptadores correspondem aos fragmentos abaixo:

Tabela 4 - Sequência dos Primers dos adaptadores

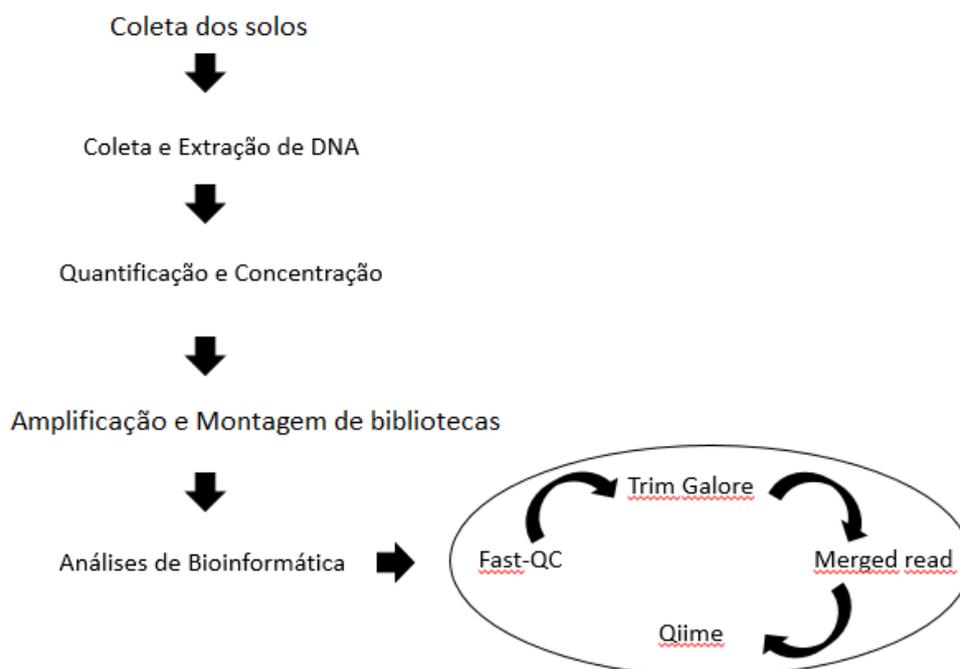
Primers dos adaptadores	Sentido 5' → 3'
Forward overhang	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG
Reverse overhang	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG

Após as reações de PCR (Reação em cadeia de polimerase), há o preparo da biblioteca MiSeq, específica as regiões V3 e V4 amplificadas e posteriormente realiza-se o sequenciamento no MiSeq, o qual faz leituras de 300pb nas direções sense e antisense, de forma a ser realizada sobreposição entre as leituras para poder ter uma maior qualidade do sequenciamento e um resultado que represente os 460bp de forma completa. O resultado desse sequenciamento é de aproximadamente 20 milhões de leituras, sendo que a cada 96 amostras podem gerar acima de 100.000 leituras por amostra, sendo assim, considerado satisfatório para uma pesquisa.

3.6. Análise de Bioinformática

As análises de Bioinformática foram realizadas pelo bioinformata Marcelo Carazzolle, o qual é pesquisador no Laboratório de Genômica e Expressão, no Instituto de Biologia nas dependências da UNICAMP-SP, e isso está representado na Figura 8.

Figura 8 - Fluxograma do trabalho para as análises de Bioinformática



De acordo com ZHANG (2014), as ferramentas de bioinformática utilizadas referem-se ao software PEAR, e posterior ao seu resultado são realizadas análises filogenéticas e atribuições taxonômicas através do pacote QIIME.

Para que se obtenha uma sequência de qualidade, através das ferramentas de bioinformática é necessário que as sequências geradas passem por uma verificação de qualidade, para que posteriormente possam sofrer alinhamento ou montagem. Essa verificação de qualidade é realizada pelo software FASTQC, o qual gera um relatório no qual as sequências são classificadas como boas, ruins ou intermediárias. (Gene Codes Corporation, 2017)

Posterior a análise de qualidade das sequências utiliza-se outra ferramenta de bioinformática chamada “Trim Galore”, a qual realiza a remoção de bases de baixa qualidade, adaptadores, primers, INDEX (barcoding) que estão relacionadas as regiões V3 e V4. (BABRAHAM BIOINFORMATICS, 2017)

Após o tratamento das sequências, utiliza-se o software PEAR, o qual é capaz de fazer o registro de todas as sobreposições de leituras para cada par de correspondentes, a fim de determinar o valor maior. Posteriormente, realiza um teste estatístico para avaliar os dados obtidos das leituras das regiões mescladas, e se caso o comprimento de sobreposição

for menor que o limite definido pelo usuário, não ocorrerá a mescla do par de leituras. Porém, se o tamanho estiver correto, o PEAR retorna o fragmento mesclado com correção de erros usando os parâmetros de qualidade da Illumina. (ZHANG, 2014)

E por fim, utiliza-se o QIIME, o qual permite a construção de UNIDADES TAXÔNICAS OPERACIONAIS (OTUs) baseando sua taxonomia em um banco de dados. (KOBERT, 2014)

As análises foram realizadas baseando nas regiões V3 e V4, a qual tem aproximadamente 460pb.

O sequenciamento gera dois dados, sendo denominados R1 (sense) e R2 (antisense), os quais referem-se as amplificações, sendo que R1 e R2 geram amplicons de 300pb, visto que o sequenciamento Illumina gera reads desse tamanho, levando-se em consideração o kit utilizado. Num protocolo padrão, a análise de qualidade do R1 e R2 é realizada pelo software Fast-QC. O programa Fast-QC fornecerá o valor do Q score ou Phred score, o qual tem como escala os seguintes valores apresentados na tabela 5.

Tabela 5 - Valor Q Score ou Phred Score

Valor Q Score	Descrição
10	1 base errada a cada 10
20	1 base errada a cada 100
30	1 base errada a cada 1000
40	1 base errada a cada 10.000

Posteriormente a análise da qualidade do sequenciamento (Fast-QC), utiliza-se um programa que se chama Trim Galore, o qual tem por finalidade eliminar restos de adaptadores, primers, barcoding (index) que foram utilizados nas reações do sequenciamento. Essa trimagem é baseada na região V3 e V4, e tudo o que não está relacionada a elas é descartado.

Após essas etapas, utiliza-se o software Pear, o qual irá criar uma sobreposição representando a região V3 e V4. Se houver similaridade entre R1 (sense) e R2 (antisense), cria-se um “novo” read representante, o qual é denominado merged reads ou overlapped reads. Posteriormente, verifica-se o número de reads por biblioteca e analisa-se a distribuição de tamanho. Essa distribuição de tamanho deve ser avaliada e escolhe-se um tamanho que

contemplem a maior parte dos merged reads, e este será determinado para todos. Todas essas etapas citadas acima são necessárias para preparar os reads.

Após o preparo dos reads, utiliza-se o programa Qiime que irá realiza a análise taxônomica, baseando-se em um dos bancos de bactérias, que neste caso é o banco de dados Silva (bactéria 16S). Esse programa realiza o agrupamento de todas as amostras de acordo com a similaridade, de forma a criar as OTU's, sendo que o critério para gerar uma OTU foi de 97% de identidade. A partir da criação das OTU's alinha-se os representativos de cada OTU com o banco de dados Silva, a fim de verificar a espécie ou família de bactéria.

4. RESULTADOS

4.1. Análises do solo

Tabela 6 - Análise do solo: pH x M.O (matéria orgânica) x CTC (troca de cátions) x V% x N (nitrogênio)

Localidade	pH CaCl2	M.O (g/dm ³)	CTC (mmolc/dm ³)	Sat. bases (V%)	N (mg/Kg)
Talhão 17	5,1	18	73	53	1050
Talhão 103	5,4	11	84	60	840
Talhão 224	4,2	5	57	26	630

Tabela 7 - Análise Física do Solo

Localidade	Argila (g/Kg)	Silte (g/Kg)	Areia Total (g/Kg)	Areia Grossa (g/Kg)	Areia Fina (g/Kg)
	<0,002mm	0,053-0,002mm		2,00-0,210mm	0,210-0,053mm
Talhão 17	481	139	380	190	190
Talhão 103	528	202	270	130	140
Talhão 224	411	59	530	270	260

De acordo com o SISTEMA BRASILEIRO DE CLASSIFICAÇÃO DE SOLOS (SiBCS) (Embrapa, 2006), há várias denominações, as quais podem sofrer subdenominações. Diante disso, neste trabalho os solos, em questão, são argissolo e franco-argilo-arenoso, de acordo com a classificação do triângulo textural de solo, Figura 9. Porém, quando classificado com o mapa de solo do CTC têm-se latossolo, argissolo e nitossolo, tabela 1.

Levando em consideração as características de cada solo, de acordo com o SiBCS, segue abaixo as denominações:

Argissolo: - solo composto por material mineral com argila;

- apresentam profundidade variável;
- cores avermelhadas ou amareladas;
- forte a moderadamente ácidos.

Latossolo: - solos composto por material mineral;

- solos fortemente ácidos;
- baixa saturação por bases;
- apresentam alta profundidade;
- encontrados em regiões secas, semi-áridas ou não;
- cores avermelhadas, amareladas, acinzentadas.

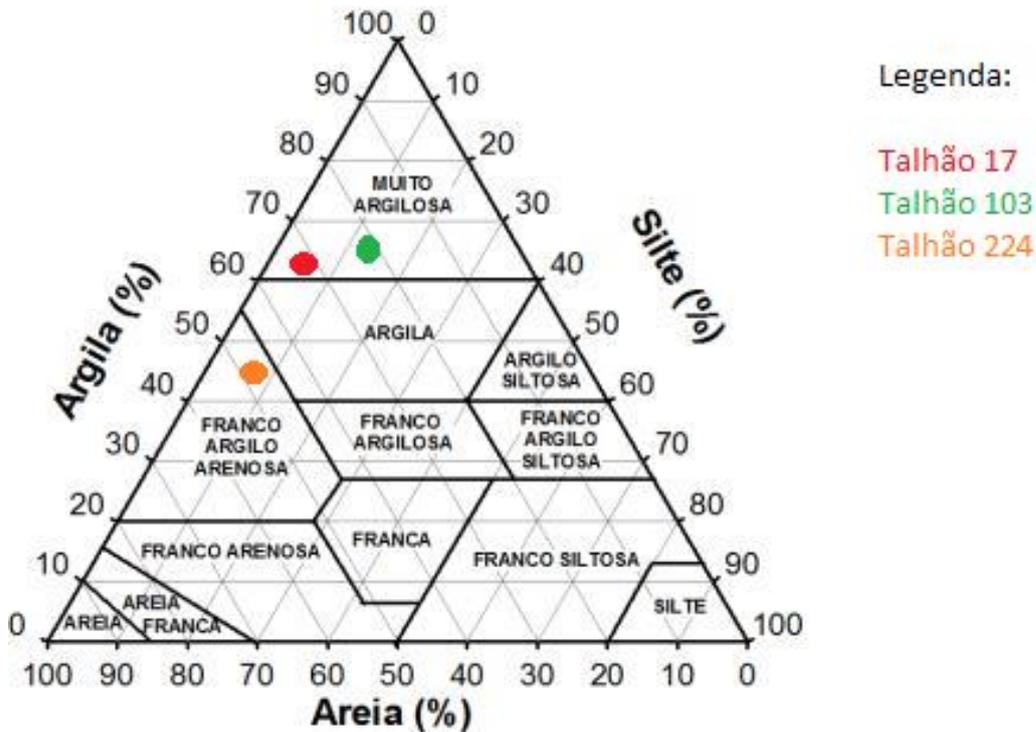
Nitossolo: - solos compostos por material mineral;

- textura argilosa ou muito argilosa;
- são profundos e bem drenados;
- cores vermelho a brunadas;
- moderadamente ácidos
- apresenta argila em uma de suas camadas.

Diante das classificações do SiBCS e mapa de solo do CTC, os talhões apresentam características parecidas, em ambas, apesar de serem classificados com nomes distintos. Isso pode estar relacionado ao fato de que o solo sofre manejo constante, e isto modifica as concentrações dos macros e micronutrientes.

Analisando-se os valores da Tabela 7, é possível determinar em qual região do triângulo textural de solo, Figura 9, os talhões estão localizados. E de acordo com a Figura 9, o solo dos talhões 17 e 103 são classificados como argilosos, entretanto o talhão 224 é franco-argilo-arenoso. Isso implica em dizer que o solo dos talhões 17 e 103 são similares, o que explica ambos apresentarem valores muito próximos na análise apresentada na Tabela 6.

Figura 9 - Triângulo textural de solo



Fonte: (<http://www.ebah.com.br/relatorios-fisica-solo>)

Além disso, analisando a Figura 9, os talhões 17 e 103 que tem característica argilosa apresentam maior micro porosidade, ou seja, retém mais água. E o talhão 224 que é arenoso apresentar maior macro porosidade, e, portanto, é considerado um solo de fácil drenagem.

Outra correlação a ser feita é que solos arenosos tendem a elevar o pH mais facilmente e por isso deve-se ter cautela com a utilização de calagem, pode apresentar lixiviação de nutrientes como nitrogênio e potássio, o que implica em maiores taxas de adubações. Além disso, pode apresentar baixa troca de cátions (CTC) e menor adsorção de fósforo.

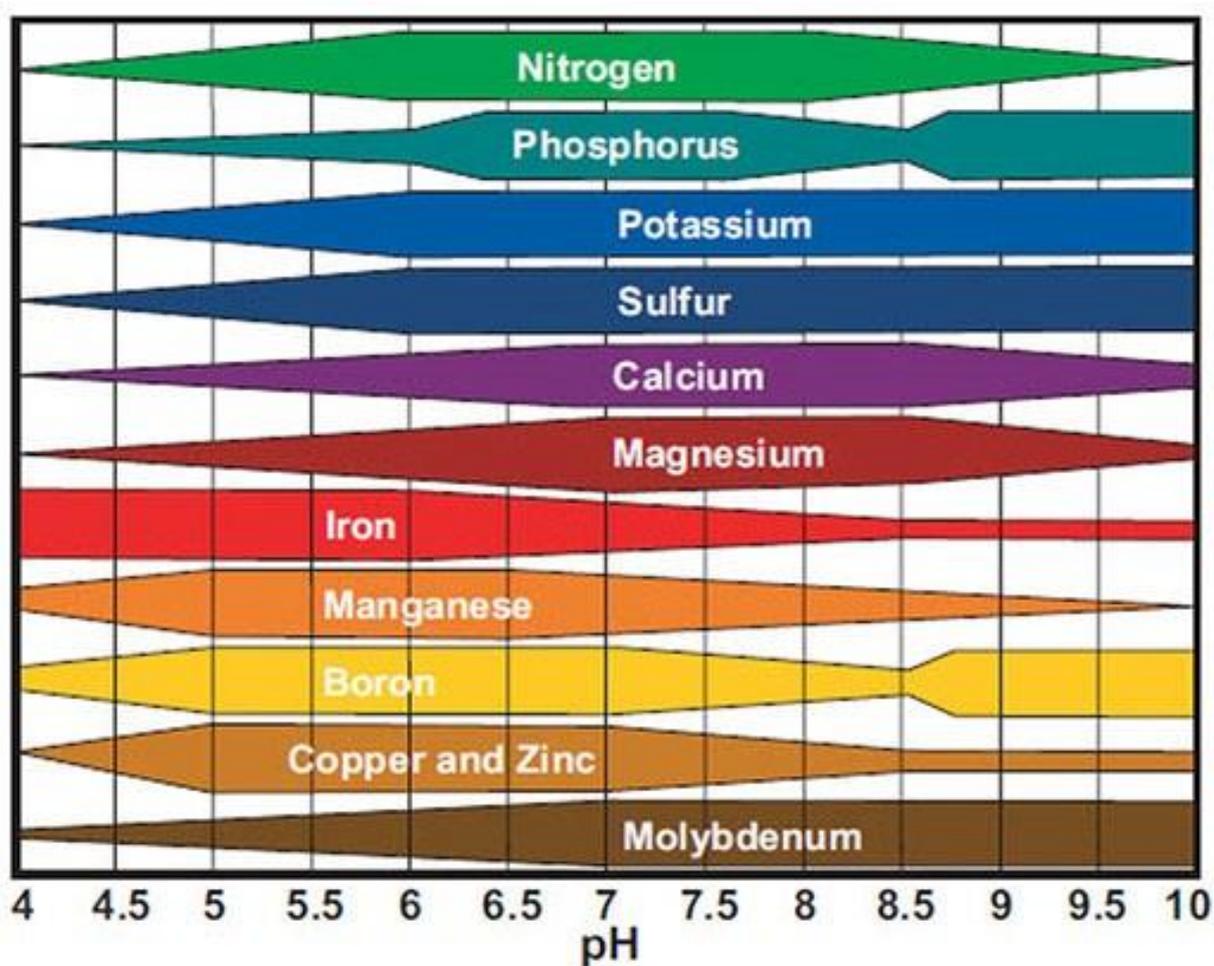
Conforme observa-se na Tabela 6, o talhão 224 apresenta o menor valor quando comparado com o 17 e 103, o que conclui o que foi dito acima, que solos mais arenosos tem baixa troca de cátions (CTC).

Outro fator levado em consideração é a relação silte e argila que auxiliam na classificação pedogênica, ou seja, quanto menor for essa relação mais intemperizado e desenvolvido é o solo. Levando em consideração os valores da Tabela 7, os talhões 17 e 103 apresentaram relação maior quando comparados ao talhão 224, o que indica que os talhões 17 e 103 são menos desenvolvidos e intemperizados. Esse fato pode estar correlacionado com a presença de plantação de cana-de-açúcar no talhão 224.

De acordo com a Tabela 6, os valores que devem-se ter uma maior atenção são pH, matéria orgânica (MO), saturação por bases (V%) e troca de cátions (CTC).

De acordo com o valor do pH do solo, se este for muito ácido, implica em baixa disponibilidade de matéria orgânica, porém se for muito básico isso acarreta um problema de salinização, e isto pode acarretar problemas de cultivo no solo. Além disso, o valor do pH interfere na disponibilidade de nutrientes, o que pode ser observado na Figura 9, abaixo.

Figura 10 - Gráfico de nutrientes em função do pH



De acordo com a Figura 10, pode-se dizer que o melhor pH, seria o que está entre 6,5 e 7, pois é nesse intervalo que há a disponibilidade de todos os nutrientes.

Além disso, levando-se em consideração os valores de pH de cada talhão, apresentados na Tabela 6, pode-se observar que o talhão 17 e 103 apresentam valores próximos (5,1 e 5,4, respectivamente), e diante disso, a disponibilidade de nutrientes entre eles será similar, e estão representados no intervalo de 5 a 5,5 na Figura 10 em que os nutrientes mais deficientes são fósforo, magnésio e molibdênio. Já em relação ao talhão 224, o qual apresentou valor de pH igual a 4,2, este apresenta um déficit enorme em relação aos nutrientes, sendo que apenas o ferro que favorece a fixação de nitrogênio, aparece em uma quantidade considerável.

Além disso, pode-se observar a disponibilidade de nitrogênio, em que nos talhões 17 e 103 há uma presença razoável, em contrapartida no talhão 224 é quase inexistente, de acordo com o pH. A disponibilidade de nitrogênio também pode ser observada na Tabela 6, o que corrobora para o que foi descrito acima, com base no gráfico de nutriente em função do pH, em que o talhão 224 apresenta a menor disponibilidade de nitrogênio no solo. Outra observação a ser feita que colabora para maior fixação de nitrogênio é a concentração de ferro, levando em consideração o pH do solo, e com isso pode-se observar que os solos dos talhões 17 e 103 apresentar maior concentração de ferro em relação ao talhão 224. E isso, explica porque o talhão 224 apresenta menor concentração de nitrogênio no solo, em relação aos outros dois talhões.

Analisando-se a matéria orgânica (MO), baseando nos valores da Tabela 6, os talhões 17 e 103 apresentam valores próximos e maiores que o talhão 224. Isso pode ser explicado pelo fato de que quanto menor o pH, menor a disponibilidade de nutrientes.

De acordo com, De FEDE *et al.* (2001), solos que apresentam elevado teor de MO tem como característica manter mais estável a população microbiana. Em relação aos valores de referência, segundo RAIJ (1997), solos com valores até 15g/dm³ tem textura arenosa; 16 à 30 g/dm³ possui textura média; entre 31-60 g/dm³ tem textura argilosa, e acima de 60g/dm³ é um solo que indica acúmulo de matéria orgânica, o que pode ser explicado pelas condições locais, sendo em geral por drenagem ruim ou uma acidez elevada. Portanto, levando em consideração os valores da tabela 6, o talhão 17 apresenta 18g/dm³; talhão 103 17g/dm³ e o talhão 224 5g/dm³, e com isso podemos classificar os talhões 17 e 103 na categoria de solo com textura média e o talhão 224 como textura arenosa.

Em contrapartida, analisando os valores na Tabela 6, da saturação por bases (V%) pode-se observar que os talhões 17 (53) e 103 (60) também apresentam valores maiores

e mais próximos do que o talhão 224 (26). De acordo com a tabela do IAC-SP (Informação Sobre Interpretação de Análise de Solo), pH acidez alta (4,4-5,0) apresentam V% baixo (26-50), e portanto isso define o talhão 224, entretanto pH acidez média (5,1-5,5) apresentam V% médio (51-70) e com isso definem os talhões 17 e 103. Além disso, podemos dizer que V% maior ou igual a 50% caracteriza um solo eutrófico, ou seja, rico em nutrientes, e isso é explicado porque mais da metade do reservatório do solo (CTC- troca de cátions) armazena os nutrientes.

Em relação a troca de cátions (CTC), quando analisada em $\text{pH} = 7$, pode-se classificar os solos como ácrico e não ácrico. Se for ácrico, significa que tem baixa CTC, porém se for não ácrico tem média ou alta CTC. Porém, neste trabalho foi utilizado o cálculo do CTC efetivo (t), ou seja, calculados pela soma de bases. Observando esses valores na Tabela 6, os talhões 17 (73) e 103 (84) apresentam valores próximos e maiores quando comparados com o talhão 224 (57). De acordo como os dados do site “Plante Certo – Laboratório Agropecuário”, o talhão 17 e 224 apresentam uma CTC boa; o talhão 103 apresenta uma CTC muito boa. Portanto, o talhão 103 armazena maior quantidade de macronutrientes, possibilitando assim maior disponibilidade dos nutrientes que precisam sofrer conversão para serem absorvidos pelas plantas.

4.2. Análises de Bioinformática

4.2.3. Análises de Qualidade

Tabela 8 - Análise de Qualidade (Trimagem)

Identificação das amostras	Número de reads
17.1	125853
17.2	130735
17.3	99393
17.4	87006
17.5	263542
103.1	85738
103.2	97532
103.3	56549
103.4	100957
103.5	95835
224.1	92357
224.2	106025
224.3	87859
224.4	93730
224.5	106259

A Tabela 8 foi criada a partir da análise de qualidade do sequenciamento, em que posteriormente a isso eliminou restos de adaptadores, primers, barcoding, e desta forma limpou-se todas as sequências deixando apenas o que está relacionando a região V3 e V4.

Tabela 9 - Merged reads

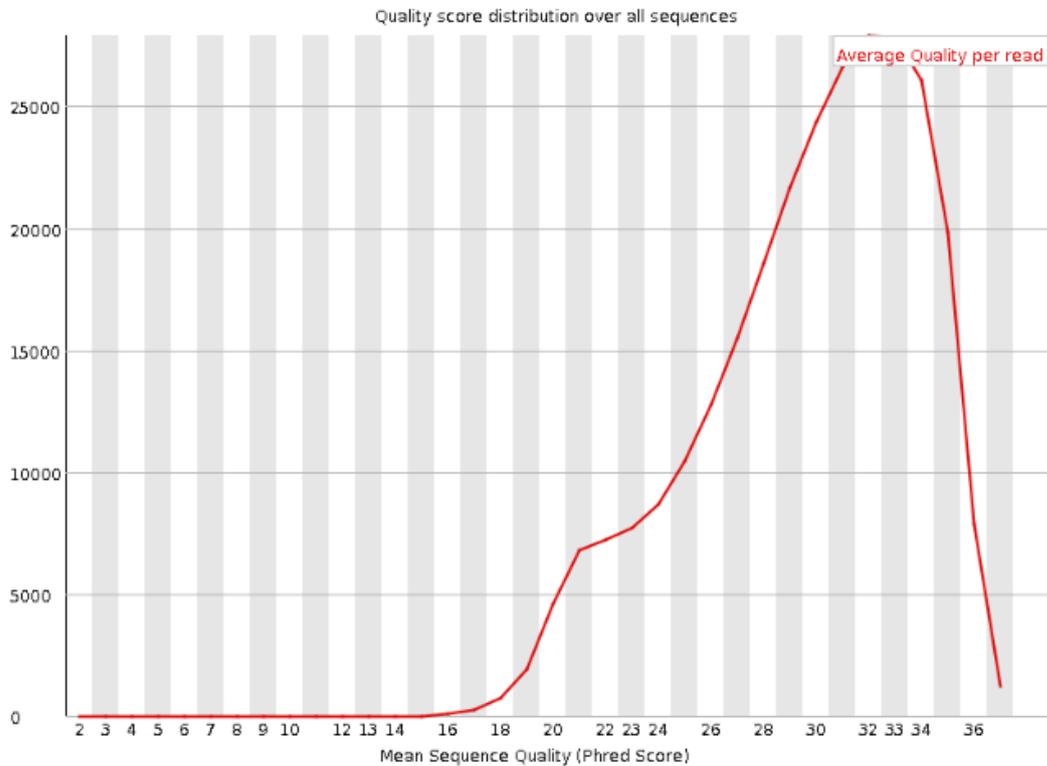
Identificação das amostras	% Similaridade R1 e R2
17.1	15,444 / 273,967 (5.637%)
17.2	14,438 / 271,114 (5.325%)
17.3	11,572 / 202,001 (5.729%)
17.4	10,961 / 183,791 (5.964%)
17.5	34,067 / 534,950 (6.368%)
103.1	10,506 / 192,876 (5.447%)
103.2	12,820 / 217,423 (5.896%)
103.3	7,756 / 154,968 (5.005%)
103.4	12,192 / 205,465 (5.934%)

103.5	11,606 / 223,798 (5.186%)
224.1	14,231 / 237,078 (6.000%)
224.2	15,101 / 245,127 (6.160%)
224.3	13,947 / 201,795 (6.911%)
224.4	13,177 / 205,780 (6.403%)
224.5	15,964 / 223,564 (7.141%)

A Tabela 9 está relacionada com a verificação da sobreposição, representando a região V3 e V4, de R1 (sense) e R2 (antisense), em que se há similaridade cria-se um novo read , o qual denomina-se merged reads. Neste caso, pode-se observar que os valores de similaridade ficaram em torno de 5-7%, o que é considerado ruim porque os valores esperados teriam que estar em torno de 90-100%.

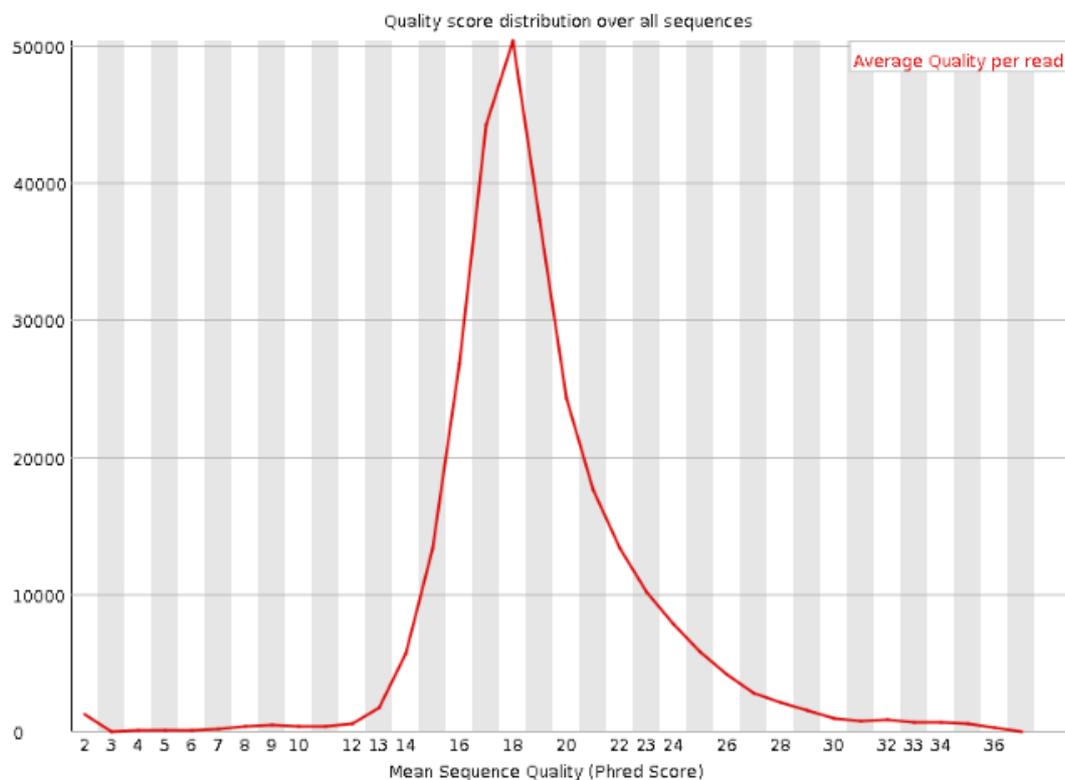
4.2.4. Análise de Q-Score

Figura 11 - Gráfico referente ao R1 (sense)



A figura 1ª está representando o gráfico de análise de qualidade das sequências em relação ao R1 (sense), a qual é baseada nos valores da Tabela 5 (Q-Score). Portanto, as sequências analisadas de todas as amostras ficaram dentro do limite considerado bom, 30 à 40, em contrapartida tudo o que fica abaixo de 20 é considerado ruim.

Figura 12 - Gráfico referente ao R2 (antisense)

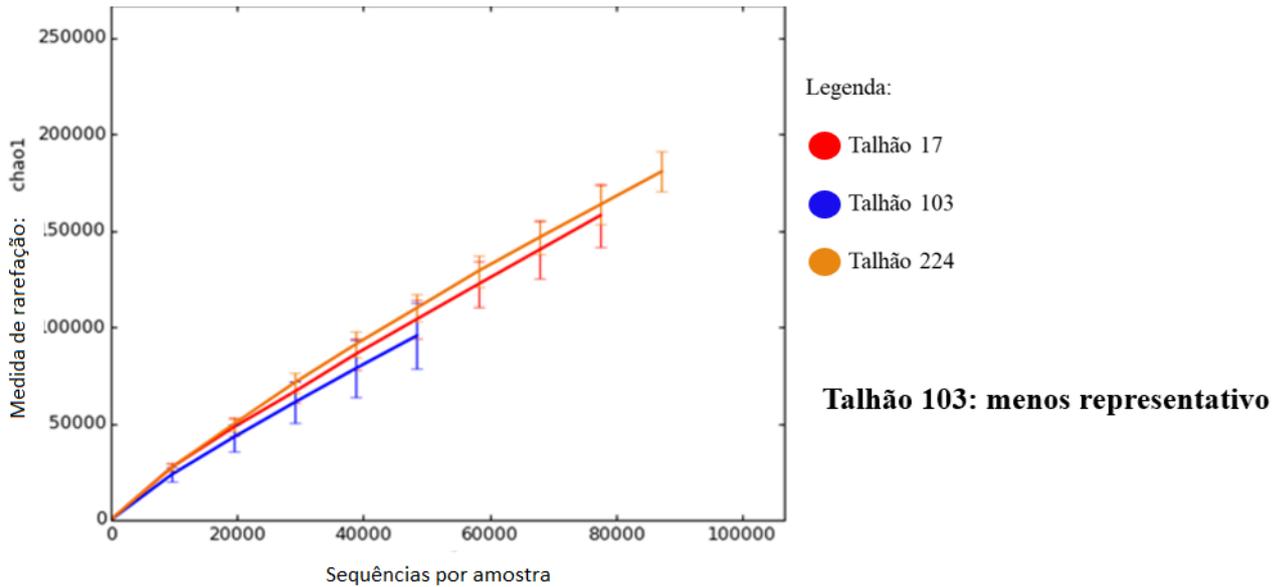


A Figura 12 está representando o gráfico da análise de qualidade das sequências em relação ao R2 (antisense), a qual é baseada nos valores da tabela 5 (Q-Score). Portanto, as sequências analisadas de todas as amostras ficaram fora do limite considerado bom, e com isso foram excluídas das análises posteriores. Sendo assim todas as análises de bioinformática foram baseadas em R1 (sense), e isso pode ser observado também na Tabela 9, na qual podemos observar que com a junção de R1 e R2 a porcentagem de similaridade ficou muito ruim, em torno de 5%, sendo que o normal é acima de 90%.

4.2.5. Análise de Rarefação

De acordo com PEIXOTO (2013), a análise de rarefação permite a comparação da riqueza biológica observada entre as amostras desiguais de um mesmo habitat, o que está ilustrado na Figura 13. Diante disso, a curva de rarefação é calculada levando em consideração o número de espécies observadas em função dos números de amostras coletadas (neste caso, amostras de solo). Além disso, essa análise é apenas uma forma de mostrar a riqueza das amostras coletadas.

Figura 13 - Gráfico de rarefação



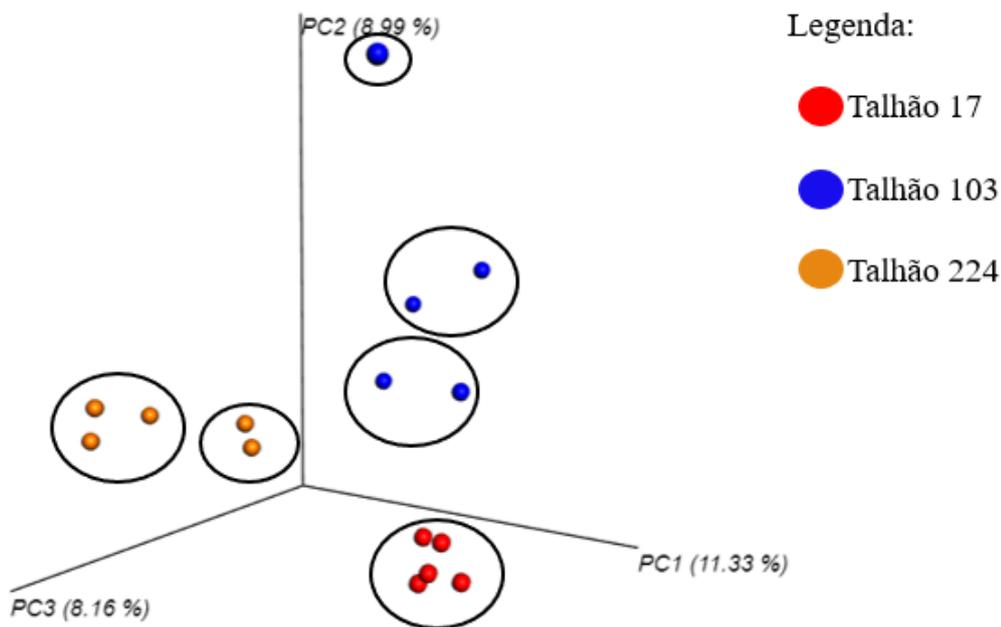
A Figura 13, acima, mostra que para os três talhões (17, 103 e 224), o número de reads sequenciados talvez não foram suficientes para amostrar a microbiota dos solos. Isso está representado pelas curvas que não atingiram o platô. Além disso, pode-se levar outro ponto em consideração que foi a perda de todos os dados de R2 (antisense) que podem ter prejudicado esse resultado, ao passo que em vez de termos 2 regiões (sense e antisense), temos apenas dados da R1 (sense). Portanto, esse gráfico pode ter sofrido duas interferências sendo o número de reads por amostras e/ou a perda de dados de R2.

4.2.6. Análise de PCA

Segundo Vasconcelos (2017), a análise de componentes principais PCA (do inglês Principal Component Analysis) é um método que analisa os dados usados de modo que ocorra a redução, eliminação de sobreposições e a escolha das formas que mais representem os dados, através das combinações lineares das variáveis originais.

Essa análise pode ser observada na Figuras 14, a qual está representando a distribuição por talhão.

Figura 14 - Gráfico de Componentes Principais por talhão: 17 X 103 X 224



28,48% de representatividade

A análise de PCA é utilizada para mostra a variância nos dados, e de acordo com a Figura 14 isso pode ser observado. Isso mostra que essa análise conseguiu representar 28,48% dos dados, o que implica em uma baixa representação, e isso pode ter sido causado pela perda de dados das sequências R2 ou por um “n” muito baixo.

Além disso, pode-se observar que as amostras do talhão 17 não apresentam muita heterogeneidade quando comparadas aos talhões 103 e 224. Com isso, o talhão 103 pode ser dividido em 3 grupos, e o talhão 224 em 2 grupos. Portanto, pode-se dizer que o talhão 103 é o mais heterogêneo em relação as cinco amostras correspondentes a ele. Isso também pode ser explicado pelo desenho de cada talhão, como pode ser observado nas figuras 3, 4 e 5, as quais mostram a localização dos 5 pontos de coleta e sua distribuição no talhão. Com isso, observa-se que o talhão 17, por ter um tamanho menor, quando comparado aos 103 e 224, as amostras permanecem mais próximas, ao passo que nos talhões 103 e 224, por apresentarem um espaço físico maior as amostras se distanciaram mais. Entretanto, o talhão 103 é mais heterogêneo em relação ao 224.

4.2.7. Análises de OTU

Figura 15 - Gráfico de OTU: Taxonomia Filo

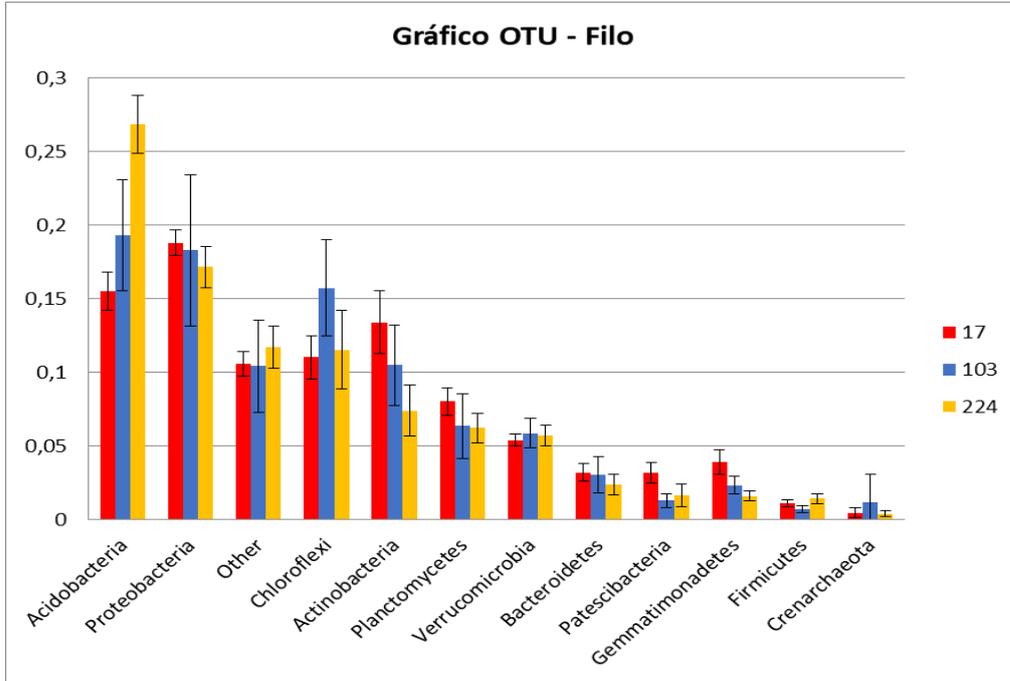


Figura 16 - Gráfico de OTU: Taxonomia Classe

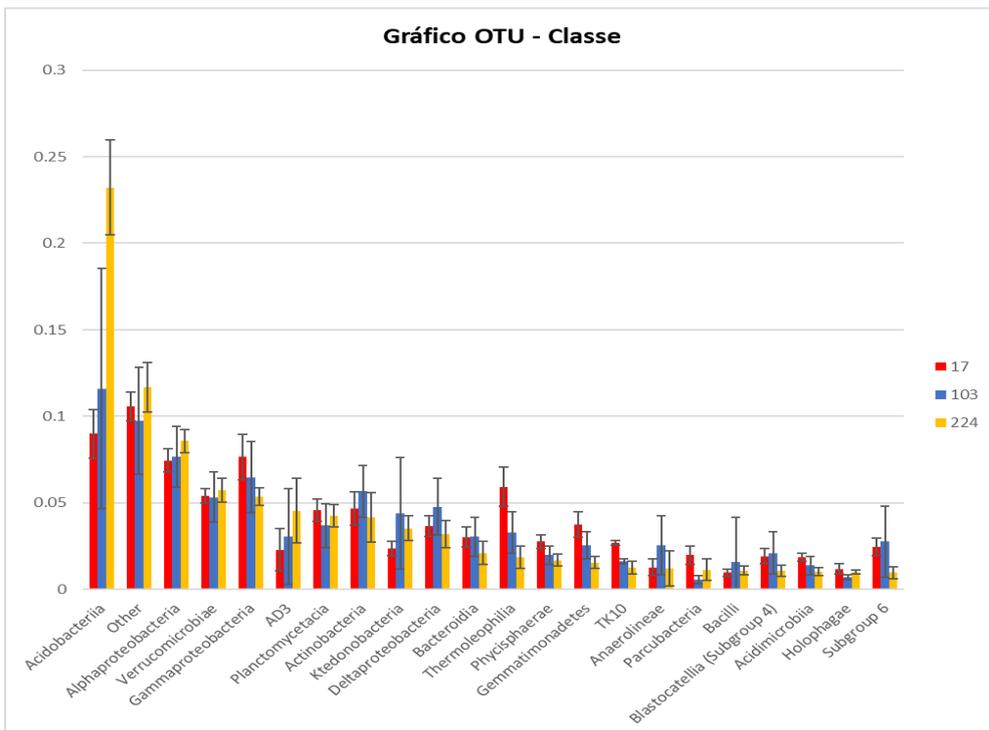


Figura 17 - Gráfico de OTU: Taxonomia Ordem

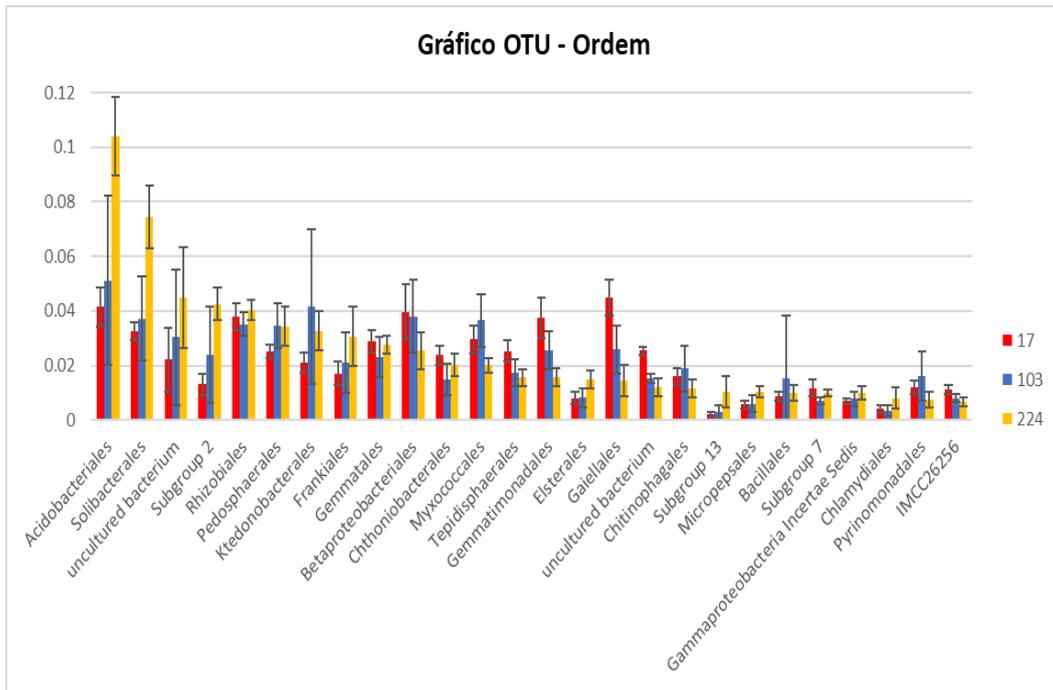


Figura 18 - Gráfico de OTU: Taxonomia Família

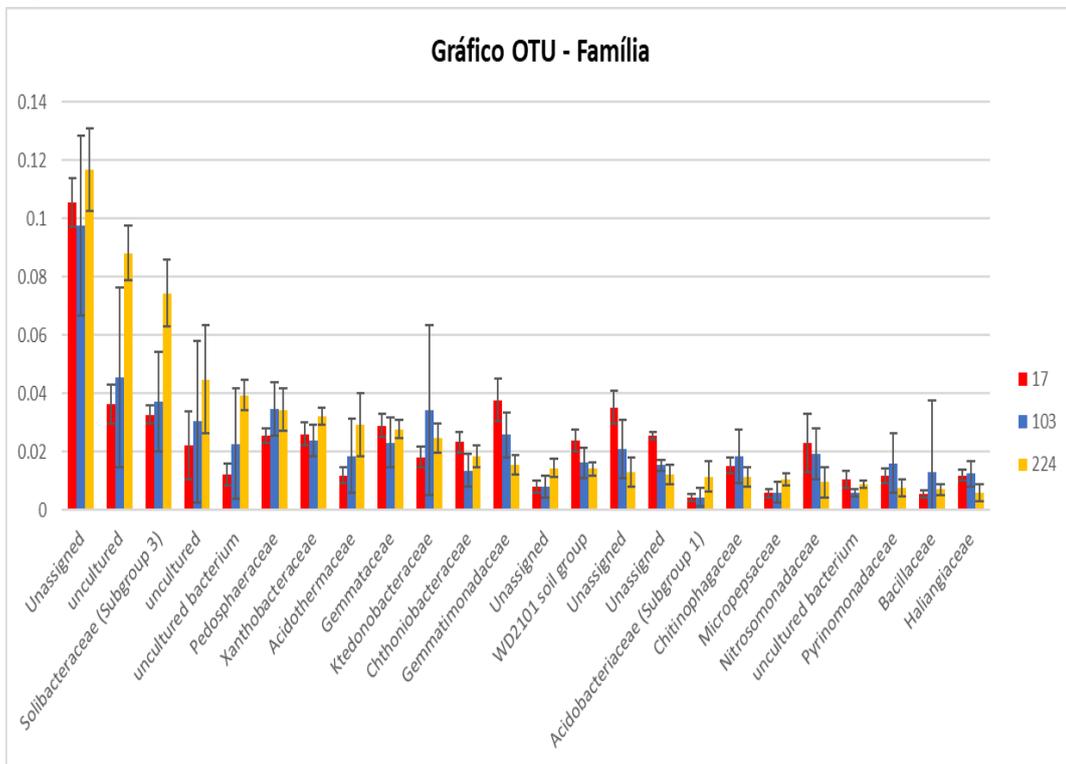


Figura 19 - Gráfico de OTU: Taxonomia

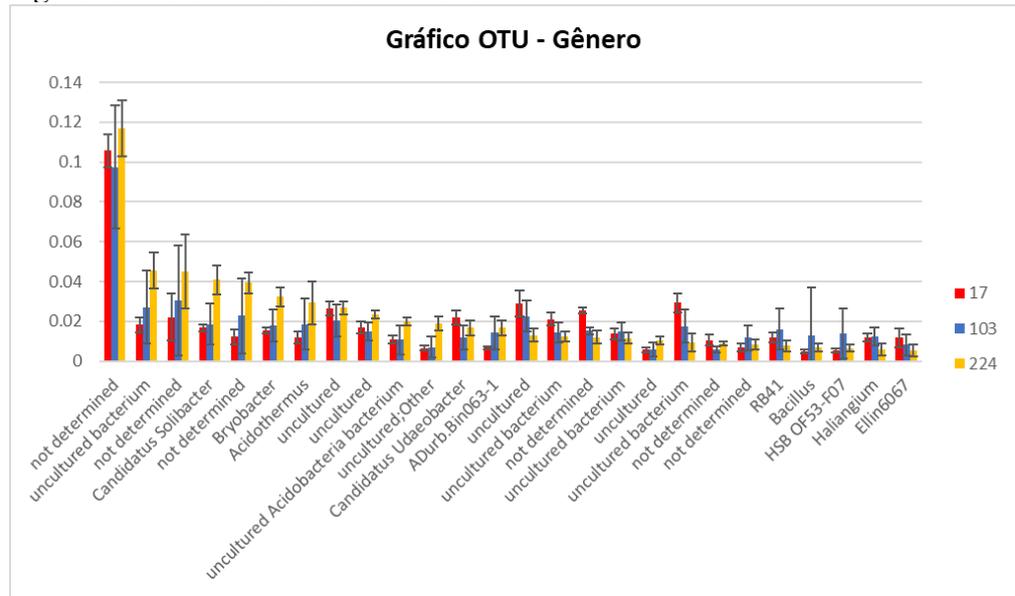
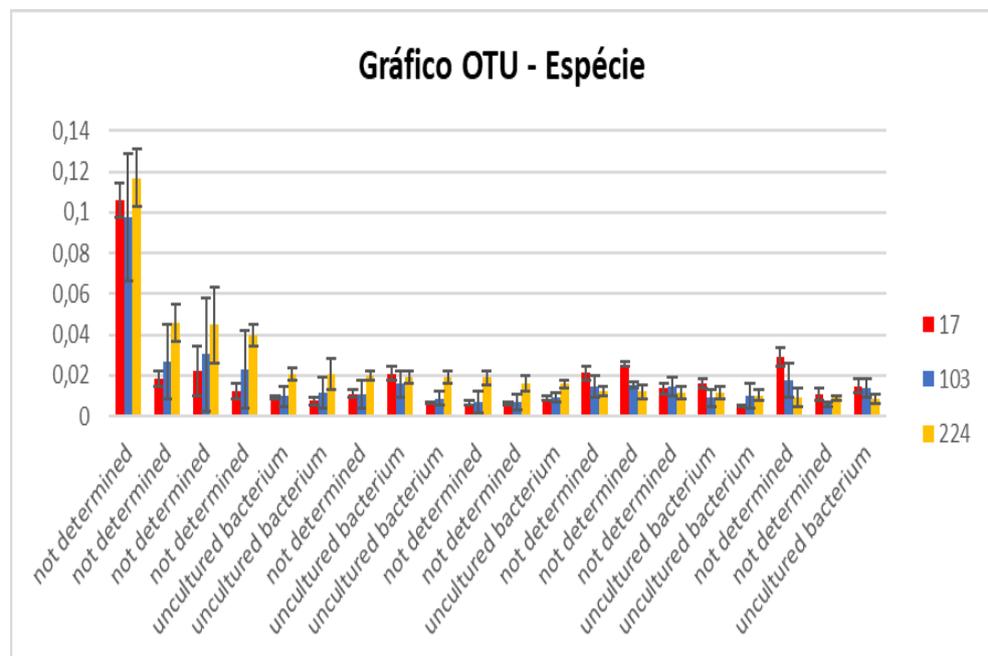


Figura 20 - Gráfico de OTU: Taxonomia Espécie

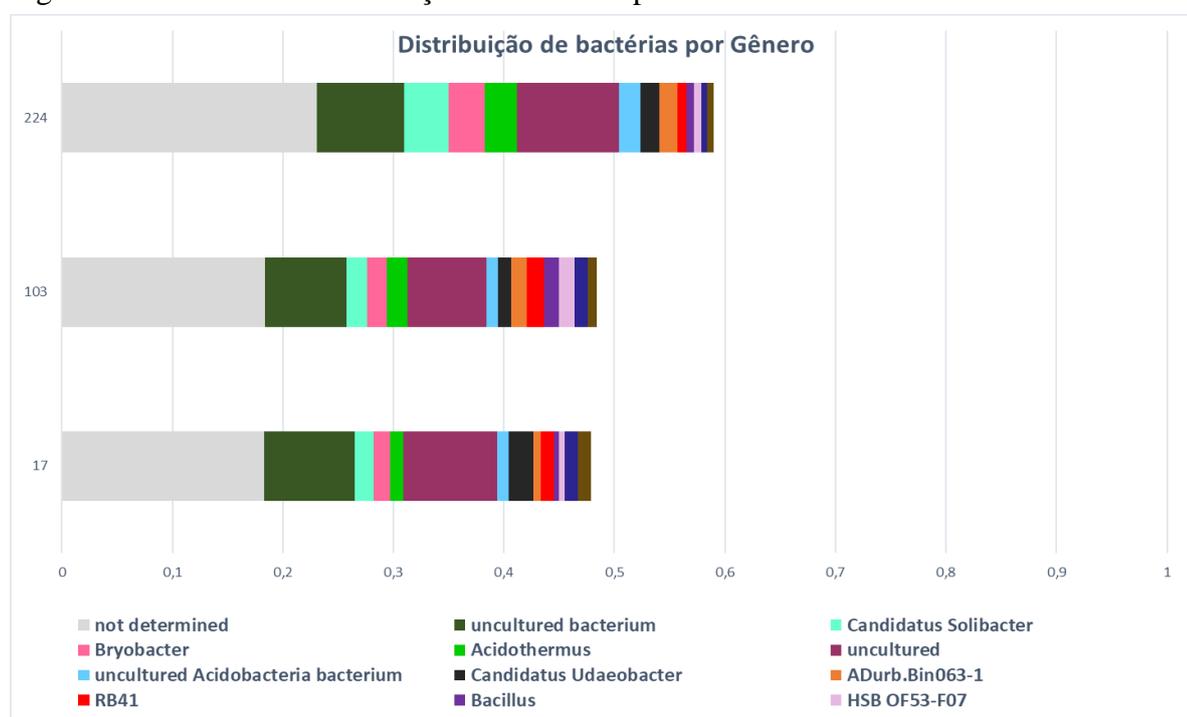


As análises de OTU baseiam-se na classificação taxonômica, as quais são representadas por Reino - Filo- Classe- Ordem- Família - Gênero e Espécie. Todas essas análises estão representadas nos gráficos 15 ao 20, com exceção da análise em relação ao Reino, a qual não foi realizada, por não apresentar dados relevantes, visto que o intuito da metagenômica é obter dados mais específicos. Observando todos os gráficos, a partir do

gráfico 18 muitos dados classificados, mostrando que quanto mais específico a taxonomia, mais dados perdidos obtivemos. Porém, como o intuito da metagenômica é obter o maior nível de especificidade, optou-se por trabalhar com o gráfico 19, o qual apesar de ter alguns dados perdidos, tem muitos dados revelados que serão possíveis realizar buscas na literatura.

Levando em consideração, o que foi citado acima, para obter informações relevantes foi realizada pesquisas em relação a gênero. Com isso, foi feito um gráfico, o qual está representado na Figura 21, em que mostra a distribuição das bactérias por gênero em cada talhão.

Figura 21 - Gráfico de Distribuição de bactérias por Gênero em cada



Observando-se a Figura 21, a maior parte dos gêneros encontrados não tiveram seus dados revelados quando confrontados com o banco de dados. Portanto, pode-se dizer que há muitos gêneros ainda não estudados, sendo que para o talhão 17 a porcentagem de não descritos foi de 35%; para o talhão 103 foi de 33% e para o talhão 224 foi de 40%. Sendo assim, o talhão que teve menos dados encontrados no banco de dados de bactérias foi o 224. Entretanto, os três talhões não tiveram 100% dos seus dados revelados, visto que os dados encontrados ficaram em torno de 50-60%, sendo que o talhão 17 teve apenas 12% dos dados encontrados; o 103 teve 15% e o 224 teve 19%. Portanto, diante da análise da figura 18 pode-se dizer que o 224 teve a maior perda, porém obteve o maior número de gêneros determinados segundo o banco de dados SILVA.

A partir da Figura 21 foram realizadas pesquisas no site NCBI utilizando as opções PUB MED e GENOME para obter o maior número de cada gênero de bactérias, afim de facilitar o entendimento.

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1. Análises do solo

O solo do talhão 17 apresenta o maior teor de matéria orgânica (MO), o que de acordo com, De FEDE *et al.* (2001), como característica manter mais estável a população microbiana, e isso pode ser observado analisando-se o gráfico de PCA, o qual mostrou que o talhão 17 é o mais homogêneo entre os talhões.

Segundo Ribeiro *et al.* (1999) a análise de pH em CaCl_2 , Tabela 10, pode-se observar os valores de pH analisados com CaCl_2 , e comparando-se os valores de pH mostrados na Tabela 6, talhão 17 e 103 apresentam características de acidez média e o talhão 224 acidez muito alta. Isso implica em dizer que o talhão 224 terá menor disponibilidade de nutrientes, entretanto esse talhão, no momento da coleta, tinha cana-de-açúcar plantada, o que pode ter diminuído os nutrientes disponíveis. Em contrapartida, os talhões 17 e 103 não apresentavam cana-de-açúcar, o que leva ao aumento de nutrientes disponíveis.

Tabela 10 - Classificação do pH em análise com CaCl_2

	pH em CaCl_2 Classificação*
< 4,3	acidez muito alta
4,4 a 5,0	acidez alta
5,1 a 5,5	acidez média
5,6 a 6,0	acidez baixa
6,0 a 7,0	acidez muito baixa
7	neutro
> 7,0	alcalino

5.2. Análises de Metagenômica

Nas realizações das pesquisas alguns gêneros não apresentaram nenhum tipo de informação, sendo eles *ADurb.Bin063-1*, *Ellin6067* e *HSB OF53-F07*, e, portanto, nada será descrito sobre eles. Entretanto, foram encontradas informações na literatura para os oito gêneros restantes, sendo eles o *Candidatus Solibacter*, *Bryobacter*, *Acidothermus*, *Acidobacteria bacterium*, *Candidatus Udaeobacter*, *RB41*, *Bacillus* e *Haliangium*, e estas serão descritas abaixo.

O gênero *Candidatus Solibacter* é membro da Acidobactéria, e são representadas pela espécie *Solibacter usitatus*, a qual tem como característica principal a destruição de moléculas biologicamente complexas produzidas por microrganismos autotróficos.

Além disso, segundo WANG *et al.* (2017), estudo com solos contaminados com drenagem ácida de minas a longo prazo apresentaram maior incidência de Acidobactérias, a qual foi representada pelo gênero *Candidatus Solibacter*. Esse estudo corrobora para o desenvolvimento de estratégias de biorremediação usando micróbios nativos na limpeza e bioestabelecimento de solo agrícola contaminados.

De acordo com WANG *et al.* (2017), um estudo mostrou que a qualidade química dos resíduos das culturas é diretamente afetada pelo alto nível de CO₂, e isso pode influenciar o sequestro de carbono orgânico do solo. Com isso, esse estudo mostrou que há maior incidência de *Candidatus Solibacter* quando o tratamento do solo é realizado com derivados de elevado nível de CO₂, em vez de derivados de CO₂ ambiental. Além disso, mostrou que a abundância de Acidobactérias, filo da *Candidatus Solibacter*, é negativamente associada a disponibilidade de carbono, e isso tem gerado uma hipótese de que estas podem desempenhar um papel importante na ciclagem de carbono orgânico derivado de resíduos vegetais.

Segundo WANG *et al.* (2017), mostrou que há maior incidência de *Bryobacter*, bactéria pertencente ao filo Acidobactéria, quando o tratamento do solo é realizado com derivados de elevado nível de CO₂, em vez de derivados de CO₂ ambiental. Além disso, mostrou que a abundância de Acidobactérias é negativamente associada a disponibilidade de carbono, e isso tem gerado uma hipótese de que estas podem desempenhar um papel importante na ciclagem de carbono orgânico derivado de resíduos vegetais.

Além disso, outro estudo, segundo XUE (2017), a bactéria *Bryobacter* está envolvida em no processo de restauração de vegetação, em áreas de desertificação rochosa cárstica, e é identificada como gênero-chave na rede de co-ocorrência.

O gênero *Acidothermus*, de acordo KENNY *et. al* (2017) com tem como característica produção de endoglucanases termoestáveis, as quais degradam celulose para produção de etanol como biocombustível. Sendo assim, a espécie que representa esse gênero é a *Acidothermus cellulolyticus*, a qual é considerada uma espécie nova que é acidófila, termófila e celulolítica. Além disso, essa espécie produz a enzima endo-1, 4- β -glucanase (E1), a qual é utilizada para a hidrólise comercial da celulose em glicose e ajuda no processo de decomposição das paredes celulares das plantas o que facilita a produção de biocombustível.

O gênero *Acidobacteria bacterium*, segundo CRITS-CHRISTOPH *et al.* (2018), pode representam uma fonte de produtos naturais, as quais podem atender as necessidades de novos antibióticos e outros compostos farmacêuticos.

Além disso, segundo SHENG *et al.* (2018), um estudo mostra a aplicação de biocarvão ao solo para sequestro de carbono no solo e mitigação do aquecimento global, em que demonstra que o pH do solo é um dos principais fatores que afetam a comunidade bacteriana do solo, e com isso várias avaliações foram realizadas e quando há um aumento de bactérias copiotróficas e uma diminuição de oligotróficas (por exemplo Acidobacteria), houve um aumento da emissão de CO₂.

Segundo BREWER *et al.* (2016), o gênero *Candidatus Udaeobacter* apresenta um tamanho pequeno de genoma quando comparado com outros gêneros, mas além disso sabe-se que esse gênero ocupa um espaço de nicho que não requer diversidade funcional expansiva. Essa característica faz esse gênero ser classificado como micróbio dominante de solo, visto que ainda não foi cultivado em laboratório, e, portanto, fica difícil ter conhecimento de todas as suas propriedades no solo. Além disso, pertence ao filo Verrucomicrobia dentro da classe Spartobacteria, e sabe-se que embora muitas bactérias do solo precisem apresentar um genoma relativamente grande e complexo para obter sucesso no solo, esse gênero *Candidatus Udaeobacter* demonstrar utilizar uma estratégia alternativa, em que sacrifica a versatilidade metabólica de modo que a sua eficiência seja dominante no ambiente do solo. Isso sugere que bactérias abundantes e não cultivadas do solo

provavelmente têm genomas menores do que as que são cultivadas que possuem dados genômicos disponíveis. Entretanto, sabe-se que a maioria das informações genômicas das bactérias são derivadas da taxa bacteriana cultivada, e com isso a falta de informações genômicas de bactérias com genomas compactos podem originar desafios relacionados à taxa de cultivo.

O gênero *Candidatus Udaeobacter* apresenta um estilo de vida aeróbio/heteróbio, sendo capaz de utilizar uma gama de substratos de carbono para seu crescimento, incluindo glucose, piruvato e quitobiose. Além disso, estudos mostram que essas bactérias tem a capacidade de armazenar excesso de carbono como glicogênio ou amido. Outra característica é que essa bactéria apresenta característica auxotrófica para alguns metabólitos provenientes de vias de produção de aminoácidos e vitaminas, e isto implica que estes compostos podem ser adquiridos a partir do ambiente do solo, pois muitos estudos mostraram que aminoácidos livres e oligopeptídeos estão presentes no solo. Portanto, essas características mostraram que essa bactéria é capaz de reduzir a necessidade de carbono orgânico no solo, adquirindo aminoácidos e vitaminas do ambiente. (BREWER, 2016)

De acordo com AWASTHI *et al.* (2017), o gênero RB41 está relacionado a ecossistemas de compostagem, e esse estudo mostra que essa bactéria é característica de ambientes naturais e antropológicos.

O gênero *Bacillus*, de acordo com WANG *et al.* (2018), em um estudo sobre alterações de rochas de uma montanha rochosa e do solo adjacente, foi identificada abundância e eficiência de intemperismo de linhagens dessa bactéria. O número de cepas de *Bacillus* era maior no solo do que nas rochas alteradas, enquanto que a proporção do número de cepas de *Bacillus* para as do total de bactérias foi maior nas rochas menos alteradas, seguida das rochas mais alteradas e pelo solo. Além disso, observou-se que cepas altamente solubilizantes foram maiores em rochas mais alteradas, depois nas menos alteradas e por fim no solo. Entre as espécies de *Bacillus* solubilizadores de Al, de 30-36% deles diferiam entre as rochas alteradas e o solo, porém as espécies parecidas de *Bacillus* solubilizantes estavam presentes nas rochas menos e mais alteradas. Portanto, esses resultados sugeriram a adaptação ecológica das populações de *Bacillus* com o intemperismo mineral, e o seu papel no intemperismo mineral em ambientes de rocha e solo.

Outro papel importante de uma espécie de *Bacillus*, segundo DRAGOS *et al.* (2018), é que através de estratégias fenotípicas e genéticas, através da divisão de trabalhos podem promover a produção de biofilme na bactéria do solo *Bacillus subtilis*.

De acordo com, RADOVANOVIC *et al.* (2018), uma nova cepa de *Bacillus sp.* PPM3, a qual foi isolada de sedimentos marinhos do mar vermelho, no Egito, foi selecionada por causa da sua capacidade de suprimir o crescimento de quatro fungos patogênicos, sendo eles *Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum*, *Mucir sp.* Essa bactéria suprimiu o crescimento e a germinação de esporos de todos os fungos, sendo que a inibição maior foi em relação ao *Mucor sp.* Portanto, essa bactéria apresenta um caráter antifúngico pela produção de metabólitos secundários altamente estáveis, resistente a extremos pH, temperatura e tratamentos enzimáticos. E com isso, através desses resultados, a nova cepa poderia ter um potencial em aplicações comerciais como agente de biocontrole para tratamento de várias doenças de plantas causadas por fungos patogênicos e pós- colheita.

Outra característica que pode ser associada ao gênero *Bacillus*, segundo LIU *et al.* (2018), um estudo relacionado a dinâmica na composição da comunidade em conjunto com 13 genes de resistência a antibióticos e oito elementos genéticos móveis, foram analisados durante um processo de co-compostagem com gentamicina e resíduos de fermentação de lovastatina, e os resultados mostraram que o *Bacillus* pertencente ao filo Firmicutes foi associado com degradação aumentada de gentamicina, decomposição de matéria orgânica e carbono orgânico dissolvido e extensão da fase termófila do ciclo de compostagem.

O gênero *Bacillus*, de acordo com LI *et al.* (2018), um estudo relacionado a tecnologia de remediação para gerar simultaneamente bioeletricidade através de um eletrodo sólido como o inesgotável aceptor de elétrons, mostrou que poluentes clorados são melhores metabolizados por de cloração redutiva nas proximidades do cátodo. Neste estudo, analisou a eficiência de remoção do herbicida metacloro (ML), e observou que aumentou célula de combustível microbiana (MFC) do solo, os quais foram contaminados com quantidades diferentes de metacloro, sendo que o solo que foi contaminado com a menor quantidade teve a eficiência de remoção maior do herbicida. Em contrapartida, levando em consideração a produção de bioeletricidade, o solo com a maior quantidade de herbicida metacloro apresentou a maior produção. Assim sendo, esse estudo mostrou com bases nas correlações de concentração de metacloro e abundância de espécies nas células de combustível microbiana, que a espécie *Bacillus sp.* pode ser eletrogênio ou micróbios intimamente relacionados à correlação positiva entre os níveis de geração de bioeletricidade e suas abundâncias ao redor do ânodo. Portanto, esse estudo sugere que uma adaptação direcional da comunidade microbiana ocorreu para aumentar a remoção de herbicidas clorados ao redor do

cátodo e também aumentar a geração de bioeletricidade ao redor do ânodo, em sistemas de remediação bioeletroquímica.

Segundo FAN *et al.* (2018), o gênero *Haliangium* é sensível a sulfato de colistina, e que quando na sua presença há uma diminuição da sua presença no solo. Além disso, o estudo mostrou que concentrações de sulfato de colistina de 5mg/Kg e 50 mg/Kg podem reduzir o metabolismo bacteriano e inibir seu crescimento. Portanto, sabe-se que solos que apresentam sulfato de colistina prejudicam as funções como transformação de nitrogênio, metanogênese e redução de sulfato no solo.

Além disso, de acordo com LING *et al.* (2014), um estudo testando a aplicação de um novo fertilizante bioorgânico para melhorar a eficácia do biocontrole da murcha de *Fusarium*, mostrou que com os anos contínuos de cultivo, o tratamento da aplicação do fertilizante tanto no viveiro quanto no solo apresentou menor incidência da doença. E diante desse estudo análises de sequenciamento foram realizadas para verificar a diversidade bacteriana e dentre os filos dominantes estava o *Haliangium*. Portanto, esse estudo pode sugerir indicações de como regular a comunidade microbiana do solo, de modo a manter a planta saudável conseguindo controlar as doenças transmitidas pelo solo.

Outra característica do gênero *Haliangium* é que ele é representado pela mixobactérias, as quais são consideradas uma alternativa para produção de antibióticos, e também pode ser representado pela espécie *Haliangium ochraceum*, a qual precisa de um ambiente salino e condições aeróbicas para se desenvolver. Essa espécie é classificada com quimioautotrofa e tem a capacidade de se tornar um metabólito antifúngico e antibiótico, sendo o antibiótico mais comum a haliangicina.

6. CONCLUSÃO

- Correlação das análises de solo em caráter físico, químico e genômico
- Análise física: talhões 17 e 103 texturas média; 224 textura arenosa
- Análise de macronutrientes (V%):
 - ✓ Talhões 17 e 103 → eutróficos → fertilidade alta
 - ✓ Talhão 224 → distrófico → muito ácido → fertilidade média/baixa
- Talhões 17 e 103 com diversidade bacteriana muito parecida e mais estáveis
- Ranking de intemperização e desenvolvimento: 224 → 17 → 103

- Método de Sequenciamento: Satisfatório
- Determinação de Bactérias com funções importantes para o solo
- Principais funções das bactérias encontradas nos solos: produção de biofilme, produção de biocombustível, recuperação de solos, produção de antibióticos, vitaminas, geração de bioeletricidade, controle de doenças em plantas, processos de compostagem, ciclagem de carbono orgânicos, entre outras.
- Maior interesse nas bactérias para produção de biocombustível, processos de compostagem, recuperação de solos e ciclagem de carbono orgânico, devido a esses solos serem destinados a plantação de cana-de-açúcar.

7. REFERÊNCIAS

ANDREOTE *et al.* Microbial communities associated with plants: learning from nature to apply it in agriculture. Elsevier; 2017.

AFONSO, T.S. EFEITO DA DIETA NA DIVERSIDADE BACTERIANA ASSOCIADA AO CULTIVO DE *Laonereis culveri* (ANNELIDA: POLYCHAETA) ATRAVÉS DA TÉCNICA ARDRA; Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Oceanografia da Universidade Federal do Paraná; Pontal do Paraná, 2016.

AWASTHI, M.K., Li, J., KUMAR, S., AWASTHI, S.K., WANG, Q., CHEN, H., WANG, M., REN, X., ZHANG, Z., Effects of biochar amendment on bacterial and fungal diversity for co-composting of gelatin industry sludge mixed with organic fraction of municipal solid waste, *Bioresource Technology* (2017).

BABRAHAM BIOINFORMATICS. Taking appropriate QC measures for RRBS-type or other -Seq applications with Trim Galore. Disponível em: <https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore/blob/master/Docs/Trim_Galore_User_Guide.md>. Acesso em: 24-05-2018.

BRAGA, G.N.M. Na sala com Gismonti Assuntos sobre Agronomia. Disponível em: <<https://agronomiacomgismonti.blogspot.com.br/2014/03/capacidade-de-troca-de-cations-efetiva.html>>. Acesso em: 18-05-2018.

BRAUN, L.R: Ureases: Uma análise comparativa; UFRGS; Porto Alegre, 2008.

Brewer TE, Handley KM, Carini P, Gilbert JA, Fierer N. Genome reduction in an

CATANI, R. A; PEREZ, J.T. A determinação da capacidade de troca de cátions do solo e de argilas por meio da troca isotópica com cálcio radioativo. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/aesalq/v22/03.pdf>>. Acesso em: 18-05-2018.

CRISTS-CHRISTOPH, A; DIAMOND, S; BUTTERFIEL, CN; THOMAS, B.C; BANFIELD, J.F. Novel soil bacteria possess diverse genes for secondary metabolite biosynthesis. Nature. 2018 Jun.

DRAGOS, A; KIESEWALTER, H; MARTIN, M; HSU, C.Y; HARTMANN, R; WECHSLER, T; ERIKSEN, C; BRIX, S; DRESCHER, K; STANLEY-WALL, N; KÜMMERLLI, R; KOVÁCS, Á.T. Division of Labor during Biofilm Matrix Production. Current Biology 2018 Jun.

FAN, T; SUN, Y; PENG, J; WU, Q; MA, Y; ZHOU, X. Combination of amplified rDNA restriction analysis and high-throughput sequencing revealed the negative effect of colistin sulfate on the diversity of soil microorganisms. *Microbiological Research* 2018 Jan.

FERNANDES, A.L. Montagem e anotação funcional de sequências gênicas de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos; Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular; Goiânia; Junho, 2015.

FERREIRA, H. Metagenoma de comunidades microbianas expostas a radiação natural e à metais.2014.

GENES CODES CORPORATION. FastQ Quality Control Reports. Disponível em: <<https://www.genecodes.com/sites/default/files/documents/Tutorials/FastQ%20Quality%20Control%20Reports.pdf>>. Acesso em: 22-05-2018.

IAC. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Solos e Recursos Ambientais. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/produtoseservicos/analisedosolo/interpretacaoanalise.php>>. Acesso em: 20-05-2018.

JACOBY *et al.* The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition—Current Knowledge and Future Directions. Botanical Institute, Cluster of Excellence on Plant

JR, C.C. Matéria orgânica, capacidade de troca catiônica e acidez potencial no solo com dezoito cultivares de cana-de-açúcar. Maio 2011. Tese de Doutorado em Agronomia – UNESP.

LEPSCH, I. F. Formação e Conservação dos Solos. 2.ed. São Paulo, 2010.

Li Y, Li X, Sun Y, Zhao X, Li Y. Cathodic microbial community adaptation to the removal of chlorinated herbicide in soil microbial fuel cells. Environmental Science and Pollution Research. 2018 Jun.

LING, N; DENG, K; SONG, Y; WU, Y; ZHAO, J; RAZA, W; HUANG, Q; SHEN, Q. Variation of rhizosphere bacterial community in watermelon continuous mono-cropping soil by long-term application of a novel bioorganic fertilizer. Microbiological Research 2014 Jul-Aug.

LIU, Y; FENG, Y; CHENG, D; XUE, J; WAKELIN, S; LI, Z. Dynamics of bacterial composition and the fate of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements during the co-composting with gentamicin fermentation residue and lovastatin fermentation residue. Bioresource Technology. 2018 Aug.

MAULE, R.F.; MAZZA, J.A.; JR., G.B.M. Produtividade Agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. Scientia Agricola, v.58, n.2, p.295-301, abr./jun. 2001.

16S METAGENOMIC SEQUENCING LIBRARY PREPARATION. Disponível em <<http://www.science.smith.edu/cmbs/wp-content/uploads/sites/36/2015/09/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf>> . Acesso em: 27 de novembro de 2017.

NETO, J.J. Concentração de nutrientes nas sementes: o papel do molibdênio. Prof. Adjunto, IA - DF - UFRRJ CLAUDIA A. V. ROSSETTO Dr, Prof. Adjunto, IA - DF – UFRRJ Vol. 5(1):171-183, jan./dez. 1998; florestas e ambientes.

OLIVEIRA, J.R. Aplicação prática da análise textural no campo. Disponível em: <<http://www.revistaagropecuaria.com.br/2011/09/22/aplicacao-pratica-da-analise-textural-no-campo/>>. Acesso em 25-05-2018.

OLIVEIRA, M.W; FREIRE, F.M; MACÊDO, G.A.R.; FERREIRA, J.J. Nutrição mineral e adubação da cana-de-açúcar. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.28; n.239; p.30-40; jul/ago.2007.

PLANTE CERTO. Tabelas de interpretação. Disponível em: <http://www.plantecerto.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=54&Itemid=84>. Acesso em 20-05-2018.

PRADO H. Solos e ambientes de produção para o agricultor. Disponível em: <http://www.pedologiafacil.com.br/artig_7.php>. Acesso em: 20-05-2018

PRADO,H. PEDOLOGIA FÁCIL. Disponível em< <http://www.pedologiafacil.com.br/enquetes/enq23.php>>. Acesso em: 16-5-18.

Peixoto, B.M: Classificação de Sequências e Análise de Diversidade em Metagenômica; UNICAMP; Pós-Graduação em ciência da computação; Campinas, 2013.

QUAST et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools; *Nucleic Acids Research*, Volume 41, Issue D1, 1 January 2013, Pages D590–D596; Nov. 2012.

RADOVANOVIC, N; MILUTINOVIC, M; MIHAJLOVSKI, K; JOVIC, J; NASTASIJEVIC, B; RAJILIC-STOJANOVIC, M; DIMITRIJEVIC-BRANKOVIC, S. Biocontrol and plant stimulating potential of novel strain *Bacillus* sp. PPM3 isolated from marine sediment. *Microbial Pathogenesis* 2018 Apr 27.

REVISTA CAATINGA- ISSN 0100-316X UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO (UFERSA) Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação Caatinga (Mossoró,Brasil), v.22, n.1, p.155-160, janeiro/março de 2009.

SANTOS, D.R; GATIBONI, L.C.; KAMINSKI, J.Fatores que afetam a disponibilidade do fósforo e o manejo da adubação fosfatada em solos sob sistema plantio direto. Recebido para publicação 05.04.06; Aprovado em 27.06.07; *Ciência Rural*, v.38, n.2, mar-abr, 2008.

SANTOS, F.R.; ORTEGA, J.M.; Bioinformática aplicada à Genômica. Manuscrito para capítulo do Biowork IV.

SANTOS, T.M.C; SANTOS, M.A.L; SANTOS, C.G; SANTOS, V.R.; PACHECO, D.S. Efeito da fertirrigação com vinhaça nos microrganismos do solo.

SHENG, Y; ZHU, L. Biochar alters microbial community and carbon sequestration potential across different soil pH. *Science of the Total Environment* 2018 May.

SILVEIRA, E.L. Identificação de Comunidades Bacterianas de solo por sequenciamento do gene 16S rRNA. UNESP. Tese de mestrado em Microbiologia. Abril, 2014.

SOUZA, R.S.C.; OKURA, V.K.; ARMANHI, J.S.L.; LOZANO, B.J.N.; SILVA, M.J.; GUERRERO, M.G.; ARAÚJO, L.M.; VERZA, N.C.; BAGHERI, H.C.; IMPERIAL, J.; ARRUDA, P. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. Scientific reports, 2016.

VASCONCELOS, S. Análise de Componentes Principais (PCA). 17p. 2007. Disponível em <http://www.ic.uff.br/~aconci/PCA-ACP.pdf> (último acesso em 15/06/2018).

VELOSO *et al.* Influência do Manganês sobre a nutrição mineral e crescimento da pimenteira do reino. Sci. Agri., Piracicaba; maio/agosto 1995.

WANG, H; ZENG, Y; GUO, C; BAO, Y; LU, G; REINFELDER, JR; DANG, Z. Bacterial, archaeal, and fungal community responses to acid mine drainage-laden pollution in a rice paddy soil ecosystem. Sci Total Environ. 2018 Mar.

WANG, Q; XIE, Q; HE, L; SHENG, X. The abundance and mineral-weathering effectiveness of Bacillus strains in the altered rocks and the soil. Journal of Basic Microbiology 2018 Jun.

WANG, Y; YU, Z; LI, Y; WANG, G; LIU, J; LIU, J; LIU, X; JIN, J. Microbial association with the dynamics of particulate organic carbon in response to the amendment of elevated CO₂-derived wheat residue into a Mollisol. Science of the Total Environment 2017 Dec31.

ZHANG, J.; KASSIAN; KOBERT, T.; FLOURI, T.; STAMATAKIS, A. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End read merger; *Bioinformatics*; v.30; pg 614-620; publicado em 18 de outubro de 2013.