

THAMAR HOLANDA DA SILVA

**DIVERSIDADE E POTENCIAL ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS SOB O
EFEITO DO USO DA TERRA EM SOLOS DE PASTAGEM E DE FLORESTA
NA BACIA AMAZÔNICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016

THAMAR HOLANDA DA SILVA

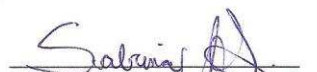
**DIVERSIDADE E POTENCIAL ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS SOB O
EFEITO DO USO DA TERRA EM SOLOS DE PASTAGEM E DE FLORESTA
NA BACIA AMAZÔNICA**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia Agrícola, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 15 de julho de 2016



Mateus Ferreira Santana



Sabrina de Azevedo Silveira



Cynthia Canêdo da Silva
(Orientadora)

À Deus meu criador, meus amados pais Martha e Elidio, aos meus avós, e aos meus irmãos Ângelo André e João Marcos dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus. Porque foi o mesmo que me capacitou e sustentou dia após dia para que chegasse até aqui.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional. Ao apoio logístico das coletas através dos pesquisadores do Laboratório de Geografia e Planejamento Ambiental – LABOGEOPA, da Universidade Federal de Rondônia (UNIR), em conjunto com o Grupo de Estudos e Pesquisas em Biologia Experimental e Diagnóstico por DNA – GEPDNA/UNIR. Aos laboratórios de Imunovirologia Molecular e de Associações Micorrízicas por sempre cederem seu espaço físico para as análises.

Aos meus pais que são meus maiores exemplos de mestres, tanto na vida quanto na área acadêmica, sendo meus maiores incentivadores. Aos meus irmãos que também sempre acreditaram e me apoiaram nas minhas escolhas. E aos meus amados avós, meus velhinhos do coração, que intercedem todos os dias por mim, me sustentando espiritualmente pela graça do nosso bom Deus. E as minhas tias, tios, primos e primas espalhados por este Brasil que de alguma forma contribuíram.

Aos meus amigos do LABIMV por toda ajuda e paciência em me ensinar cada detalhe, principalmente a Lívia e a Helena que nunca mediram esforços em me ajudar. Aos meus amigos de projeto mais chegados que irmãos, Alan e Aneli, eu deixo aqui uma mera gratidão, que em papel nunca poderá ser mensurada, pois o que passei aqui e vivi com vocês está marcado para sempre. Aos amigos de turma e de madrugadas de estudos e análises Fábio, Rodrigo, Marcílio e Tomás. Amo todos vocês de coração.

À todos os outros amigos do programa em Microbiologia Agrícola que se fizeram presentes quer seja numa madrugada de estudo ou num trabalho de extensão, vocês são uma equipe maravilhosa, a verdadeira definição de que juntos vamos mais longe. À minha orientadora Cynthia Canêdo por ter me recebido tão bem e acreditado que eu fosse capaz de exercer este projeto. Que quando preciso me puxou a orelha e confrontou, mas sempre me deu um voto de confiança para que eu pudesse reverter a situação e crescer não só como profissional, mas como pessoa.

As minhas amigas da IPV sempre presentes, Débora, Hanna, Maressa, Marina e Ingrid, que não deixaram nenhum dos meus aniversários passarem em branco, obrigada

meninas, amo vocês. E aos amigos da fé Jonathan, Lucas, Erick e Natália Layane, por cada tempo de crescimento juntos, vocês foram essenciais.

As minhas melhores amigas Diviane, Luciana, Taunna e Verônica que mesmo de longe se fizeram presentes em cada uma das minhas crises, me aconselhando e incentivando a nunca desistir. Ao Leandro, por ter me feito conhecer Viçosa e acreditado mais que eu mesma, que eu era capaz de chegar aqui, e cheguei, e terminei, e te agradeço eternamente.

À todos vocês, o meu muito obrigada.

BIOGRAFIA

Thamar Holanda da Silva é nascida em 22 de fevereiro de 1991, filha de Martha Holanda da Silva, brasileira, natural de Anápolis- Goiás. Coursou o ensino fundamental no Centro Educacional Martinho Lutero –ULBRA em Palmas-Tocantins. No ensino Médio ingressou no colégio Marista, onde terminou o colegial em 2009, também em Palmas-TO. Em 2010 ingressou na Universidade Federal do Tocantins onde se formou como Bacharel em Ciências Biológicas em maio de 2014. Durante a graduação foi estagiária e bolsista CNPq de Iniciação Científica no Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia durante três anos. Em agosto de 2014 ingressou como discente de mestrado no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da dissertação em 15 de julho de 2016.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
LISTA DE TABELAS	x
APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1.0 INTRODUÇÃO	1
2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Localização da área de estudo e características climáticas	2
2.2 Microrganismos do solo	3
2.3 Diversidade microbiana na Floresta Amazônica	4
2.4 Métodos moleculares para acesso à diversidade microbiana	6
2.5 Índices de diversidade microbiana	8
2.6 Controle biológico de fungos fitopatogênicos	9
3.0 OBJETIVOS	12
3.1 OBJETIVO GERAL	12
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
CAPÍTULO 01- DIVERSIDADE TAXONÔMICA E FUNCIONAL DAS COMUNIDADES BACTERIANAS APÓS CONVERSÃO DE ÁREAS DA FLORESTA AMAZÔNICA EM PASTAGEM NA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO MUTUM-PARANÁ-RO	19
RESUMO	20
ABSTRACT	22
1.0 INTRODUÇÃO	24
2.0 MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1 Amostragem	26
2.2 Extração de DNA total das amostras de solo	27
2.3 Sequenciamento dos genes RNAr 16S e análise da diversidade microbiana	28
2.4 Sequenciamento <i>shotgun</i>	28
3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1 Diversidade Microbiana	29
3.2 Análise Funcional de <i>pools</i> metagenômicos	37
3.2.1 Montagem de contigs	37

3.2.2	Análise Funcional pelo <i>Metagenomics Rapid Annotation</i> (MG-RAST).....	38
3.2.3	Análise Funcional dos genes ligados a susceptibilidade de solos	40
3.2.4	Análise Funcional pelo CLC <i>genomics</i>	42
4.0	CONCLUSÕES	46
5.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
6.0	MATERIAL SUPLEMENTAR.....	53
CAPÍTULO 02- POTENCIAL ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS DE SOLO AMAZÔNICO PERANTE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS <i>BOTRYTIS CINEREA</i> , <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> AND <i>COLLETOTRICHUM ACUTATUM</i>		
	RESUMO.....	57
	ABSTRACT.....	58
1.0	INTRODUÇÃO	59
2.0	MATERIAL E MÉTODOS	61
2.1	Amostragem	61
2.2	Isolamento de microrganismos	61
2.3	Caracterização morfológica	62
2.4	<i>Screening</i> para atividade antagonista.....	62
2.5	Teste do filtrado	62
2.6	Identificação taxonômica.....	63
3.0	RESULTADOS.....	64
3.1	Atividade antagonista contra <i>C. acutatum</i> , <i>F. oxysporum</i> e <i>B. cinerea</i>	64
3.2	Identificação taxonômica.....	66
4.0	DISCUSSÃO	67
5.0	CONCLUSÕES	70
6.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
7.0	MATERIAL SUPLEMENTAR.....	75
	CONCLUSÕES GERAIS	77

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 01:** Mapa da Bacia Hidrográfica do rio Mutum-Paraná - RO. A área rachurada no mapa maior representa a localização da área de estudo dentro do estado de Rondônia.....02
- Figura 02:** Localização dos principais trabalhos de diversidade taxonômica de Bacteria realizados na Amazônia.....06

CAPÍTULO 1

- Figura 01:** Localização dos 20 pontos de coleta na Bacia hidrográfica do rio Mutum Paraná-RO.....27
- Figura 02:** Transcepto contendo cinco pontos sub-amostrais que compõe cada ponto amostral de solo. A) Floresta ponto 14 e B) Pastagem ponto 13.....27
- Figura 03:** Curva de rarefação normalizada das OTUs observadas pelos dois diferentes ambientes. Linha vermelha representando floresta e linha azul a pastagem, ao nível de espécie (97%).....29
- Figura 04:** Curva de rarefação das OTUs observadas ao nível de Filo para cada ponto amostral dos dois diferentes ambientes. **P:** amostras de pastagem e **F:** amostras de floresta.29
- Figura 05:** Abundância em percentagem absoluta dos principais Filos do Domínio Bacteria para solo de floresta e pastagem.....30
- Figura 06:** Análise de Componentes Principais entre pontos amostrais e dados químicos do solo. Círculos em verde representam as amostras de pastagem e quadrados em azul representam as amostras de floresta. A direção do vetor indica um aumento para determinada variável ambiental.....31
- Figura 07:** Análise de Componentes Principais dos pontos amostrais dos ambientes, baseada na abundância dos filios bacterianos. Amostras de pastagem foram marcadas em

círculos verdes, e amostras de floresta em quadrados azul. A direção do vetor indica um aumento para determinada variável ambiental.....32

Figura 08. Diagrama de *Venn* mostrando a proporção de filos compartilhados e específicos entre as amostras de floresta e pastagem.....35

Figura 09: Árvore funcional das categorias do subsistema nível 1 do MG-RAST, baseada em dados metagenômicos de *shotgun*. Pastagem em verde e floresta em azul.....40

Figura 10: Abundância relativa das categorias funcionas COG entre os solos de pastagem e floresta.45

Figura suplementar 01: Valores absolutos do índice de diversidade de Shannon para cada ponto amostral, sendo pontos de coleta adjacentes de floresta e pastagem colocados lado a lado. Barras em verde representam os pontos de pastagem, e barras azul os pontos de floresta.53

CAPÍTULO 2

Figura 01: Percentuais de inibição dos isolados de bactérias e leveduras frente aos fitopatógenos *B. cinerea*, *C. acutatum*, *F. oxysporum*.....64

Figura 02. Isolados de levedura exercendo efeito antagonista contra *B.cinerea*. Controle: *B.cinerea* em meio BDA, A) Lev 42; B) Lev 55; C) Lev 48; D) Lev 57.....64

Figura 03. Isolados de bactéria exercendo efeito antagonista contra *B.cinerea*. Controle: *B.cinerea* em meio BDA, A) Bac 15; B) Bac 21.....65

Figura 04: Isolados de levedura exercendo efeito antagonista contra *Foc*. Controle: *Foc* em meio BDA. A) Lev 42; B) Lev 48.....65

Figura 05. Isolados de levedura exercendo efeito antagonista contra *C.acutatum*. Controle: *B.cinerea* em meio BDA. A) Lev 62; B) Lev 57; C) Lev 55; D) Lev 48; E) Lev 42.65

Figura 06: Análise filogenética dos genes RNAr 16S de isolados bacterianos. A árvore filogenética foi construída usando o método *Neighbor-Joining* com 1,000 *bootstrap*

replicatas. O número de acesso Genbak das espécies está indicado entre parênteses.
Thermococcus coalescens foi usado como grupo externo.....67

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 01: Média dos índices de diversidade obtidos para amostras de pastagem e floresta na distância evolutiva de 0,03.....37

Tabela 02: Categorias funcionais dos sistemas SEED/MG-RAST nível 2 e 3 para as amostras de solo de floresta e pastagem.....41

Tabela suplementar 01: Número de OTU's por amostra.....53

Tabela suplementar 02: Análise química dos vinte pontos amostrais.....54

Tabela suplementar 03: Classificação e abundância das sequências pertencentes ao Domínio Bacteria quanto ao Filo. Os filós com abundância superior a 1% foram destacados.....55

CAPÍTULO 2

Tabela 01: Efeito das bactérias e leveduras sobre o crescimento dos Patógenos.....66

Tabela suplementar 01: Morfologia dos isolados de bactérias obtidos do solo da BHRMP.....75

Tabela suplementar 02: Morfologia dos isolados de leveduras obtidos do solo da BHRMP.....76

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação teve como objetivo principal a caracterização da diversidade filogenética e funcional numa abordagem metagenômica, de amostras de solo de floresta e pastagem da Bacia do Rio Mutum-Paraná-RO, bem como o isolamento e triagem de bactérias e leveduras com potencial uso no biocontrole de fitopatógenos. Assim, foi dividida em dois Capítulos, sendo o Capítulo 01 intitulado “Diversidade funcional e taxonômica da comunidade bacteriana após conversão de áreas da floresta Amazônica em pastagem” e teve como principais objetivos a caracterização da diversidade bacteriana taxonômica e funcional nas amostras de pastagem e floresta, bem como entendimento de quais fatores químicos do solo atuam sobre a distribuição da comunidade bacteriana. A análise funcional foi realizada com ênfase nas categorias que nos respondessem qual dos ambientes seria mais susceptível ou mais resistente à incidência de fitopatógenos.

O Capítulo 02 intitulado “Potencial antagonista de bactérias e leveduras de solo Amazônico frente à fungos fitopatogênicos” teve como objetivos o isolamento e caracterização de bactérias e leveduras obtidas das amostras de solo da bacia hidrográfica do rio Mutum-Paraná- RO que fossem capazes de apresentar potencial antagonista contra os fitopatógenos *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

RESUMO

SILVA, Thamar Holanda da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **Diversidade e potencial antagonista de bactérias sob o efeito do uso da terra em solos de pastagem e de floresta na bacia Amazônica.** Orientadora: Cynthia Canêdo da Silva. Coorientador: Marcos Rogério Tótola.

Os microrganismos exercem uma ampla diversidade de funções no solo e atuam como indicadores capazes de refletir pequenas mudanças nas propriedades desse, antes mesmo que alterações nos teores de matéria orgânica possam ser detectados, tornando possível evidenciar alterações antrópicas no solo. Devido à contínua ação antrópica sobre os solos existe uma grande necessidade de se estudar como as comunidades microbianas tem respondido a estas alterações. Este trabalho teve como objetivos analisar a diversidade taxonômica e funcional da comunidade bacteriana em solos de pastagem e solos de floresta Amazônica através de técnicas independentes de cultivo, bem como o isolamento de bactérias e leveduras que tivessem potencial antagonista contra fitopatógenos. As análises filogenéticas mostraram que os filos mais abundantes em ambos os ambientes foram Acidobacteria, Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes e Chloroflexi, porém uma maior diversidade foi encontrada nos solos de pastagem. Na análise funcional foi possível notar que o ambiente de pastagem obteve um maior número de genes relacionados à dormência/esporeação, resposta ao *stress* e metabolismo de aminoácidos. Genes associados com resistência a antibióticos foram menos abundantes em pastagem do que em floresta, concluindo que os solos de floresta são mais estáveis e menos susceptíveis a ação de fitopatógenos oportunistas quando comparados aos de pastagem. Um total de 54 microrganismos foram isolados das amostras de solo, destes, 45 bactérias e nove leveduras. Duas bactérias, identificadas como *Bacillus* spp. e *Lysinibacillus xylanilyticus*, e quatro leveduras apresentaram percentuais de inibição contra *Botrytis cinerea*, os percentuais de inibição variaram de 19,69% a 44,16 %. Quando testados contra *Fusarium oxysporum* apenas três isolados de leveduras foram os responsáveis pelos resultados positivos em relação ao controle, com percentuais de 33,11 % a 36,63%. Contra *Colletotrichum acutatum* cinco isolados de levedura foram capazes de reduzir o tamanho do fitopatógeno, com percentuais variando de 35,53% a 48,64%. Sendo assim os isolados mostraram-se favoráveis para o biocontrole dos patógenos testados.

ABSTRACT

SILVA, Tamar Holanda, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Diversity and antagonist potential of bacteria under the effect of land use on pasture and forest of Amazon region.** Advisor: Cynthia Canêdo da Silva. Co-advisor: Marcos Rogério Tótola.

Microorganisms perform a wide variety of functions in the soil, and are able to act as indicators that reflect small changes in soil properties, even before changes in soil organic matter can be detected, making it possible to observe anthropogenic changes in the soil. Because of continuous human action on the soil, there is a great need to study how microbial communities have responded to these changes. This study aimed to analyze the taxonomic and functional diversity of the bacterial community in grassland soils and forest soils from Mutum Parana river basin in the state of Rondonia, Brazil. For this independent cultivation techniques as well as the isolation of bacteria and yeast that had antagonist potential against plant pathogens were used. Phylogenetic analysis showed that the most abundant phylum in both environments were Acidobacteria, Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes and Chloroflexi, but the greatest diversity was found in forest soils. In the functional analysis one could notice that the grassland soils obtained a larger number of genes related to dormancy / sporulation, stress response, and amino acid metabolism. Genes associated with resistance to antibiotics were less abundant in pasture than in forest, concluding that forest soils are more stable and less susceptible to action of opportunistic pathogens when compared to pasture. A total of 54 microorganisms were isolated from soil samples of these 45 bacteria and nine yeasts. Two bacteria, identified as *Bacillus* spp. and *Lysinibacillus xylanilyticus* and four yeast showed inhibition percentage against *Botrytis cinerea*, the inhibition percentage ranged from 19.69% to 44.16%. When tested against *Fusarium oxysporum*, only three yeast isolates present positive results in the control, from 33.11% to 36.63% success percentage. Against *Colletotrichum acutatum*, five isolates of yeast have reduced the size of the pathogen, with percentages ranging from 35.53% to 48.64%. Thus, isolates were favorable for the biocontrol of the tested pathogens.

1.0 INTRODUÇÃO

Com o advento da biologia molecular, um grande espectro de campos de pesquisa anteriormente não explorados tornou-se possível. Acoplado às abordagens da microbiologia clássica, fazem possível a obtenção de informações genéticas, metabólicas e ecológicas, que tem agregado conhecimentos aplicados às mais diversas áreas, principalmente àquelas ligadas à obtenção de produtos biotecnológicos, como as indústrias de química fina, farmacêuticas, têxteis, dentre outros. Assim, a busca por novos organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos, que possam ter um potencial econômico e, eventualmente, levar ao desenvolvimento de um produto, tornou-se sistemática. Isto fez com que o conhecimento da biodiversidade e a bioprospecção de novos microrganismos e/ou produtos destes, fossem o foco principal da era biotecnológica.

O solo é um sistema complexo e heterogêneo que abriga grande diversidade biológica, e a maior parte de sua biomassa é constituída por microrganismos. Essa representatividade no meio ambiente é um fator crucial para regulação e funcionamento dos ecossistemas. Os microrganismos do solo mostram-se favoráveis como marcadores biológicos, podendo ser utilizados no reconhecimento de ecossistemas modificados. Atuam como indicadores capazes de refletir pequenas mudanças nas propriedades do solo, antes mesmo que alterações nos teores de matéria orgânica possam ser detectados, tornando possível evidenciar alterações antrópicas no solo.

Neste sentido, um grande esforço está sendo concentrado na exploração da microbiota bacteriana do solo, visto que esta é determinante na manutenção da vida nos diferentes ecossistemas do planeta. As bactérias são o grupo de microrganismos mais abundantes no solo. Elas participam ativamente da ciclagem de nutrientes através da decomposição de matéria orgânica e auxiliam na manutenção da estrutura física e química do solo, contribuindo para a sua fertilidade, e podendo ser consideradas promotoras de crescimento das plantas, o que pode oferecer inúmeras possibilidades de interação entre o solo, os nutrientes e os vegetais.

Existe um crescente número de estudos a respeito da alteração da diversidade microbiana do solo Amazônico. Entretanto ainda faz-se necessário um levantamento a respeito do efeito das mudanças no uso da terra sobre as propriedades físico-químicas e

suas relações com grupos específicos de microrganismos. Por isso, a diversidade microbiana deve ser levada em conta na avaliação do impacto que as alterações do uso do solo podem causar ao ambiente.

A crescente pressão antrópica na região da Bacia do Rio Mutum Paraná-RO está acarretando um rápido processo de conversão de floresta ombrófila em áreas de pastagem. Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivos caracterizar a diversidade bacteriana filogenética e funcional presente em amostras de solo de floresta e de pastagem da bacia hidrográfica do rio Mutum Paraná-RO, pelo emprego de técnicas independentes de cultivo microbiano. Adicionalmente, isolar bactérias das amostras de solo para avaliar seu potencial antagonista para determinados fungos fitopatogênicos.

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Localização da área de estudo e características climáticas

A bacia hidrográfica do rio Mutum Paraná é uma sub-bacia do rio Madeira cujo exutório foi atingido pelo reservatório da Usina Hidrelétrica de Jirau (NUNES, 2004). Está localizada no Município de Porto Velho, Distrito de Mutum Paraná – RO (Distrito criado pelo Decreto Legislativo nº 057 de 21 de novembro de 1985), à montante da Capital Porto Velho, incorporando ainda a área do Município de Nova Mamoré. Localiza-se à noroeste do estado, no alto rio Madeira e dista da Capital Porto Velho cerca de 225 km até o ponto de entrada. Sua área total é de 3.503,58 Km² (Figura 01).

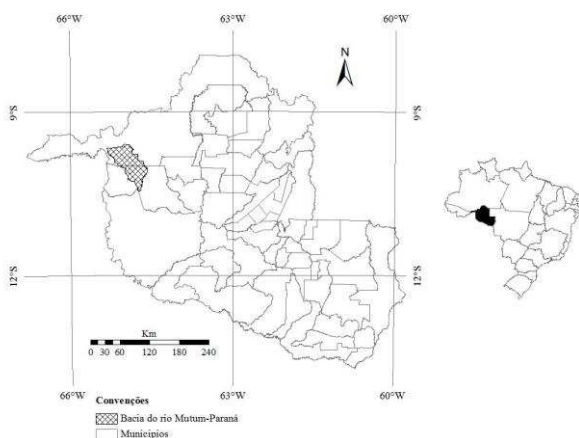


Figura 01: Mapa da Bacia Hidrográfica do rio Mutum-Paraná - RO. A área hachurada no mapa maior representa a localização da área de estudo dentro do estado de Rondônia.

Estudos realizados caracterizaram a bacia do rio Mutum Paraná como sendo de clima equatorial úmido, de baixas altitudes e de altos índices pluviométricos (NIMER, 1989; SEDAM, 2005). O regime térmico é considerado quente, uma vez que a temperatura se mantém sempre acima de 18°C. Conforme a classificação de Köppen, a região possui clima Tropical Chuvoso, caracterizado por uma estação chuvosa e uma estação seca. A cobertura vegetal é marcada pela presença de Floresta Ombrófila Aberta com árvores de grande porte que podem chegar a 50 m de altura (DNPM, 1978).

2.2 Microrganismos do solo

Os microrganismos exercem uma ampla diversidade de funções no solo: decompõe compostos orgânicos e liberam elementos inorgânicos, processo chamado de mineralização; oxidam formas reduzidas de elementos, como enxofre elementar (S⁰) e sulfato (SO₄⁻); e reduzem formas oxidadas de elementos, como nitrato (NO₃⁻) e gás nitrogênio (N₂); reduzem dinitrogênio para formas biologicamente utilizáveis (amônia) (FUHRMANN et al, 2005). Podem ainda atuar como promotores de crescimento de plantas (KLOEPPER e SCHROTH, 1978), ou estar envolvidos em relações simbióticas como nas associações micorrízicas com as plantas onde também são capazes de aumentar a produtividade da planta (JOHNSON; GRAHAM e SMITH, 1997).

As bactérias são o grupo de microrganismos mais abundantes no solo, sendo que suas populações excedem a faixa das centenas de milhões (10⁸) de indivíduos por grama de solo, e podem representar de 10⁴ a 10⁶ espécies diferentes (FUHRMANN et al., 2005).

A distribuição das comunidades bacterianas no solo é controlada por uma série de fatores, incluindo características físico-químicas (ex., profundidade, fatores geogênicos, pH, salinidade e temperatura), estrutura dos microambientes (e.x., espaços dos poros, filmes d'água, matéria orgânica), e a presença de outros organismos vivos (e.x., fungos, artrópodes) (GUAN et al., 2013). Em trabalho utilizando diferentes regimes de fertilizantes em duas temporadas do ano, Zhao et al. (2014) mostraram que as práticas de fertilização e as mudanças sazonais podem afetar as propriedades do solo, biomassa microbiana e estrutura da comunidade bacteriana. Esses autores confirmaram que, tanto o tratamento com fertilizantes, quanto a estação eram fatores importantes na variação da composição da comunidade bacteriana e que os nutrientes do solo (por exemplo, K

disponível, N total, o P total e a matéria orgânica) mostraram correlação significativa com a maioria dos táxons abundantes.

Faoro et al. (2010) mostraram que existe uma associação entre o nível de altitude e a diversidade microbiana, e que isto ocorre porque há mudanças na temperatura, na disponibilidade de oxigênio, na vegetação e nas atividades humanas que ocorrem em altitudes mais baixas, fatores que alteram as características físico-químicas do solo e, conseqüentemente, a diversidade bacteriana.

2.3 Diversidade microbiana na Floresta Amazônica

As florestas tropicais compreendem cerca de 7% da superfície terrestre, porém, sozinhos estes sistemas abrangem mais de 60% da biodiversidade de plantas e animais do mundo (DIRZO; RAVEN, 2003). A floresta tropical Amazônica tem sofrido drasticamente com a redução das suas áreas através do desmatamento, que visam principalmente a expansão das atividades agrícolas (PAULA et al., 2014). As ações antrópicas são, sem dúvida, o principal fator responsável pela perda da biodiversidade, sendo essa perda a principal mudança ambiental global e irreversível que a Terra enfrenta atualmente (DIRZO; RAVEN, 2003). A estimativa da taxa anual do desmatamento na Amazônia Legal aponta que 5.012 km²/ano foram desmatados no período de agosto de 2013 a julho de 2014 (INPE, 2014).

Comunidades bacterianas do solo exercem um papel crucial na estrutura e sustentabilidade das florestas, por estarem diretamente ligados aos ciclos biogeoquímicos, e a mitigação de doenças de plantas. Assim, a diminuição destas comunidades poderia levar a um desequilíbrio na sustentabilidade e resiliência do bioma florestal (VASCONCELLOS *et al.*, 2014).

A diversidade microbiana responde fortemente a essas alterações sobre o uso do solo (PAULA et al., 2014). Ela responde principalmente às alterações físico-químicas que são causadas no solo depois do desmatamento, que resulta em aumento do teor de matéria orgânica depositada, e ainda às alterações vindas da adição de insumos agrícolas e outros produtos químicos (MENDES et al., 2015; JESUS et al., 2009; SULEIMAN et al., 2013; NAVARRETE et al., 2015).

Inóculos bacterianos e fúngicos tem potencial para restaurar a fertilidade de solos degradados através de vários processos. Estes microrganismos aumentam a

biodisponibilidade de nutrientes através da fixação de nitrogênio, promovem o crescimento de plantas pela mobilização de nutrientes chaves, como fósforo, potássio e ferro para as plantas cultivadas, enquanto estas melhoram a estrutura do solo, através da agregação e estabilidade do mesmo (RASHID et al., 2016).

Quando submetida a algum tipo de distúrbio, a comunidade microbiana pode reagir de diferentes formas: i) a composição microbiana pode ser resistente e não mudar após o distúrbio; ii) a composição microbiana pode ser alterada, mas voltar rapidamente a composição original (resiliência) ou iii) a composição microbiana pode permanecer alterada, o que implicaria uma mudança funcional (ALLISON et al., 2008). Paula et al. (2014) mostraram que após um distúrbio causado no solo pelas práticas agrícolas, os solos perturbados têm menor riqueza e diversidade de genes funcionais quando comparados a solo de floresta primária.

Vários estudos de diversidade microbiana têm sido realizados na floresta Amazônica sob ação antrópica (JESUS et al., 2009; RODRIGUES et al., 2013; MENDES, 2014, PAULA et al., 2014; NAVARRETE et al., 2015; MENDES et al., 2015) (Figura 02). Alguns deles (JESUS et al., 2009; RODRIGUES et al., 2013) tem mostrado que a diversidade bacteriana do solo sem perturbações antrópicas é menor que a diversidade observada nos solos que foram transformados em pastagem. JESUS et al. (2009) explicaram que, possivelmente, a intensidade da prática agrícola de corte e queima não tenha sido suficiente para impactar significativamente a comunidade bacteriana no seu sítio de pesquisa, sítios estes que eram circundados por grandes áreas florestais que serviriam como fonte de inóculo para colonização de áreas previamente desmatadas. Entretanto, segundo RODRIGUES et al., (2013) apesar da maior diversidade filogenética nas áreas de pastagem, está havendo uma homogeneização da comunidade microbiana, onde a mesma torna-se mais similar dentre os espaços, havendo perda líquida de diversidade observada nos solos de floresta.

No que diz respeito à diversidade funcional em solos Amazônicos, PAULA et al. (2014) observaram que nos solos de pastagem os genes ligados a ciclos biogeoquímicos, degradação de compostos orgânicos, e resistência a antibióticos e a estresses, apresentam menores diversidade e riqueza que quando comparados aos solos de floresta primária.



Figura 02: Localização dos principais trabalhos de diversidade taxonômica de Bactéria realizados na Amazônia. Pontos: Amarelo - (JESUS et al.,2009); Azul - (NAVARRETE et al., 2015 a), (MENDES et al., 2015 a); Verde - (RODRIGUES et al., 2013) e Vermelho - presente trabalho.

2.4 Métodos moleculares para acesso à diversidade microbiana

Nos estudos de diversidade microbiana muitas limitações ainda precisam ser vencidas. Dentre elas a grande heterogeneidade espacial do solo e a distribuição dos microrganismos; a incapacidade de cultivar em laboratório todos os microrganismos, devido à grande diversidade de requerimentos nutricionais; as limitações dos métodos baseados em abordagens moleculares, como por exemplo conseguir separar as bactérias que vivem agregadas as partículas de solo para uma posterior extração de ácidos nucléicos e/ou PCR e ainda a ambiguidade taxonômica de microrganismos, principalmente devido à dificuldade de definição de espécies para os mesmos (KIRK et al., 2004).

No entanto, com o advento da era biotecnológica novas abordagens têm surgido a cada ano, melhorando e facilitando o acesso e a disponibilidade às informações intrínsecas de cada organismo e até mesmo de ambientes complexos como o solo. Estima-se que a diversidade cultivável de microrganismos não ultrapasse o valor entre 0,1 e 10 % do total de microrganismos presentes em uma amostra, devido às dificuldades em se reproduzir as condições que todas as espécies ou grupos requerem em seu habitat (ZEYAUULLAH et al., 2009). Por meio das técnicas de biologia molecular, que independem do cultivo microbiano, tem sido possível contornar algumas destas

limitações, permitindo maior acesso à composição taxonômica e até mesmo funcional, das diversas amostras ambientais, incluindo o solo.

A metagenômica foi definida por Kim et al. (2013) como sendo o estudo do metagenoma, que é o DNA genômico total proveniente de uma amostra ambiental. Sendo assim, a abordagem metagenômica se caracteriza por contornar a necessidade de cultivo e, em função da vasta diversidade microbiana, é conduzida em grande escala (HANDELSMAN, 2005).

Aplicações biotecnológicas da metagenômica podem ser favorecidas pela busca de estudos ecológicos fundamentais com foco na bioprospecção por novos microrganismos ainda não cultiváveis ou por produtos destes (ZEYAUULLAH et al., 2009). Através da utilização de bibliotecas metagenômicas, o uso de amostras de solo já se mostrou capaz de acessar novas enzimas relacionadas ao branqueamento da celulose, de alto interesse na indústria de papel (VERMA et al., 2013) ou ainda na utilização de genes para atividade lipolítica, tais como esterases e lipases (LEE et al., 2004).

Bibliotecas metagenômicas, também chamadas de metagenômica funcional, consistem na clonagem de fragmentos de DNA extraídos a partir das amostras ambientais em vetores do tipo BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*), cosmídios e fosmídeos (LEE; LEE, 2013). Tem sido utilizado como estratégia para a exploração do potencial metabólico de microrganismos ainda não cultiváveis, consequentemente permitindo o acesso à novas atividades biológicas.

Dentre as metodologias independentes de cultivo para estudo da diversidade microbiana estão incluídas as metodologias baseadas em PCR/*fingerprinting* como DGGE (Eletroforese em gel de gradiente desnaturante), RT-PCR (PCR em Tempo Real) e aquelas baseadas em sequenciamento massivo de DNA total ou amplicons, também chamada de metagenômica, provenientes de amostras ambientais (HERMANSSON e LINDGREN, 2001; STUBNER, 2004).

Para a abordagem que envolve o sequenciamento massivo de amplicons, a maioria dos trabalhos tem se baseado no sequenciamento do gene RNAr 16S para bactérias ou 18S e ITS para fungos. Este gene (RNAr 16S) é comum a todas as formas de vida, pois compreende a subunidade menor do ribossomo (SSU RNAr), e sua comparação provê um contexto filogenético informativo, nos quais é possível qualificar e quantificar a

diversidade entre os diferentes táxons (ANTONOPOULOS et al., 2010). Já o sequenciamento massivo do DNA total por *shotgun*, que lê todos os fragmentos sem a amplificação prévia de algum gene, permite a análise funcional da amostra (SOUZA, et al., 2013). Porém, para um sucesso completo da metagenômica do solo é preciso uma combinação de seleção adequada de amostras, métodos de extração de DNA e sequenciamento eficientes, juntamente com uma robusta análise de bioinformática dos dados de sequenciamento (MOCALI e BENEDETTI, 2010).

2.5 Índices de diversidade microbiana

O conceito de espécie já é muito bem definido para organismos superiores, e mesmo com algumas variações ele é extensamente utilizado como sendo “agrupamentos de populações naturais intercruzantes, reprodutivamente isoladas de outros grupos com as mesmas características” - definição proposta por Mayr (1957).

Esta definição é extremamente limitante quando tratamos de microrganismos, que podem se comportar através de reprodução assexuada, fazendo com que outras definições sejam requeridas. Todas as definições tradicionais de espécies procarióticas devem levar em conta a transferência lateral de genes, a transferência plasmidial, tradução e transformação (LIU e JANSSON, 2010).

É comum o equívoco de tratar a diversidade biológica, ou biodiversidade, como um sinônimo de riqueza de espécies. Entretanto a abundância de espécies precisa levar em conta a equitabilidade – uma medida de quão similar as espécies são, nas suas abundâncias. Assim, uma montagem em que a maioria das espécies são igualmente abundantes, é uma que tem maior equitabilidade (MAGURRAM, 2004).

A riqueza de espécies pode ser padronizada por meio de um índice de riqueza (MAGURRAM, 2004). Tais índices basicamente dividem a riqueza de espécies observada numa amostra por algum termo envolvendo o número de indivíduos na amostra, como nos Índices de Margalef e de Menhinick. Uma vantagem destes índices é que, para uma mesma comunidade, eles tendem a assumir um valor constante em relação a aumentos no esforço amostral. Apesar disto, não são frequentemente utilizados na literatura (MELO, 2008).

Nenhum índice quantitativo da diversidade biológica pode capturar a magnitude e a direção da mudança ambiental (OGUNSEITAN, 2008), entretanto alguns índices de medida de diversidade têm sido utilizados como uma tentativa de refletir a aparente diversidade das comunidades microbianas. O índice de Shannon é baseado na abundância proporcional das espécies, levando em conta tanto a uniformidade (equitabilidade) quanto a riqueza de espécies. O aumento do número de espécies ou o aumento da uniformidade das abundâncias aumenta a diversidade. Sendo assim, as espécies raras possuem um peso maior do que as espécies comuns, e quanto maior o índice, maior a diversidade (MAGURRAM, 2004).

Outro índice aplicado é a cobertura. Esta indica o quanto os resultados obtidos reproduzem a comunidade observada. Uma cobertura mínima de 90 % significa que os índices de diversidade calculados são os mais próximos possíveis da realidade (GOOD, 1953; LEMOS et al., 2011).

2.6 Controle biológico de fungos fitopatogênicos

As doenças de plantas são responsáveis por grandes perdas em culturas de importância econômica, principalmente aquelas que ocorrem durante a pós-colheita. A busca de novos microrganismos com potencial para utilização em protocolos de controle biológico vem se tornando uma prioridade nos países que apresentam tradição agrária, como o Brasil (PIMENTA, 2004). Sabendo que quanto maior a diversidade de uma região, maiores são as chances de obtenção de um agente biocontrolador, a busca por estes organismos, assim como o desenvolvimento de tecnologias de utilização passaram a assumir uma função estratégica para o desenvolvimento e independência tecnológica (STROBEL, 2006).

Alguns microrganismos têm a capacidade de exercer um efeito antagonista sobre diferentes patógenos, sendo empregados para controlar diversas enfermidades de frutos e vegetais, especialmente na fase de pós-colheita. Existem numerosos trabalhos na literatura que buscam obter agentes microbianos para um controle biológico potencialmente eficiente, onde um grande número de antagonistas tem sido pré-selecionados em testes de antagonismo *in vitro*. Esta capacidade antagonista justifica o grande interesse econômico-sanitário nesses organismos, visto capacidade de produzir metabólitos primários e secundários de interesse, como por exemplo Fenazinas

produzidas por *Pseudomonas fluorescens* 2-79 e 30-84 que controlam *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*; Bacillomycina D produzida por *Bacillus subtilis* AU195 que controla a contaminação de aflotoxinas produzidas por *Aspergillus flavus*; e Iturina A produzida por *B. subtilis* QST713 que controla a podridão de *Botrytis cinerea* e *Rhizoctonia solani* (PAL e GARDENER, 2006).

Não muito raro, pode ser que um único isolado apresente um amplo espectro de ações contra fitopatógenos devido a produção de substâncias antifúngicas, como relatado para *Bacillus coagulans* que mostrou um amplo espectro de atividade antifúngica contra os patógenos *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Phytophthora drechsleri*, *Fusarium oxysporum* e *Glomerella cingulata* (WANG et al., 2013).

Os fitopatógenos *B. cinerea*, *Colletotrichum acutatum* e *F. oxysporum* são agentes causadores de várias doenças em importantes cultivos vegetais. *B. cinerea* é conhecido como o agente causador da podridão cinzenta, principalmente em cultura de morango (SYLLA et al., 2015; FELIZIANI; LANDI; ROMANAZZI, 2015). É um dos maiores responsáveis por perdas de produção no campo e na pós-colheita. O uso de agentes de controle biológico é uma alternativa promissora no controle da podridão de *Botrytis* (HAMMAN, 2011). Compostos voláteis gerados por *Bacillus subtilis* JA já foram relatados como eficientes para o controle deste patógeno, sendo capaz de inibir tanto a germinação quanto a elongação dos tubos germinais de *B. cinerea* (CHEN et al., 2008).

A “queda prematura dos frutos cítricos” é uma doença causada pelo fungo *C. acutatum*. A medida predominante de controle é a pulverização com produtos químicos na época da florada. Vários produtos encontram-se registrados para esta finalidade, sendo mais eficientes os benzimidazóis, alguns triazóis e ftalimida (KUPPER e GIMENES, 2003). Entretanto, sob condições de elevada precipitação ou de chuvas prolongadas, os fungicidas têm eficiência limitada, principalmente, pelas dificuldades de aplicações, além de que os produtos são mais facilmente lavados. Considerando-se os custos financeiros e ambientais de tais aplicações, assim como as crescentes restrições à presença de resíduos nos frutos, faz-se necessário o estudo de novas alternativas (KUPPER et al., 2009). Entre estas, o controle biológico torna-se uma alternativa importante e tecnicamente justificável.

F. oxysporum é o fungo causador do mal do Panamá, uma infecção de bananeiras que tem devastado plantações no mundo inteiro, e tem uma gama de hospedeiros

relativamente ampla (PLOETZ, 2015). O controle biológico tem sido uma das propostas para a supressão da doença do Panamá, embora a estabilidade e sobrevivência dos microrganismos biocontroladores em campo seja ainda, em grande parte desconhecida (XUE et al., 2015). O controle biológico de *F. oxysporum* por microrganismos já tem sido validado em isolados como *Bacillus cereus*, que foi capaz de inibir 44,1% do crescimento de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (ABDALLAH et al., 2016); *B. amyloliquefaciens* (KIM et al., 2015; SOTOYAMA et al., 2016); *Streptomyces goshikiensis* (FAHEEM et al., 2015) e *Serratia marcescens* com uma taxa de 95.4% de inibição, provocada pelo envolvimento de chitinases e glucanases nesta atividade inibitória (TAN et al., 2015).

Além das bactérias, leveduras também podem produzir substâncias antimicrobianas que reduzem a infecção de fitopatógenos. Podem sintetizar uma variedade de compostos biologicamente ativos, como fitormônios, vitaminas, aminoácidos, enzimas, dentre outros, que ajudam no crescimento e desenvolvimento das plantas (IGNATOVA, 2015). Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima* e *Aureobasidium pullulans* já demonstraram atividade antifúngica contra *B. cinerea*. Através de atividade “killer”, as cepas de *W. anomalus* e *S. cerevisiae* mostraram formação de halos de inibição *in vitro* e as cepas de *W. anomalus*, *S. cerevisiae* e *M. pulcherrima* produziram compostos voláteis, que tiveram efeito *in vitro* e *in vivo* na inibição do crescimento do patógeno (PARAFATI, et al., 2015).

Mari et al. (2012) observaram que, quando uma suspensão de *A. pullulans* foi inoculada artificialmente em maçãs, foi possível controlar mais de 86 % da decomposição causada pelos patógenos *B. cinerea* (podridão cinzenta), *C. acutatum* (podridão amarga) e *Penicillium expansum* (mofo azul).

O uso de bactérias e leveduras como biocontroladores se mostra então como uma excelente opção para a luta contra os patógenos de planta e uma excelente alternativa para o uso de químicos, que são ofensivos ao ambiente e à saúde humana (SANTOYO et al., 2012).

3.0 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O trabalho propôs o estudo da diversidade bacteriana filogenética e funcional, a triagem por sequências gênicas relacionadas ao controle de fitopatógenos presentes em amostras de solo de floresta e de pastagem da bacia hidrográfica do Rio Mutum Paraná-RO empregando técnicas independentes de cultivo microbiano; bem como o isolamento e triagem de bactérias relacionadas ao controle de fitopatógenos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterização da diversidade bacteriana nas amostras de solo de pastagem e floresta através do sequenciamento de amplicons do gene RNA ribossômico 16S;
2. Análise e comparação do perfil funcional de amostras de solo de floresta e de pastagem por meio de sequenciamento *shotgun* pela plataforma Illumina;
3. Isolamento e caracterização de bactérias e leveduras obtidas a partir das amostras de solo de pastagem e de floresta;
4. Triagem dos isolados quanto ao potencial de antagonismo contra os fitopatógenos: *B. cinerea*, *C. acutatum* e *F. oxysporum*.
5. Identificação taxonômica dos isolados com potencial de antagonismo.

4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLAH, Rania Aydi Ben et al. Biocontrol of *Fusarium* wilt and growth promotion of tomato plants using endophytic bacteria isolated from *Nicotiana glauca* organs. **Biological Control**, v. 97, p. 80-88, 2016.
- ALLISON, Steven D.; MARTINY, Jennifer BH. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. Supplement 1, p. 11512-11519, 2008.
- ANTONOPOULOS, Dionysios A.; GLASS, Elizabeth M.; MEYER, Folker. Analyzing Metagenomic Data: Inferring Microbial Community Function with MG-RAST. **Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies**, 2010.
- CHEN, Hua et al. Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 5, p. 919-923, 2008.
- DIRZO, Rodolfo; RAVEN, Peter H. Global state of biodiversity and loss. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 28, n. 1, p. 137-167, 2003.
- DNPM. Departamento Nacional de Pesquisa Mineral. **PROJETO RADAMBRASIL**. Folha SC 20 Porto Velho: geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra. Rio de Janeiro, 1978.
- FAHEEM, Muhammad et al. Evaluation of the biocontrol potential of *Streptomyces goshikiensis* YCXU against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. **Biological Control**, v. 81, p. 101-110, 2015.
- FAORO, H. et al. 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.
- FELIZIANI, Erica; LANDI, Lucia; ROMANAZZI, Gianfranco. Preharvest treatments with chitosan and other alternatives to conventional fungicides to control postharvest decay of strawberry. **Carbohydrate polymers**, v. 132, p. 111-117, 2015.

- FUHRMANN, Jeffrey J. et al. (Ed.). **Principles and applications of soil microbiology**. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall, 417-420, 2005.
- GOOD, Irving J. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. **Biometrika**, v. 40, n. 3-4, p. 237-264, 1953.
- GUAN, Xiangyu et al. Soil bacterial communities shaped by geochemical factors and land use in a less-explored area, Tibetan Plateau. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 820, 2013.
- HAMMAN, FA. **Aspectos do controle biológico de *Botrytis cinerea* Pers. Ex. Fr. em videira**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria) Santa Maria, 2011.
- HANDELSMAN, Jo. Metagenomics or megagenomics? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 457-458, 2005.
- HERMANSSON, Anna; LINDGREN, Per-Eric. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 2, p. 972-976, 2001.
- IGNATOVA, Lyudmila V. et al. Plant growth-promoting and antifungal activity of yeasts from dark chestnut soil. **Microbiological Research**, v. 175, p. 78-83, 2015.
- INPE. Instituto Nacional de Pesquisas espaciais, 2014. Disponível em http://www.inpe.br/noticias/noticia.php?Cod_Noticia=3944. Acessado em 19 de junho de 2016.
- JESUS, Ederson da Costa et al. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **The ISME journal**, v. 3, n. 9, p. 1004-1011, 2009.
- JOHNSON, N. C.; GRAHAM, J.-H.; SMITH, F. A. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum. **New Phytologist**, v. 135, n. 4, p. 575-585, 1997.
- KIM, Mincheol et al. Analytical tools and databases for metagenomics in the next-generation sequencing era. **Genomics & informatics**, v. 11, n. 3, p. 102-113, 2013.

- KIM, Young Gwon et al. Antagonistic Activities of Novel Peptides from *Bacillus amyloliquefaciens* PT14 against *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 63, n. 48, p. 10380-10387, 2015.
- KIRK, Jennifer L. et al. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, n. 2, p. 169-188, 2004.
- KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: **Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria**. 1978. p. 879-882
- KUPPER, Katia C.; GIMENES-FERNANDES, Nelson; GOES, A. de. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia brasileira**, v. 28, n. 3, p. 251-257, 2003.
- KUPPER, Katia Cristina; BELLOTTE, J. A.; GOES, Antonio de. Controle alternativo de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 4, p. 1004-1015, 2009.
- LEE, Myung Hwan; LEE, Seon-Woo. Bioprospecting potential of the soil metagenome: novel enzymes and bioactivities. **Genomics & informatics**, v. 11, n. 3, p. 114-120, 2013.
- LEE, Seon-Woo et al. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 720-726, 2004.
- LEMOS, Leandro N. et al. Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. **Journal of microbiological methods**, v. 86, n. 1, p. 42-51, 2011.
- LIU, Wen-Tso; JANSSON, Janet K. **Environmental molecular microbiology**. Horizon Scientific Press, 2010.
- MAGURRAN, Anne E. **Measuring biological diversity**. Oxford, Blackwell Science, 256p. 2004.
- MARI, Marta et al. Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 73, p. 56-62, 2012.
- MAYR, Ernst. The species problem. In: Mayr, E. (ed.) American Association for the Advancement of Science, Washington, DC, p.1-22, 1957.

- MENDES, Lucas William et al. Land-use system shapes soil bacterial communities in Southeastern Amazon region. **Applied Soil Ecology**, v. 95, p. 151-160, 2015.
- MENDES, Lucas William. **Metagenome of Amazon forest conversion: impacts on soil-borne microbial diversity and functions**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2014.
- MELO, Adriano Sanches. O que ganhamos ‘confundindo’ riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade. **Biota Neotropica**, v. 8, n. 3, p. 21-27, 2008.
- MOCALI, Stefano; BENEDETTI, Anna. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 6, p. 497-505, 2010.
- NAVARRETE, Acacio A. et al. Soil microbiome responses to the short-term effects of Amazonian deforestation. **Molecular ecology**, v. 24, n. 10, p. 2433-2448, 2015.
- NIMER, E. Climatologia do Brasil. Rio de Janeiro, **IBGE** 2ª edição, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, 1989.
- NUNES, D. D. **Hidrovia do Madeira: (re) configuração, integração e meio ambiente**. Tese (Doutorado em Ciências Socioambientais) – Universidade Federal do Pará, Belém, 379 f. 2004.
- OGUNSEITAN, Oladele. **Microbial diversity: form and function in prokaryotes**. John Wiley & Sons, 2008.
- PAL, Kamal Krishna; GARDENER, B. McSpadden. Biological control of plant pathogens. **The plant health instructor**, v. 2, p. 1117-1142, 2006.
- PARAFATI, Lucia et al. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. **Food microbiology**, v. 47, p. 85-92, 2015.
- PAULA, Fabiana S. et al. Land use change alters functional gene diversity, composition and abundance in Amazon forest soil microbial communities. **Molecular ecology**, v. 23, n. 12, p. 2988-2999, 2014.
- PIMENTA, R. S. **Utilização de Leveduras predadoras como agentes de controle biológico de fungos filamentosos causadores de doenças pós-colheita**. Tese de

- Doutorado. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.
- PLOETZ, Randy C. Management of *Fusarium* wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. **Crop Protection**, v. 73, p. 7-15, 2015.
- RASHID, Muhammad Imtiaz et al. Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. **Microbiological research**, v. 183, p. 26-41, 2016.
- RODRIGUES, Jorge LM et al. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 3, p. 988-993, 2013.
- SANTOYO, Gustavo; OROZCO-MOSQUEDA, Ma del Carmen; GOVINDAPPA, M. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, n. 8, p. 855-872, 2012.
- SEDAM. Secretaria de Estado do Desenvolvimento Ambiental (SEDAM). Boletim Climatológico de Rondônia, ano de 2003/ SEDAM Porto Velho, 2005.
- SOTOYAMA, Kou; AKUTSU, Katsumi; NAKAJIMA, Masami. Biological control of *Fusarium* wilt by *Bacillus amyloliquefaciens* IUMC7 isolated from mushroom compost. **Journal of General Plant Pathology**, v. 82, n. 2, p. 105-109, 2016.
- SOUZA, Renata Carolini et al. Soil metagenomics reveals differences under conventional and no-tillage with crop rotation or succession. **Applied Soil Ecology**, v. 72, p. 49-61, 2013.
- STROBEL, Gary. Harnessing endophytes for industrial microbiology. **Current opinion in Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 240-244, 2006.
- STUBNER, Stephan. Quantification of Gram-negative sulphate-reducing bacteria in rice field soil by 16S rRNA gene-targeted real-time PCR. **Journal of microbiological methods**, v. 57, n. 2, p. 219-230, 2004.
- SULEIMAN, Afnan Khalil Ahmad et al. Shifts in soil bacterial community after eight years of land-use change. **Systematic and applied microbiology**, v. 36, n. 2, p. 137-144, 2013.

- SYLLA, Justine et al. Control of *Botrytis cinerea* in strawberries by biological control agents applied as single or combined treatments. **European Journal of Plant Pathology**, v. 143, n. 3, p. 461-471, 2015.
- TAN, Deguan et al. Identification of an Endophytic Antifungal Bacterial Strain Isolated from the Rubber Tree and Its Application in the Biological Control of Banana *Fusarium* Wilt. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0131974, 2015.
- VASCONCELLOS, Rafael LF et al. Bacterial community characterization in the soils of native and restored rainforest fragments. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 5, p. 947-957, 2014.
- VERMA, Digvijay et al. Cloning, expression and characteristics of a novel alkalistable and thermostable xylanase encoding gene (Mxyl) retrieved from compost-soil metagenome. **PLoS one**, v. 8, n. 1, p. e52459, 2013.
- WANG, Hai Kuan et al. Antifungal activity of *Bacillus coagulans* TQ33, isolated from skimmed milk powder, against *Botrytis cinerea*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 51, n. 1, p. 78-83, 2013.
- XUE, Chao et al. Manipulating the banana rhizosphere microbiome for biological control of Panama disease. **Scientific reports**, v. 5, 2015.
- ZEYAUULLAH, Md et al. Metagenomics-An advanced approach for noncultivable microorganisms. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 4, n. 3, p. 49-54, 2009.
- ZHAO, Jun et al. Responses of bacterial communities in arable soils in a rice-wheat cropping system to different fertilizer regimes and sampling times. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e85301, 2014.

**CAPÍTULO 01- DIVERSIDADE TAXONÔMICA E FUNCIONAL DAS
COMUNIDADES BACTERIANAS APÓS CONVERSÃO DE ÁREAS DA
FLORESTA AMAZÔNICA EM PASTAGEM NA BACIA HIDROGRÁFICA DO
RIO MUTUM-PARANÁ-RO.**

Thamar Holanda da Silva, Alan Emanuel Silva Cerqueira, Sérgio Oliveira de Paula, Adriana Cristina da Silva Nunes, Dorisvalder dos Dias Nunes, Luiz Cleiton Holanda Lobato, Pedro Marcus Pereira Vidigal, Cynthia Canêdo da Silva.

RESUMO

SILVA, Thamar Holanda da, Universidade Federal de Viçosa, Julho, 2016. **Diversidade funcional e taxonômica das comunidades bacterianas após conversão de áreas da floresta Amazônica em pastagem.** Orientadora: Cynthia Canêdo da Silva. Co-orientador: Marcos Rogério Tótola.

As florestas tropicais abrangem sozinhas a maior biodiversidade terrestre do mundo, e as mesmas tem sofrido drasticamente os impactos do desmatamento que visam à expansão das terras agrícolas e locais de pastagem. A pressão antrópica exercida sobre a Bacia hidrográfica do rio Mutum Paraná (BHRMP) localizada em Rondônia-Brasil tem acarretado uma rápida conversão das áreas florestais em pastagem. Os microrganismos do solo são responsáveis por uma ampla diversidade de funções, e estão diretamente ligados à ciclagem de nutrientes do solo, respondendo às alterações da conversão de florestas em pastagem. Novas tecnologias de sequenciamento têm permitido um maior acesso à estas comunidades microbianas, de modo a nos levar à uma maior compreensão de como as mesmas respondem às mudanças ocasionadas pelas alterações no uso do solo. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivos caracterizar a diversidade taxonômica e funcional de populações bacterianas provenientes de amostras de solo da BHRMP, visando um melhor entendimento da ecologia destes microrganismos. Os filos característicos do solo de floresta foram BHI80-139 e SBR1093, enquanto BRC1, LD1, Lentisphaerae e OP3 apareceram somente em solos de pastagem. Os filos que demonstraram um aumento na abundância relativa após a conversão foram Verrucomicrobia, Firmicutes, Chloroflexi e Bacteriodetes enquanto os filos WPS-2, Proteobacteria, Actinobacteria e Acidobacteria diminuíram. Os índices de diversidade mostraram que os solos de pastagem possuíam maior diversidade de espécies. Atribuímos este resultado ao clímax dos ecossistemas de floresta, enquanto nos pontos de pastagem, o evento de estresse, devido à ação antrópica, pode ter levado ao aumento da diversidade microbiana como forma de responder ao distúrbio. Na análise funcional foi possível notar que o ambiente de pastagem obteve um maior número de genes relacionados à dormência/esporeação, resposta ao stress e metabolismo de aminoácidos.

Genes associados com resistência a antibióticos foram menos abundantes em pastagem do que em floresta. Sendo assim, este trabalho foi uma oportunidade única para explorar como as comunidades microbianas interagem nestes solos da BHRMP, e sugerimos que as alterações deste tesouro inestimável e ainda pouco conhecido que é a diversidade microbiana, seja levada em consideração em estudos de impacto ambiental e políticas de uso da terra.

Palavras-chave: diversidade bacteriana, RNAr 16S, metagenômica, Amazônia.

ABSTRACT

SILVA, Tamar Holanda, M. Sc. Universidade Federal de Vicosa, July, 2016. **Functional and taxonomic diversity of bacterial communities after conversion areas of the Amazon forest to pasture.** Advisor: Cynthia Canêdo da Silva. Co-advisor: Marcos Rogério Tótola.

Rainforests represent the largest terrestrial biodiversity in the world, and they have suffered dramatically the impacts of deforestation aiming the expansion of agricultural land and pasture sites. The anthropic pressure on the area of the hydrographic basin Mutum-Paraná river (BHRMP) in the state of Rondonia, Brazil has led to a rapid conversion of forests into pasture areas. Soil microorganisms are responsible for a wide range of functions, and they are directly linked to cycling soil nutrients. Thus, they also respond to the conversion of forests to pasture. With new sequencing technologies it is possible to get a greater access to these microbial communities, in order to lead us to a greater understanding of how they respond to changes caused by changes in land use. In this context, this study aims to characterize the taxonomic and functional diversity of bacterial populations from soil samples of BHRMP, seeking a better understanding of the ecology of these microorganisms. Phyla characteristics of forest soil were BHI 80-139 and SBR1093 whereas BRC1, LD1, Lentisphaerae and OP3 appeared only in pasture soils. The phyla that had their relative abundance increased after conversion were Verrucomicrobia, Firmicutes, and Chloroflexi Bacteroidetes and the phyla WPS-2 Proteobacteria, Actinobacteria and Acidobacteria had their abundance decreased. Although the number of OTU's found in forest soils was higher, the diversity indices showed that pasture soils have greater diversity. We can say that forest environments can be considered to be in a state of equilibrium (lower diversity), and that stress event, due to deforestation, can lead to an increased microbial diversity, as observed in the pasture points. The functional analysis showed that the pasture environment had more genes related to dormancy / sporulation, stress response and metabolism of amino acids and may be related to a community that is exposed to many environmental fluctuations

throughout the day. Genes associated to resistance to antibiotics were less abundant in pasture than in forest. This maybe related to a less competition in the community in the pasture environment, because the adaptations that increase competition may be less important than those that make the persistence of cells possible under adverse environmental conditions. Thus, with this work it was possible to explore how microbial communities interact at the BHRMP soil, and it also suggests that the conservation of this priceless treasure that still little known, should be taken into consideration into environmental impact studies and land use policies.

Key-words: bacterial diversity, 16S rRNA, Metagenomics, Amazon.

1.0 INTRODUÇÃO

As florestas tropicais compreendem cerca de 7% da superfície terrestre, porém, sozinhos, estes sistemas abrangem mais de 60% da biodiversidade de plantas e animais do mundo (DIRZO; RAVEN, 2003). A floresta tropical Amazônica tem sofrido drasticamente com a redução das suas áreas através do desmatamento, que visam principalmente a expansão das terras agrícolas (PAULA et al., 2014). As ações antrópicas são sem dúvida o principal fator responsável pela perda da biodiversidade, sendo essa perda a principal mudança ambiental global e irreversível que a Terra enfrenta atualmente (DIRZO; RAVEN, 2003). A estimativa da taxa anual do desmatamento na Amazônia Legal aponta que foram desmatados 5.012 km² no período de agosto de 2013 a julho de 2014 (INPE, 2014).

O solo é um sistema complexo e heterogêneo que abriga grande diversidade biológica, e a maior parte de sua biomassa é constituída por microrganismos. Essa representatividade no meio ambiente é um fator crucial para regulação e funcionamento dos ecossistemas, sendo que essa enorme diversidade taxonômica é espelhada pelas várias funções, abrangendo uma série aparentemente infinita de fisiologias e estratégias de vida (FIERER et al., 2012).

Os microrganismos do solo mostram-se favoráveis como marcadores biológicos, podendo ser utilizados no reconhecimento de ecossistemas modificados. Atuam como indicadores capazes de refletir pequenas mudanças nas propriedades do solo, antes mesmo que alterações nos teores de matéria orgânica possam ser detectados, tornando possível evidenciar alterações antrópicas nestes ambientes. Porém, a despeito de sua importância econômica e/ou ambiental, ainda existem grandes lacunas no nosso conhecimento do ponto de vista das prospecções científicas.

Mesmo com o crescente número de estudos a respeito das alterações da microbiota do solo Amazônico, ainda se faz necessário um levantamento a respeito do efeito das mudanças no uso da terra sobre as propriedades físico-químicas e suas relações com grupos específicos de microrganismos (MENDES et al., 2015 a). Isto cria caminhos para

que a diversidade microbiana possa ser levada em conta na avaliação do impacto que as alterações do uso do solo podem causar (RODRIGUES et al., 2013; MENDES, 2014).

As novas tecnologias de sequenciamento têm permitido a caracterização do DNA extraído diretamente das amostras ambientais, sem necessariamente passar pela etapa de clonagem. Isto tem refletido num número cada vez maior, tanto quantitativamente quanto qualitativamente, de informações a respeito das comunidades microbianas dos mais diversos biomas e ecossistemas.

A maioria das ferramentas de análise molecular de dados¹ baseiam-se na análise de um único gene (geralmente os que codificam RNAr) descrevendo a estrutura da comunidade microbiana, porém a despeito das abordagens funcionais, relativamente pouco tem sido realizado (ANTONOPOULOS et al., 2010).

A crescente pressão antrópica na bacia hidrográfica do rio Mutum-Paraná-Rondônia (BHRMP) tem acarretado um rápido processo de conversão de floresta ombrófila em áreas de pastagem. Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivos caracterizar a diversidade taxonômica de populações bacterianas provenientes de amostras de solo da BHRMP, inferir quais atributos do solo são responsáveis pela mudança na distribuição da biodiversidade entre os solos e analisar os efeitos desta conversão sobre as propriedades funcionais destas comunidades.

2.0 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Um total de 20 amostras de solo foram obtidas em áreas de diferentes usos e manejos do solo (Figura 01), sendo 10 amostras de pastagem e 10 amostras de floresta, a partir de uma grade de 10 x 10 km², considerando os diferentes tipos de solos conforme realizado em trabalho anterior (NUNES, 2012). Para tanto, obteve-se o apoio logístico dos pesquisadores do Laboratório de Geografia e Planejamento Ambiental – LABOGEOPA, da Universidade Federal de Rondônia (UNIR), sob financiamento do CNPq, em conjunto com o Grupo de Estudos e Pesquisas em Biologia Experimental e Diagnóstico por DNA – GEPDNA/UNIR.

A coleta foi realizada em uma área de 1 m². Essa área foi superficialmente limpa para retirada da matéria orgânica em decomposição e, em seguida, foram retiradas 5 subamostras de solo (Figura 02) de uma profundidade entre 0 e 20 cm com o auxílio das seguintes ferramentas: Material de jardinagem, luvas cirúrgicas para evitar contaminação, enxada, faca e trado holandês. As 5 subamostras foram unidas em um recipiente (saco plástico) e misturadas originando uma amostra composta que foi conservada em gelo até o retorno ao laboratório. O montante coletado sempre foi acima de 2 Kg . Para que se evitasse contaminação, a cada coleta, as ferramentas foram devidamente “lavadas” em água corrente e álcool 70%. Uma parcela de cada amostra de solo foi destinada à análise dos componentes físico-químicos do solo na sede da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA RONDÔNIA – CPAFRO) localizada em Porto Velho, Rondônia (Tabela suplementar 02).

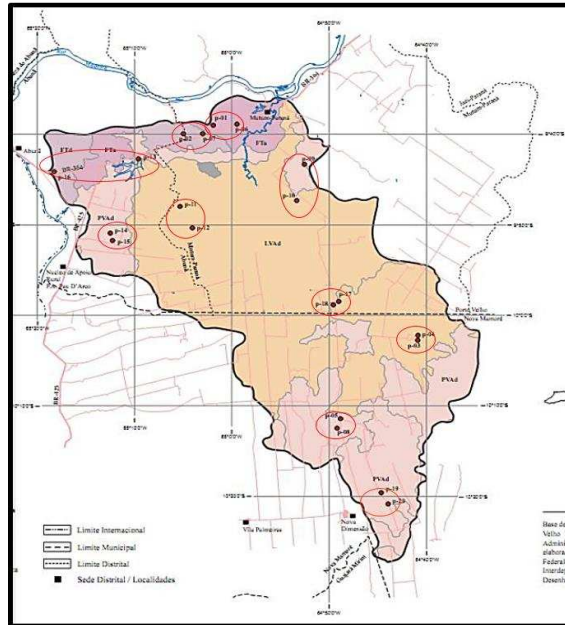


Figura 01: Localização dos 20 pontos de coleta na Bacia hidrográfica do rio Mutum Paraná-RO.

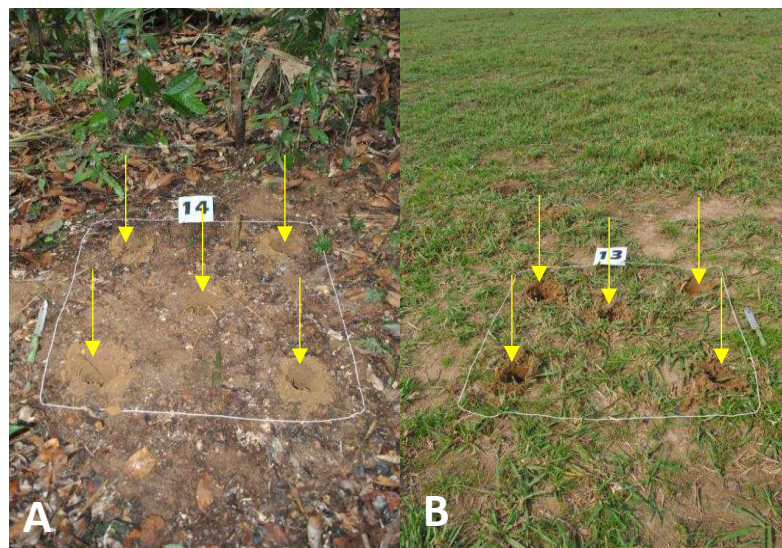


Figura 02: Transecto contendo cinco pontos sub-amostrais que compõe cada ponto amostral de solo. A) Floresta ponto 14 e B) Pastagem ponto 13.

2.2 Extração de DNA total das amostras de solo

A extração do DNA total das amostras dos 20 pontos de coleta foi realizada em duplicata com 0,5 g de solo de cada ponto coletado, utilizando o Kit comercial *PowerSoil DNA Isolation* (MoBio) (MoBio Labs, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. A eficiência do método de extração e a qualidade do material extraído foram

avaliados por meio da eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com *GelRed* (Uniscience) e visualização em transluminador e através do espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, USA).

2.3 Sequenciamento dos genes RNAr 16S e análise da diversidade microbiana

Após a extração do DNA total, as duplicatas das amostras dos 20 pontos foram enviadas para sequenciamento de amplicons do gene RNAr 16S utilizando a plataforma Miseq-Illumina pela empresa Argonne (EUA).

A triagem dos dados de sequências e análise da diversidade microbiana foram realizadas nas plataformas BMP (*Brasilian Microbiome Project*) (PYLRO et al., 2014) e QUIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) (CAPORASO et al., 2010), e o banco de dados utilizado foi o do *Green Genes* (DESANTIS et al., 2006).

Análises multivariadas foram aplicadas para estabelecer correlações entre dados abióticos (características químicas do solo) e bióticos (diversidade de espécies) utilizando o programa CANOCO (TER BRAAK e SMILAUER, 2002). As análises estatísticas foram realizadas no programa MiniTab 17 (RYAN et al., 1994).

2.4 Sequenciamento *shotgun*

Após a extração do DNA total de cada amostra de solo, foram realizados dois *pools*: i) *pool* de DNA extraído de quatro amostras de pastagem (MG RAST 4698222.3) e ii) *pool* de DNA extraído de quatro amostras de floresta (MG RAST 4698223). Os dois *pools* de DNA metagenômico, floresta e pastagem, foram enviados para sequenciamento na plataforma Hiseq-Illumina pela empresa BGI (*Beijing Genomics Institute*, China).

Os dados obtidos foram anotados pelo MG-RAST (MEYER et al., 2008) e pelo CLC *genomics* (CLCBio), os quais permitiram uma análise funcional dos dados.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Diversidade Microbiana

Através do sequenciamento de amplicons do gene RNAr 16S foram obtidos dados de sequências gênicas que nos permitiram a análise de diversidade bacteriana das amostras em estudo. Através das curvas de rarefação, foi possível observar as OTUs (*Operational Taxonomic Units*) amostradas para cada ambiente, pastagem e floresta (Figura 03) e as OTUS por amostra, 10 amostras de floresta e 10 amostras de pastagem (Figura 04). O número de OTUs por amostra pode ser analisado na Tabela Suplementar 01.

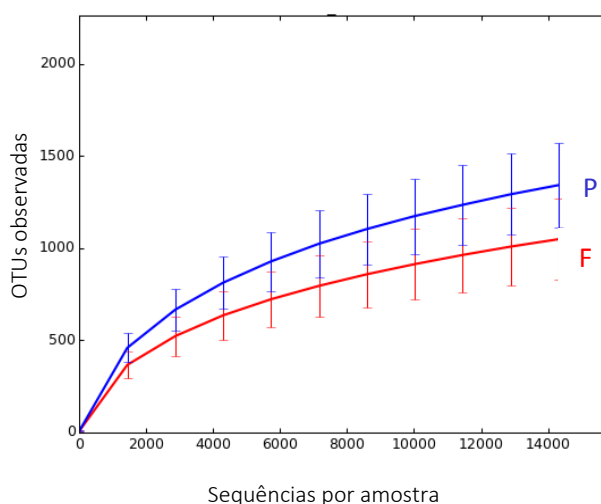


Figura 03: Curva de rarefação normalizada das OTUs observadas para os dois diferentes ambientes. Linha vermelha representando floresta e linha azul a pastagem, ao nível de espécie (97%).

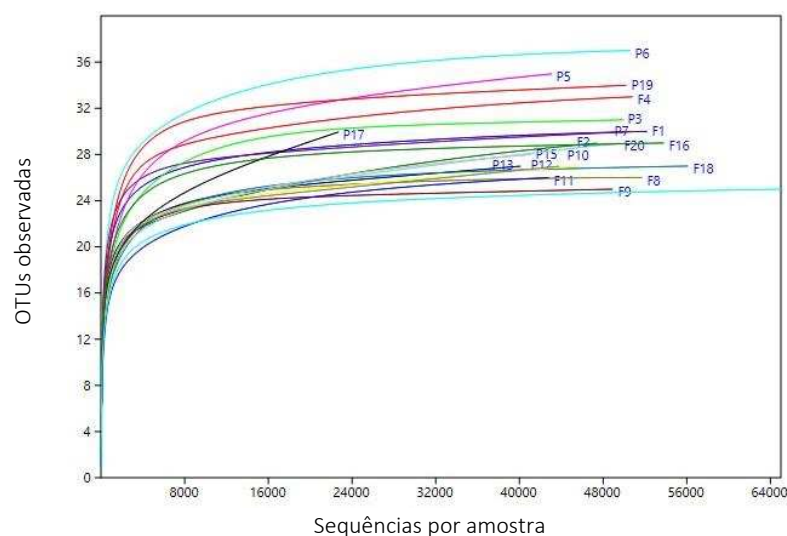


Figura 04: Curva de rarefação das OTUs observadas ao nível de Filo para cada ponto amostral dos dois diferentes ambientes. **P:** amostras de pastagem e **F:** amostras de floresta.

Observou-se que na distância evolutiva ao nível de espécie as curvas para floresta e pastagem estão ascendentes, mas tendendo a um platô. Enquanto na distância evolutiva de filo já observamos pela maioria das curvas a formação de um platô, indicando que o esforço amostral foi suficiente para cobertura dos diferentes filios presentes nas amostras.

Os filios mais abundantes nas amostras de floresta e pastagem foram os mesmos, entretanto se diferenciaram nos valores de abundância de OTUs (Figura 05). Observou-se para floresta e pastagem respectivamente, 31,03% e 28,16% de Acidobacteria, 26,66% e 23,35% de Proteobacteria, 14,49% e 13,09% de Actinobacteria, 5,4% e 8,51% de Firmicutes e 2,67% e 4,86% de Chloroflexi (Tabela Suplementar 03). Os filios específicos de cada ambiente, não foram os mais abundantes. As amostras de floresta apresentaram apenas dois filios específicos: BHI80-139 e SBR1093, enquanto nas amostras de pastagem observamos BRC1, LD1, Lentisphaerae e OP3.

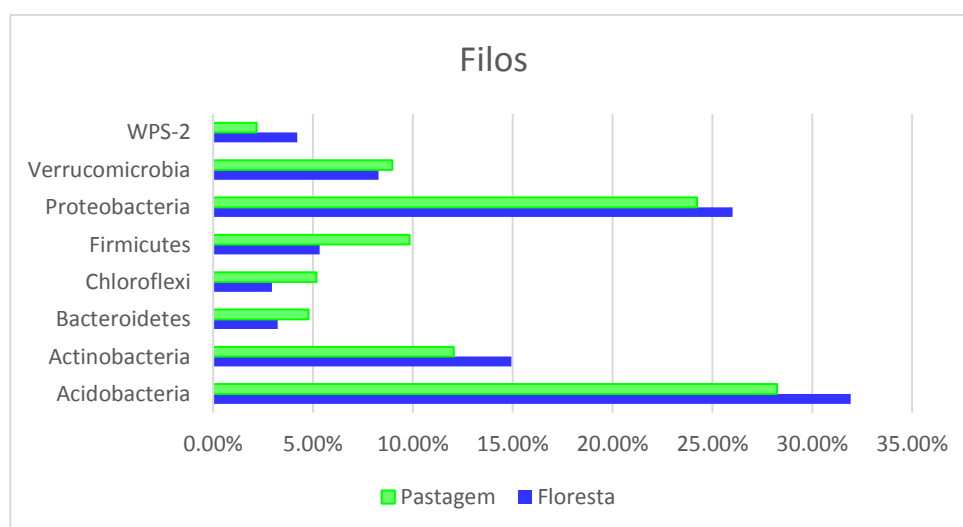


Figura 05: Abundância em porcentagem absoluta dos principais Filos do Domínio Bacteria para solo de floresta e pastagem.

Para auxiliar na compreensão de como as comunidades microbianas responderam à conversão da floresta em pastagem, os fatores químicos do solo foram mensurados e plotados juntos com os 20 pontos amostrais em uma Análise de Componentes Principais (PCA) (Figura 06) (Tabela Suplementar 02). É possível observar uma evidente segregação dos dois ambientes, onde os vetores de matéria orgânica (MO), capacidade

de troca catiônica (CTC), teor de Al, saturação por alumínio (m), teor de fósforo (P) e potencial de acidez (H+Al) estão mais relacionados aos pontos de floresta, ao passo que os de pH, teores de Cu, Ca, Mg, Fe, Mn, K, e saturação por bases (V), estão mais correlacionados com os pontos de pastagem.

Elementos como Mg, K e Ca são requeridos para o crescimento de todos os organismos vivos. Íons de magnésio são requeridos por um grande número de enzimas para sua ação catalítica, seja utilizando ou sintetizando ATP (NAVARRETE et al., 2013). Porém, a forma como os filos bacterianos responderam às diferenças químicas do solo fez possível a observação da segregação entre a distribuição dos pontos amostrais de floresta e pastagem (Figura 06 e Figura 07).

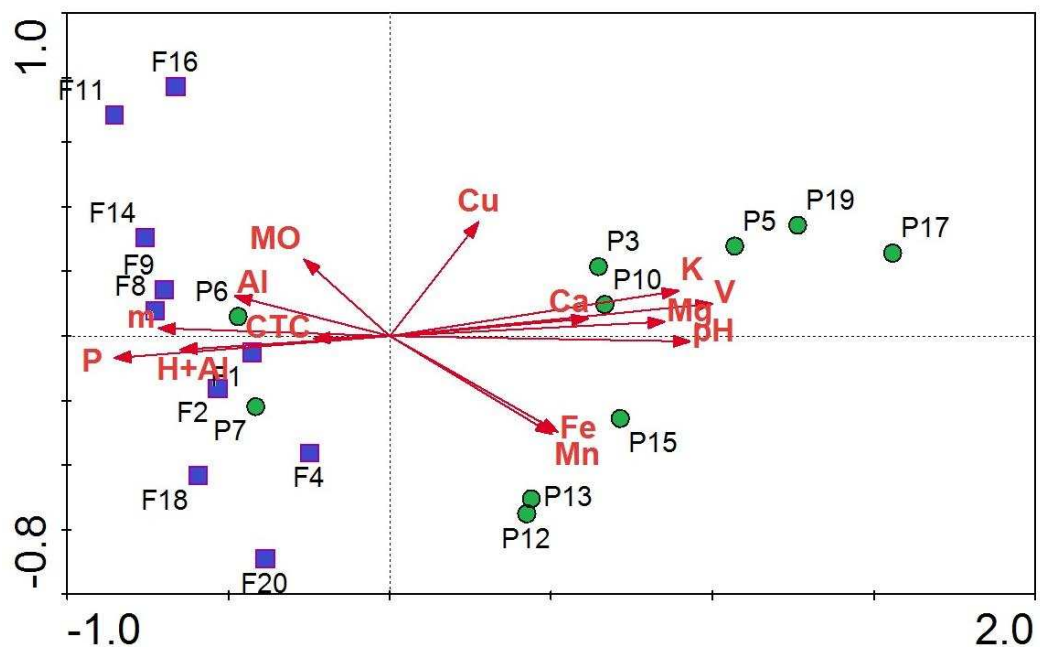


Figura 06: Análise de Componentes Principais entre pontos amostrais e dados químicos do solo. Círculos em verde representam as amostras de pastagem e quadrados em azul representam as amostras de floresta. A direção do vetor indica um aumento para determinada variável ambiental.

Na análise de Componentes Principais (Figura 7), observamos que os filos Planctomycetes, Chloroflexi e Bacteroidetes foram mais relacionados com a maioria das amostras de pastagem, enquanto os demais foram relacionados com amostras de floresta. Entretanto, como observado na Figura 5, isso não significa que os demais filos não foram observados nas amostras de pastagem.

O filo Acidobacteria é relatado pela literatura por ser um dos filios mais representativos em floresta Amazônica, e responde ao desmatamento com uma diminuição na abundância relativa nos solos de pastagem da Amazônia (MENDES et al., 2015 a; NAVARRETE et al., 2013; RODRIGUES et al., 2013). Membros cultiváveis do filo Acidobacteria são oligotróficos, e respondem negativamente aos aumentos em carbono e pH, o que explicaria a diminuição da proporção de sequências detectadas para este filo após a conversão de floresta para pastagem (RODRIGUES et al., 2013). Em nosso trabalho, a mesma resposta foi observada para este filo, e pode ser notada tanto na proporção de sequências (Figura 05), quanto no vetor de pH, que se encontra numa direção oposta ao vetor do filo Acidobacteria (Figura 06 e 07).

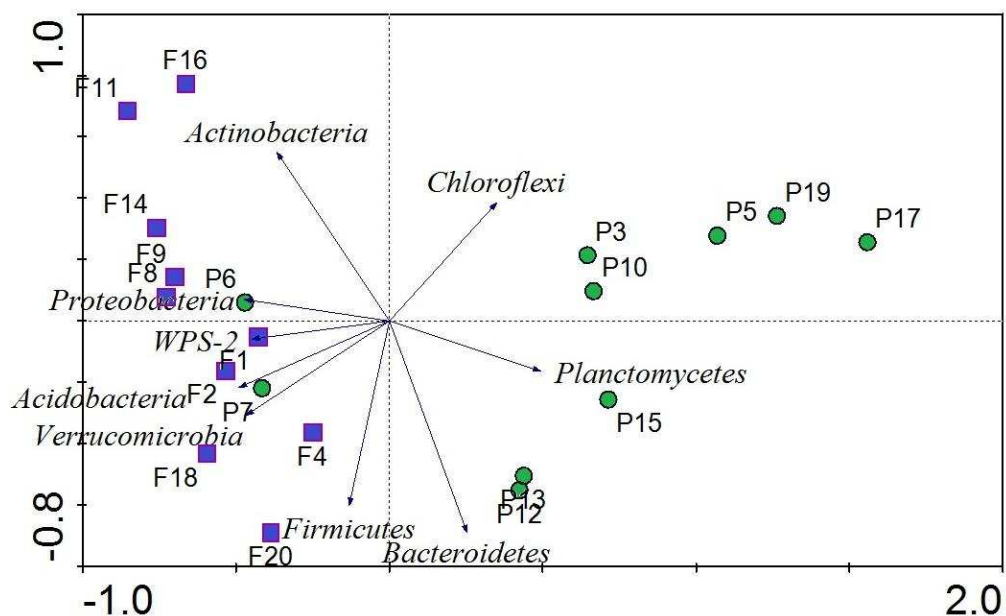


Figura 07: Análise de Componentes Principais dos pontos amostrais dos ambientes, baseada na abundância dos filios bacterianos. Amostras de pastagem foram marcadas em círculos verdes, e amostras de floresta em quadrados azul. A direção do vetor indica um aumento para determinada variável ambiental.

Em estudos visando apenas o filo Acidobacteria, que é composto por vários subgrupos, foi observado que estes podem responder diferentemente às mudanças dos fatores bióticos do solo. Enquanto alguns subgrupos (1-8, 10, 11, 13, 17, 18, 22 e 25) são detectados sendo dominantes em todas as amostras de solos (solo rizosférico de soja e solo florestais), outros (4, 6 e 7) respondem à diminuição de alumínio no solo, sendo que podem também responder ao maior conteúdo de Ca, B, Mg e Mn. O estudo de subgrupos

abre portas para o uso de bioindicadores das mudanças causadas no manejo do solo em sistemas agrícolas da Amazônia (NAVARRETE et al., 2015 c).

Proteobacteria é marcadamente um filo que apresenta alta abundância em vários tipos de amostras de solo. Entretanto comparando solo de floresta, solo desmatado, solo agrícola e solo de pastagem, os solos de floresta apresentam maior abundância relativa deste filo (MENDES et al., 2015 a). Esta maior distribuição está ligada ao teor de Al, Mn e m, sendo o conteúdo de matéria orgânica (MO) também correlacionado positivamente com o filo (NAVARRETE, et al., 2015 a). Resultado também observado neste trabalho para as amostras de floresta, exceto o Mn que foi mais relacionado com as amostras de pastagem (Figuras 06 e 07). Quando em solos desmatados, este filo junto com Actinobacteria são relatados por serem relacionados ao metabolismo dos nutrientes N, P, K, S (NAVARRETE, et al., 2015 a).

Foi observada uma diminuição de 2,89% de OTUs do filo Actinobacteria na transição de floresta para pastagem (Figura 05). Resultados semelhantes foram encontrados por Jesus et al. (2009), onde metade das sequências do filo pertenceram às amostras florestais quando comparadas com solos de pastagem e solo agrícola. Embora Mendes et al. (2015a) tenham encontrado uma maior abundância de Actinobacteria em solos desmatados, o filo teve uma correlação significativa com o índice de saturação de Al, e o mesmo foi verificado no presente trabalho (Figura 07). Tal resultado sugere que a saturação de Al esteja influenciando a distribuição diferencial de Actinobacteria, tanto no presente trabalho como em Mendes et al. (2015a).

Outro filo que aumentou sua abundância na conversão de floresta para pastagem foi o Chloroflexi. Nos trabalhos de Mendes et al. (2015a) e Rodrigues et al. (2013), este filo também apresentou uma alta abundância em solos desmatados. Alguns membros deste filo são termófilos aeróbios, que crescem em altas temperaturas, e tem importante papel na decomposição de matéria orgânica (YAMADA et al., 2005). Isto possivelmente explicaria sua maior incidência em áreas desmatadas ou áreas de pastagem, pois são locais onde há maior incidência de luz solar e consequentemente expostos a maiores temperaturas.

Após a conversão da floresta em pastagem, o filo Firmicutes apresentou um aumento de 4,5%. O mesmo comportamento foi relatado por Mendes et al. (2015a) e Rodrigues et al. (2013), que observaram o aumento da abundância deste filo e explicaram

que tal comportamento seria devido à maior resistência a dessecação e variações ambientais extremas que espécies deste filo apresentam. Sendo assim, mais resistentes a variações de temperatura do solo ao longo do dia.

Em estudo comparando o comportamento do filo Verrucomicrobia em área desmatada e área florestal adjacentes na Amazônia, o filo respondeu ao aumento da fertilidade, após desmatamento (devido à incorporação dos nutrientes oriundos das cinzas), através de uma diminuição da abundância relativa. O filo foi relatado como sendo sensível às mudanças químicas, ligadas a fertilidade, que ocorrem no solo (NAVARRETE et al., 2015b). Estes resultados diferem em parte dos encontrados no presente trabalho, pois mesmo que a diferença tenha sido apenas de 0,69%, os pontos de pastagem apresentam maior abundância do filo. Porém quando analisados os pontos individualmente, notamos que o P7 é um dos pontos de pastagem com maior abundância de OTUs para o filo Verrucomicrobia, o que poderia ser uma das explicações para o ponto estar mais relacionado aos de floresta no PCA, do que com os outros pontos de pastagem (Figura 07).

O filo WPS-2 foi primeiramente relatado em solos contendo poluição de bifenil-policlorado (NOGALES et al., 2001). Também há relatos de uma alta abundância de WPS-2 em solos da Antártica (JI et al., 2015) e em solos de nascentes ácidas (*Paint Points Springs*) no Canadá (GRASBY et al., 2013). Porém as funções metabólicas destes microrganismos e o papel que os mesmos desempenham ainda permanecem desconhecidos. Nas nossas amostras, o filo WPS-2 na floresta obteve o dobro da abundância observada nas amostras de pastagem, podendo ser reflexo do menor pH observado nas amostras de floresta (Tabela suplementar 02).

Em um estudo comparativo de 88 amostras de solo das Américas do Norte e do Sul, Lauber et al. (2009) mostraram que os filios mais abundantes respondiam principalmente a alteração de pH entre as amostras de solo, e que o filo Bacterioidetes se encontrava em maior abundância nos solos com maiores valores de pH. Isto pode explicar o mesmo ter sido observado em maior abundância nos postos de pastagem. Na região Amazônica, Bacterioidetes também já foi encontrado em maior abundância nos solos de pastagem, quando comparados aos solos de floresta (JESUS et al., 2009; MENDES, et al., 2015b).

Através da comparação das amostras de pastagem e floresta pelo diagrama de *Venn*, conseguimos observar a ocorrência de grupos compartilhados e específicos pelas duas

amostras (Figura 08). As amostras de floresta apresentaram apenas dois filos específicos: BHI80-139 e SBR1093, enquanto nas amostras de pastagem observamos BRC1, LD1, *Lentisphaerae* e OP3.

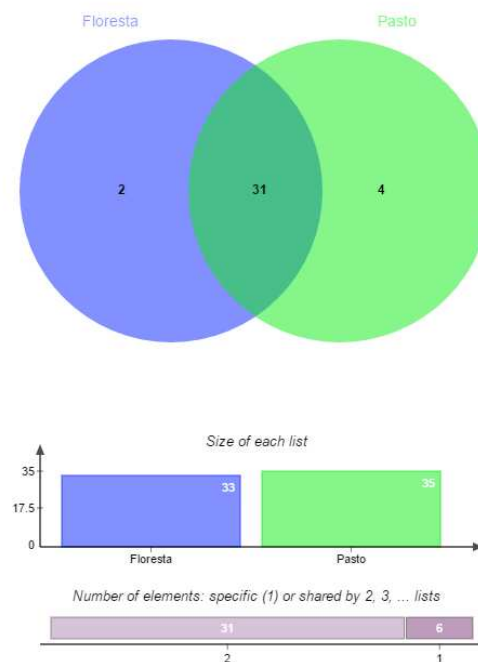


Figura 08. Diagrama de *Venn* mostrando a proporção de filos compartilhados e específicos entre as amostras de floresta e pastagem.

Até o momento não haviam relatos para a presença do filo BHI80-139 em solos de florestais tropicais, apenas para áreas de cultivo (PERSHINA et al., 2015), ambientes aquáticos (BOBROVA et al., 2015; KACHIURU et al., 2013; STEINERT et al., 2015), e fendas termais (HE et al., 2015). Para o filo SBR 1093, há relatos em solos de cavernas na China (ZHOU et al., 2007), e pertencendo à comunidade microbiana responsável pela recuperação de solos contaminados com hidrocarbonetos (RAMADASS et al., 2015).

Em relação aos filos encontrados somente na amostra de pastagem, podemos destacar o *Lentisphaerae*, pois seus membros podem ser aeróbios ou anaeróbios, e alguns podem ser característicos da microbiota intestinal de mamíferos (MYER et al., 2015). Este fato pode justificar sua maior abundância nas amostras de pastagem. BRC1 foi encontrado em solos de pradaria (ELSHAHED, 2008) e em solo rizosférico e não-

rizosférico (LAGOS et al., 2014). O presente trabalho é o primeiro relato deste filo em áreas de pastagem.

O filo OP3 é formado por espécies ainda não cultivadas, identificadas partir de sequências de RNAr 16S. Membros deste filo já foram encontrados em ambientes anóxicos incluindo sedimentos marinhos, mar hipersalino, lagos de água doce, aquíferos, águas de infiltração de caverna, solos de arroz inundados e reatores metanogênicos (GLÖCKNER et al., 2010). Até o momento não havia sido relatado membros deste filo, nem do filo LD1 para solo. LD1 está na lista de linhagens não reconhecidas oficialmente do banco de dados SILVA (<http://www.arb-silva.de>) e entre os poucos relatos, foi encontrado presente em sedimento de uma nascente rica em enxofre (YOUSSEF; STEIDLEY e ELSHAHED, 2012), fossas calcárias contendo água (SAHL et al., 2011) e sedimentos de caverna (DE MANDAL; SANGA e NACHIMUTHU, 2014). Estes filios ainda não foram extensivamente cultivados e estudados, não havendo uma compreensão de sua atuação para este ecossistema, portanto seus papéis em cada um desses ambientes ainda permanecem desconhecidos.

O índice de Shannon quando aplicado para as amostras de pastagem e floresta, mostrou uma grande diversidade de espécies presentes em ambos ambientes, sendo maior o valor encontrado para pastagem (Tabela 01). O índice de Shannon é baseado na abundância proporcional das espécies, levando em conta tanto a uniformidade (equitabilidade) quanto a riqueza de espécies. O aumento do número de espécies ou o aumento da uniformidade das abundâncias aumenta a diversidade (MAGURRAM, 2004).

A estimativa de riqueza total pelo índice de Chao-1 nos mostra que os valores de espécies esperadas para as amostras de floresta são menores quando comparados aos esperados para pastagem. Observou-se uma cobertura de aproximadamente 99% para as duas amostras, indicando que o esforço amostral foi suficiente para reproduzir a comunidade observada nas amostras de pastagem e floresta (Tabela 01). Uma cobertura mínima de 90 % significa que os índices de diversidade calculados são os mais próximos possíveis da realidade (GOOD, 1953; LEMOS et al., 2011).

Os resultados encontrados neste trabalho concordam com trabalhos anteriormente realizados em solos Amazônicos, onde os mesmos também trazem uma maior diversidade para os solos de pastagem quando comparados aos solos de floresta (JESUS et al., 2009; RODRIGUES et al., 2013; MENDES et al., 2015 a; NAVARRETE et al., 2015 a). Esta

diferença parece seguir um padrão entre os dois ambientes comparados no presente trabalho, pois mesmo em localizações diferentes de amostragem é possível observar a grande maioria dos pontos analisados apresentando a mesma resposta das comunidades bacterianas (Figura suplementar 01), por isso os resultados de cada um dos 20 pontos amostrais foram unidos e calculados como média para cada ambiente (Tabela 01).

Tabela 01: Média dos índices de diversidade obtidos para amostras de pastagem e floresta na distância evolutiva de 0,03.

	Floresta	Pastagem
Total de OTUs	519.851	439.692
Riqueza (S)	1.675	2.053
Shannon (H)^a	7,735 ± 0,463	8,489 ± 0,404
Chao-1^b	2.100 ± 344	2.518,1 ± 183,1
Cobertura^c	99,12%	98,73%

^a Índice de diversidade que indica a riqueza de espécies, considerando a abundância de táxons individuais. Um maior número indica maior diversidade.

^b Estimador não-paramétrico usado para prever riqueza de espécies (número total de OTUs presentes), baseado em *singletons* e *doubletons*.

^c Estimador da proporção da diversidade total amostrada.

Nas linhas dos índices de Shannon e Chao para cada ambiente, os valores do desvio padrão são indicados com ± e diferem significativamente pelo teste ANOVA, confirmado pelo teste de Tukey (P < 0.05).

Após um distúrbio, a composição da comunidade pode ser resistente e não mudar, pode ser alterada e rapidamente voltar à composição original (resiliência), ou pode permanecer alterada, que pode implicar numa mudança funcional (SULEIMAN et al., 2013). E de acordo com Connell (1978), após um distúrbio intermediário, a diversidade tende a aumentar. Se o equilíbrio é alcançado, um menor grau de diversidade pode ser mantido por um nicho de diversificação. Considerando nossas amostras, os ambientes de floresta poderiam ser considerados como estando em um estado de equilíbrio (menor diversidade), e que o evento de estresse, devido ao desmatamento, poderia ter levado ao aumento da diversidade microbiana, como observado no ponto de pastagem.

3.2 Análise Funcional de *pools* metagenômicos

3.2.1 Montagem de contigs

A partir de um total de 185.495.321 pares de base para a amostra de pastagem e 151.542.185 para a amostra de floresta, usando algoritmo de montagem *De-novo*

Assembly do *CLC Genomics* 6.5.1 (BIO, 2007), foram montados e obtidos 543.116 *contigs* para pastagem e 421.513 para floresta. O tamanho dos *contigs* de floresta variou de 200 a 15.235 kB com um N50 de 343 pares de base (pb), e os de pastagem variaram de 200 a 23.680 kB com N50 de 328 pb. Destes *contigs*, 38.364 de pastagem e 31.178 de floresta foram classificados dentro do Domínio Bacteria segundo o banco de dados do Genbank. Após a montagem os *contigs* foram submetidos a análise funcional pelos *softwares* MG-RAST e *CLC Genomics*.

3.2.2 Análise Funcional pelo *Metagenomics Rapid Annotation* (MG-RAST)

Para a análise do perfil funcional dos dados metagenômicos foi utilizada a plataforma SEED/MGRAST *pipeline* versão 3.6 contra o banco de dados de proteínas M5NR - uma integração de muitos bancos de dados de sequências em um só. A plataforma conta com um banco de dados de categorias ou sistemas funcionais, onde os genes responsáveis por cada função são sumarizados dentro de um subsistema, que podem ainda variar do nível 1 ao 4, sendo cada nível mais aprofundado que o anterior.

A amostra de pastagem apresentou 543.116 sequências. Todas as sequências passaram no teste de qualidade. Destas, 11.170 (2,1%) incluíam genes de RNA ribossomal, 299.419 sequências (55,1%) continham predição de proteínas com funções conhecidas e 232.527 (42,8%) continham proteínas com funções desconhecidas.

A amostra de floresta apresentou 421.513 sequências. Todas as sequências passaram no teste de qualidade. Destas, 5.815 (1,4%) incluíam genes de RNA ribossomal, 230.389 sequências (54,7%) continham predição de proteínas com funções conhecidas e 185.309 (44,0%) continham proteínas com funções desconhecidas.

Para os dados de ambientes mais complexos como o solo, existe uma dificuldade em se conseguir uma completa classificação, ou *hits*, para todas as sequências. No trabalho de Foerstner, Von Mering e Bork (2006), cerca de 47% das *reads* não mostraram qualquer *hit*. O valor de proteínas preditas obtidas para o presente trabalho foi significativamente bom quando comparados a trabalhos anteriores que utilizaram a plataforma MG-RAST: 21–39 % em Mendes et al. (2015 c); 13-23 % em Fierer et al. (2012); e 54 % em Souza et al. (2013). A alta percentagem encontrada para os “*no hits*” – sequências que não apresentaram similaridade com quaisquer sequências conhecidas –

provavelmente pertençam aos táxons *Eucarya* e *Archaea* (SOUZA et al., 2013), que são significativamente menos estudados que Bacteria.

Um “subsistema” é definido como um conjunto abstrato de "papéis funcionais" que, juntos, implementam um processo biológico específico ou complexo estrutural (OVERBEEK et al., 2005). Sendo assim, o termo "subsistema" tem a flexibilidade de representar, por exemplo, uma via metabólica (ex.: a glicólise) ou uma estrutura física (ex.: o ribossomo). Esses papéis funcionais podem estar ligados a genes específicos em genomas, podendo haver ligações de genes entre subsistemas, ou seja, um único gene pode desempenhar um papel funcional em múltiplos subsistemas simultaneamente. (ANTONOPOULOS et al., 2010).

A distribuição das sequências entre as amostras de pastagem e floresta não mostrou uma diferença tão significativa entre as categorias do subsistema superior (nível 1) (Figura 09). Em quase todas as categorias, os valores para pastagem são sutilmente maiores que os de floresta. Observamos uma maior abundância nos solos de pastagem para os genes relacionados à Fotossíntese e Dormência/Esporulação, ao metabolismo de proteínas de stress e metabolismo de aminoácidos. Como observado também no trabalho de Fierrer et al. (2012).

Apesar de se esperar que os solos de floresta tenham uma maior abundância relativa de genes associados a metabolismo de N, K, SO_4^{2-} e S, porque as taxas de ciclagem de nutrientes são menores em sistemas mais “desérticos”, devido às restrições de umidade (FIERER et al., 2012), no presente trabalho não se observou tal resultado. Entretanto, Navarrete et al., 2015a, mostrou que embora a abundância de genes relacionados com o metabolismo de nutrientes tenha sido semelhante nos solos florestais e solos desmatados, a composição taxonômica dos grupos de bactérias associadas a funções relacionadas com o metabolismo foi mostrada ser diferente entre os ambientes, ou seja, são as mesmas funções, porém sendo exercidas por grupos microbianos diferentes entre os ambientes.

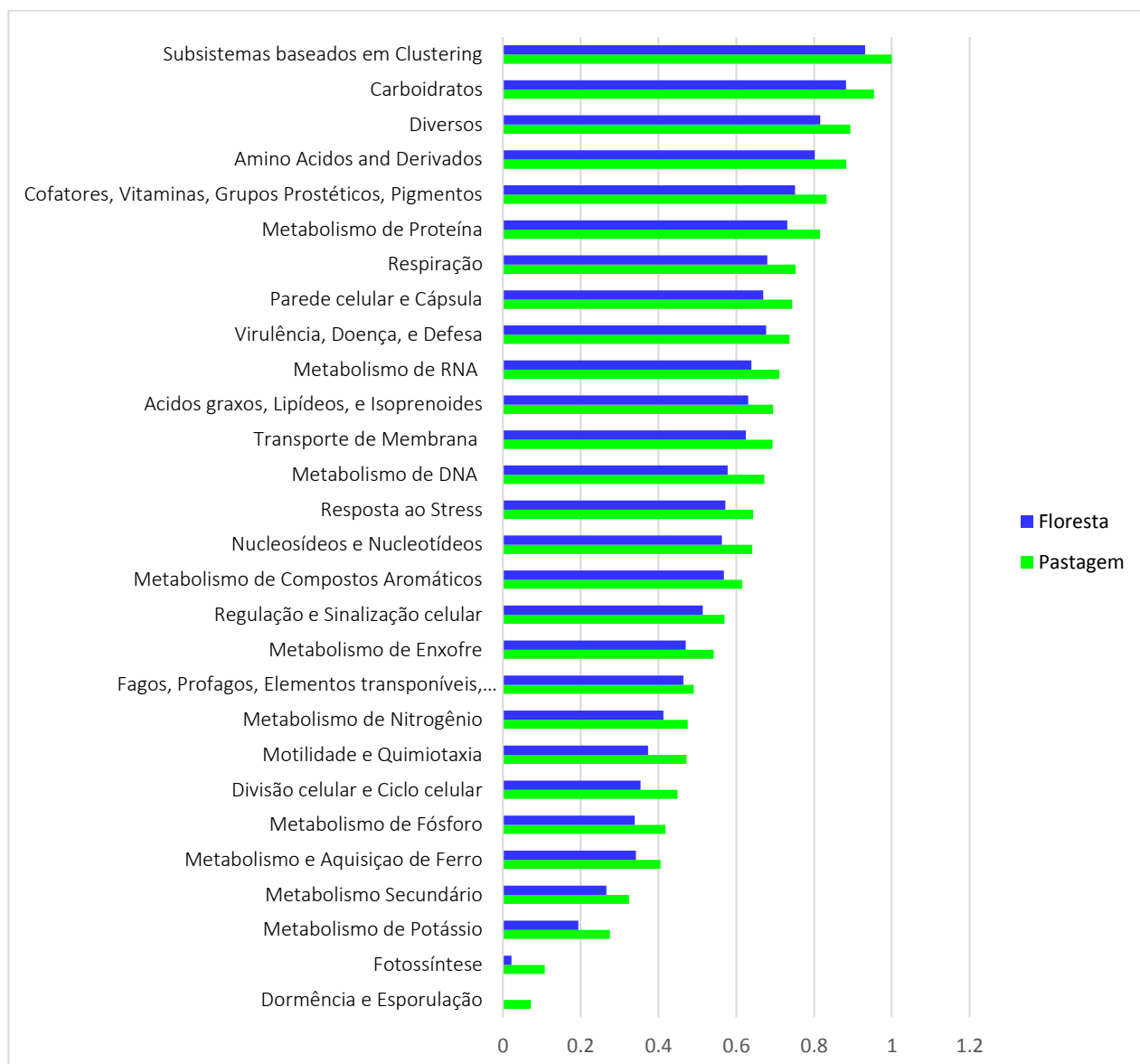


Figura 09: Árvore funcional das categorias do subsistema nível 1 do MG-RAST, baseada em dados metagenômicos de *shotgun*. Pastagem em verde e floresta em azul.

Solos agrícolas e de pastagem mostram maior diversidade e maior redundância funcional, fator importante para manter o funcionamento do ecossistema depois da conversão da floresta. Por outro lado, a manutenção do equilíbrio da floresta é mantida baseada na menor diversidade alfa, mas maior abundância de microrganismos (MENDES et al., 2015c).

3.2.3 Análise Funcional dos genes ligados a susceptibilidade de solos

Um dos objetivos do trabalho foi analisar a susceptibilidade dos solos à ação de microrganismos oportunistas como os fitopatógenos. Para isso foi realizada uma análise

em cima dos subsistemas nível 2 nas categorias Virulência, Doença e Defesa, que contem os *hits* de proteínas ligadas, por exemplo, à resistência a antibióticos e superantígenos; Resposta a Stress que mostra os *hits* ligados aos diferentes tipos de stress que as células podem passar; e ainda a categoria Metabolismo Secundário mostrando os *hits* de Agentes citostáticos bacterianos, fatores de diferenciação e antibióticos (Tabela 02).

No subsistema nível 2, foi observado 8.569 *reads* para floresta e 10.622 *reads* para pastagem na categoria Virulência, Doença e Defesa, 1.105 *reads* para floresta e 1.686 *reads* para pastagem na categoria Resposta a Stress e na categoria Metabolismo Secundário observou-se 503 *reads* para floresta e 641 *reads* para pastagem.

Tabela 02: Categorias funcionais dos sistemas SEED/MG-RAST nível 2 e 3 para as amostras de solo de floresta e pastagem.

Nível 2	Nível 3	Hits Floresta	Hits Pastagem
Virulência Doença e Defesa	Adesão	100 (1,17%)	180 (1,69%)
	Bacteriocinas, peptideos antibacterianos sintetizados ribossomalmente	19 (0,22%)	33 (0,31%)
	Invasão e resistência intracelular	1 (0,01%)	17 (0,16%)
	Resistencia a antibióticos e compostos tóxicos	8413 (98,18%)	10350 (97,44%)
	Toxinas e superantígenos	36 (0,42%)	42 (0,40%)
Resposta a Stress	Stress ácido	43 (3,89%)	54 (3,20%)
	Choque frio	61 (5,52%)	69 (4,09%)
	Choque quente	60 (5,43%)	113 (6,70%)
	Stress Osmótico	333 (30,14%)	442 (26,22%)
	Stress oxidativo	554 (50,14%)	918 (54,45%)
	Stress periplasmático	54 (4,89%)	90 (5,34%)
Metabolismo Secundário	Agentes citostáticos bacterianos, fatores de diferenciação e antibióticos	81 (16,14%)	77 (12,01%)

Genes associados com resistência a antibióticos foram menos abundantes em pastagem. Esta característica pode ser reflexo de uma comunidade menos competitiva no ambiente de pastagem. Fierer et al. (2012) sugere que a intensidade das interações competitivas dentro das comunidades microbianas varia em função das condições ambientais, onde as adaptações que aumentam a competição podem ser menos importantes do que as adaptações que permitem a persistência das células sob condições ambientais adversas.

Para resposta ao *stress*, a amostra de pastagem obteve mais genes associados a esta função. Isto pode ser explicado pelo fato das pastagens estarem continuamente sofrendo flutuações ambientais ao longo do dia, com baixas temperaturas durante a noite e uma alta incidência de luz solar diretamente no solo durante o dia. Desta forma está muito mais exposta do que quando comparada a sistemas florestais.

Partindo de uma visão sobre a resistência dos ambientes perante a incidência de fitopatógenos, é possível inferir que, o ecossistema de floresta, sendo mais estável, se torna mais resistente a ação de fitopatógenos quando comparado às pastagens. O distúrbio causado pelo desmatamento abre caminho para os microrganismos oportunistas como fitopatógenos.

Apesar dos solos de pastagem terem apresentado menor riqueza e diversidade de genes, PAULA et al. (2014) observaram em análise funcional com amostras de solo de floresta e pastagem, que o estabelecimento de uma floresta secundária em áreas de pastagem pode resultar na recuperação de alguns aspectos da diversidade funcional microbiana presentes da floresta original. Sugerindo assim que os processos biogeoquímicos realizados pelos microrganismos podem ajudar a recuperar o reestabelecimento de florestas. De forma geral, os microrganismos são relatados pela sua resiliência, ou seja, sua capacidade de retornar à composição original da comunidade após ter sofrido um distúrbio. Esta capacidade em bactérias está ligada à sua alta taxa de crescimento, e à sua alta flexibilidade fisiológica, essa recuperação pode ocorrer mesmo que com uma redundância funcional (AVISE, HUBBEL e AYALA, 2008).

3.2.4 Análise Funcional pelo CLC *genomics*

Com o objetivo de driblar os “*no hits*” encontrados na análise do MG-RAST, bem como fazer uma análise aprofundada somente no Domínio Bacteria, foi realizada uma análise pelo *software* CLC *Genomics*.

Dos *contigs* obtidos pelo próprio programa, foram triados e analisados apenas os *contigs* classificados dentro do Domínio Bacteria, a classificação taxonômica foi feita por BLASTX contra o banco de dados *Genbank* do NCI. Estes somaram 38.364 sequências para pastagem e 31.178 para floresta, as *reads* que obtiveram *hit* foram selecionadas para a análise funcional subsequente.

Um total de 32.969 genes para pastagem e 26.943 genes de floresta foram preditos usando o PRODIGAL (*Prokaryotic Dynamic Programming Gene-finding Algorithm*) (HYATT et al., 2010). Os genes preditos codificaram um total de 246.458 proteínas para pastagem e 186.885 para floresta. E estas proteínas foram usadas para fazer um RPSBLAST (ferramenta para comparar uma sequência a um conjunto de domínios conservados) contra o banco de dados do COG (TATUSOV et al., 2000).

Em relação ao total de 44.300.00 de *reads* de floresta e 45.300.000 *reads* para pastagem, apenas 10% foram anotadas pelo CLC *genomics*. A diferença na classificação dos dois programas (CLC *genomics* e MG-RAST) se dá primeiramente por se tratar de comparações entre bancos de dados diferentes, pois o do MG-RAST foi com o SEED-systems e o do CLC com o COG. E enquanto o MG-RAST analisou os *contigs* totais das amostras (três domínios) contra o banco de dados de proteínas, o CLC analisou somente os *contigs* classificados no domínio Bacteria contra o banco de dados de nucleotídeos totais. Entretanto, seguindo o padrão encontrado no MG-RAST, foi observado pelo CLC *genomics* que não houveram diferenças significativas na abundância das proteínas de Bacteria entre as duas comunidades (Figura 10).

As abordagens de metagenômica ambiental representam uma nova qualidade de projetos de sequenciamento em termos de abrangência e complexidade. Isso vem junto com características únicas, mas também com armadilhas, e representa vários novos desafios para a análise e interpretação dos dados (FOERSTNER, VON MERING e BORK, 2006). Falta-nos ainda, uma compreensão integrada de como os genes funcionais codificados em seus genomas coletivos agem para estruturar comunidades através de gradientes ambientais (FIERER et al., 2012). Mais esforços em larga escala de sequenciamento metagenômico são necessários para resolver a complexidade do microbioma do solo e fornecer dados suficientes para compreender a diversidade e funções da comunidade (MOCALI e BENEDETTI, 2010). Sendo assim, bem como as práticas agrícolas, o manejo do uso da terra precisa levar em conta as mudanças ocorridas

na comunidade microbiana. Comunidade esta que está intrinsecamente ligada às alterações que ocorrem nestes solos.

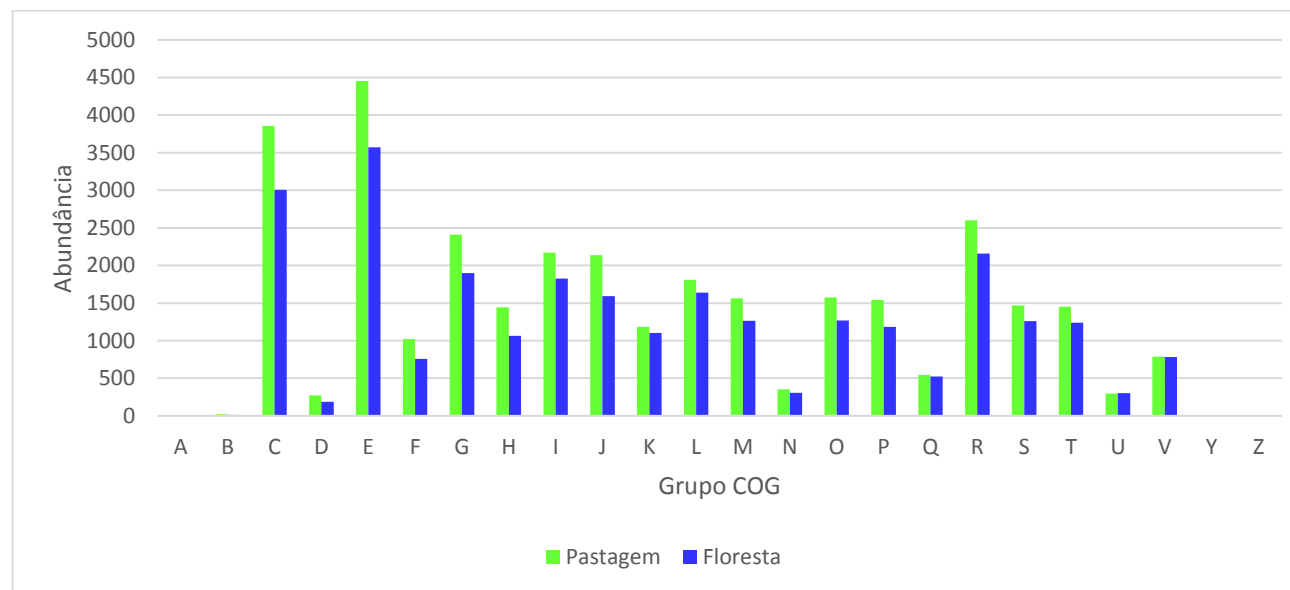


Figura 10: Abundância relativa das categorias funcionas COG entre os solos de pastagem e floresta. As categorias funcionais COG foram: A) Processamento e modificação de RNA; B) Estrutura e dinâmica de cromatina; C) Produção e conversão de energia; D) Controle do ciclo celular, divisão celular, particionamento do cromossomo; E) Transporte e metabolismo de aminoácido; F) Transporte e metabolismo de nucleotídeo; G) Transporte e metabolismo de carboidrato; H) Transporte e metabolismo de coenzima; I) Transporte e metabolismo de Lipídeo; J) Tradução, estrutura ribossomal e biogênese; K) Transcrição; L) Replicação, recombinação e reparo; M) Biogênese de parede celular/membrana/envelope; N) Motilidade celular; O) Modificação pós-traducional, *turnover* de proteínas, chaperonas; P) Transporte e metabolismo de íons inorgânicos; Q) Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários; R) Apenas predição de funções gerais; S) Função desconhecida; T) Mecanismos de transdução de sinal; U) Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular; V) Mecanismos de defesa e Z) Citoesqueleto.

4.0 CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu a elucidação da importância dos microrganismos para o reestabelecimento da comunidade após um distúrbio antrópico. Foi possível notar, através do sequenciamento do RNAr 16S, que diferentemente do que acontece para plantas e animais, há um aumento da diversidade bacteriana após o distúrbio, sendo este aumento representado por respostas diferentes para cada filo, sendo que alguns apresentam um aumento na abundância de OTUs, enquanto em outros há uma diminuição.

De grande relevância foi também o primeiro relato dos filios BHI80-139 e SBR 1093 para o ambiente de floresta e dos filios BRC1, OP3 e LD1 para o ambiente de pastagem. Provando que a despeito da diversidade bacteriana, muito ainda precisa ser estudado, trazendo assim a importância da conservação destes ambientes, que podem abrigar microrganismos como fonte de genes e produtos biotecnológicos de grande interesse comercial, porém ainda desconhecidos.

Estas comunidades apresentam uma ampla versatilidade metabólica, e isto justifica as adaptações necessárias para responder a distúrbios. A análise funcional da comunidade microbiana total mostrou que os solos de floresta são mais estáveis que os solos de pastagem, e a análise das reads afiliadas apenas ao Domínio Bacteria mostrou que a abundância de todas as categorias funcionais foi sempre maior que os de floresta.

Não há dúvidas que a sustentabilidade ambiental e a produção agrícola dependem diretamente de um manejo adequado do solo, visando sua fertilidade e produtividade, fatores estes que são regulados intrinsecamente por microrganismos do solo. No entanto, muito conhecimento a despeito destes microrganismos ainda permanece obscuro. Assim, o objetivo da metagenômica não é simplesmente fornecer uma coleção de milhares de produtos biológicos, mas oferecer uma oportunidade única para explorar como as comunidades microbianas interagem com o solo ou cultivo e explorar o poder dessas comunidades para recuperação do solo, produzir colheitas mais saudáveis e/ou encontrar novas biomoléculas. Sendo assim, a conservação deste tesouro inestimável e ainda pouco conhecido que é a diversidade microbiana, deve ser levada a sério.

5.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONOPOULOS, Dionysios A.; GLASS, Elizabeth M.; MEYER, Folker. Analyzing Metagenomic Data: Inferring Microbial Community Function with MG-RAST. **Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies**, 2010.
- AVISE, John C.; HUBBELL, Stephen P.; AYALA, Francisco J. Resistance, Resilience, and Redundancy in Microbial Communities. **Proc Natl Acad Sci U S A** 105:11512–11519, 2008.
- BIO, C. L. C. White paper on clc bioinformatics cube 1.03. **CLC Bio, Finlandsgade**, p. 10-12, 2007.
- BOBROVA, O. E. et al. Metagenome 16s rRNA gene analysis of the black sea microbial diversity in the region of the Zmiiniy Island. **Мікробіологія і біотехнологія??**, n. 2, p. 6-19, 2015.
- CAPORASO, J. Gregory et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010.
- CONNELL, Joseph H. Diversity in tropical rain forests and coral reefs. **Science**, v. 199, n. 4335, p. 1302-1310, 1978
- DE MANDAL, Surajit; SANGA, Zothan; NACHIMUTHU, Senthil Kumar. Metagenomic analysis of bacterial community composition among the cave sediments of Indo-Burman biodiversity hotspot region. **PeerJ PrePrints**, v. 2, p. e631v1, 2014.
- DESANTIS, Todd Z. et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5069-5072, 2006.
- DIRZO, Rodolfo; RAVEN, Peter H. Global state of biodiversity and loss. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 28, n. 1, p. 137-167, 2003.
- ELSHAHEED, Mostafa S. et al. Novelty and uniqueness patterns of rare members of the soil biosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 17, p. 5422-5428, 2008.

- FIERER, Noah et al. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 52, p. 21390-21395, 2012.
- FOERSTNER, Konrad U.; VON MERING, Christian; BORK, Peer. Comparative analysis of environmental sequences: potential and challenges. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1467, p. 519-523, 2006.
- GLÖCKNER, Jana et al. Phylogenetic diversity and metagenomics of candidate division OP3. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 1218-1229, 2010.
- GOOD, Irving J. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. **Biometrika**, v. 40, n. 3-4, p. 237-264, 1953.
- GRASBY, Stephen E. et al. The Paint Pots, Kootenay National Park, Canada—a natural acid spring analogue for Mars 1, 2. **Canadian Journal of Earth Sciences**, v. 50, n. 1, p. 94-108, 2013.
- HE, Tianliang; ZHANG, Xiaobo. Characterization of Bacterial Communities in Deep-Sea Hydrothermal Vents from Three Oceanic Regions. **Marine Biotechnology**, p. 1-10, 2015.
- HYATT, Doug et al. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. **BMC bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 1, 2010.
- INPE. Instituto Nacional de Pesquisas espaciais, 2014. Disponível em http://www.inpe.br/noticias/noticia.php?Cod_Noticia=3944. Acessado em 19 de junho de 2016.
- JESUS, Ederson da Costa et al. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **The ISME journal**, v. 3, n. 9, p. 1004-1011, 2009.
- JI, Mukan et al. Microbial diversity at Mitchell Peninsula, Eastern Antarctica: a potential biodiversity “hotspot”. **Polar Biology**, p. 1-13, 2015.
- KACHIURU, Mwirichia. 4 Prokaryotic community composition of four Kenyan soda lakes as revealed by amplicon sequencing. **Metagenomic and metatranscriptomic analyses of calcifying biofilms**, p. 99, 2013.

- LAGOS, Lorena M. et al. Bacterial community structures in rhizosphere microsites of ryegrass (*Lolium perenne* var. Nui) as revealed by pyrosequencing. **Biology and fertility of soils**, v. 50, n. 8, p. 1253-1266, 2014.
- LAUBER, Christian L. et al. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 15, p. 5111-5120, 2009.
- LEMOS, Leandro N. et al. Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. **Journal of microbiological methods**, v. 86, n. 1, p. 42-51, 2011.
- MAGURRAN, Anne E. **Measuring biological diversity**. Oxford, Blackwell Science, 256p. 2004.
- MENDES, Lucas W. et al. Impact of land-use changes in the Amazon on bacterial diversity, composition and distribution. **Land-Use Change Impacts on Soil Processes: Tropical and Savannah Ecosystems**, p. 41, 2015 b.
- MENDES, Lucas W. et al. Soil-borne microbiome: linking diversity to function. **Microbial ecology**, v. 70, n. 1, p. 255-265, 2015 c.
- MENDES, Lucas William et al. Land-use system shapes soil bacterial communities in Southeastern Amazon region. **Applied Soil Ecology**, v. 95, p. 151-160, 2015 a.
- MENDES, Lucas William. **Metagenome of Amazon forest conversion: impacts on soil-borne microbial diversity and functions**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2014.
- MEYER, Folker et al. The metagenomics RAST server—a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 1, 2008.
- MOCALI, Stefano; BENEDETTI, Anna. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 6, p. 497-505, 2010.
- MYER, Phillip R. et al. Rumen microbiome from steers differing in feed efficiency. **PLoS one**, v. 10, n. 6, p. e0129174, 2015.

- NAVARRETE, Acácio A. et al. Acidobacterial community responses to agricultural management of soybean in Amazon forest soils. **FEMS microbiology ecology**, v. 83, n. 3, p. 607-621, 2013.
- NAVARRETE, Acácio A. et al. Acidobacterial community responses to agricultural management of soybean in Amazon forest soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 83, n. 3, p. 607-621, 2013.
- NAVARRETE, Acacio A. et al. Differential response of Acidobacteria subgroups to forest-to-pasture conversion and their biogeographic patterns in the western Brazilian Amazon. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015 c.
- NAVARRETE, Acacio A. et al. Soil microbiome responses to the short-term effects of Amazonian deforestation. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 10, p. 2433-2448, 2015a.
- NAVARRETE, Acacio Aparecido *et al.* Verrucomicrobial community structure and abundance as indicators for changes in chemical factors linked to soil fertility. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 108, n. 3, p. 741-752, 2015 b.
- NOGALES, Balbina et al. Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1874-1884, 2001.
- NUNES, D. D. Vulnerabilidade Natural à Erosão da Bacia do rio Mutum Paraná – Porto Velho/RO (relatório final de pesquisa). Porto Velho, CNPq – Universidade Federal de Rondônia, 2012.
- OVERBEEK, Ross et al. The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. **Nucleic acids research**, v. 33, n. 17, p. 5691-5702, 2005.
- PAULA, Fabiana S. et al. Land use change alters functional gene diversity, composition and abundance in Amazon forest soil microbial communities. **Molecular ecology**, v. 23, n. 12, p. 2988-2999, 2014.
- PERSHINA, Elizaveta et al. Comparative Analysis of Prokaryotic Communities Associated with Organic and Conventional Farming Systems. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. e0145072, 2015.

- PYLRO, Victor S. et al. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. **Journal of microbiological methods**, v. 107, p. 30-37, 2014.
- RAMADASS, K. et al. Evaluation of constraints in bioremediation of weathered hydrocarbon-contaminated arid soils through microcosm biopile study. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 12, n. 11, p. 3597-3612, 2015.
- RODRIGUES, Jorge LM et al. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 3, p. 988-993, 2013.
- RYAN, Thomas A.; JOINER, Brian L.; RYAN, Barbara F. **Minitab™**. John Wiley & Sons, Inc., 1994.
- SAHL, Jason W. et al. A comparative molecular analysis of water-filled limestone sinkholes in north-eastern Mexico. **Environmental microbiology**, v. 13, n. 1, p. 226-240, 2011.
- SOUZA, Renata Carolini et al. Soil metagenomics reveals differences under conventional and no-tillage with crop rotation or succession. **Applied Soil Ecology**, v. 72, p. 49-61, 2013.
- STEINERT, Georg; TAYLOR, Michael W.; SCHUPP, Peter J. Diversity of Actinobacteria Associated with the Marine Ascidian *Eudistoma toetalensis*. **Marine Biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 377-385, 2015.
- SULEIMAN, Afnan Khalil Ahmad et al. Shifts in soil bacterial community after eight years of land-use change. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 137-144, 2013.
- TATUSOV, Roman L. et al. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 33-36, 2000.
- TER BRAAK, Cajo JF; SMILAUER, Petr. CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: software for canonical community ordination (version 4.5). 2002.
- YAMADA, Takeshi et al. Diversity, localization, and physiological properties of filamentous microbes belonging to Chloroflexi subphylum I in mesophilic and

thermophilic methanogenic sludge granules. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7493-7503, 2005.

YOUSSEF, Noha; STEIDLEY, Brandi L.; ELSHAHED, Mostafa S. Novel high-rank phylogenetic lineages within a sulfur spring (Zodletone spring, Oklahoma, USA) revealed using a combined pyrosequencing/Sanger approach. **Applied and environmental microbiology**, p. AEM. 00002-12, 2012.

ZHOU, JunPei et al. Phylogenetic diversity of bacteria in an earth-cave in Guizhou Province, Southwest of China. **Journal of Microbiology-Seoul-**, v. 45, n. 2, p. 105, 2007.

6.0 MATERIAL SUPLEMENTAR

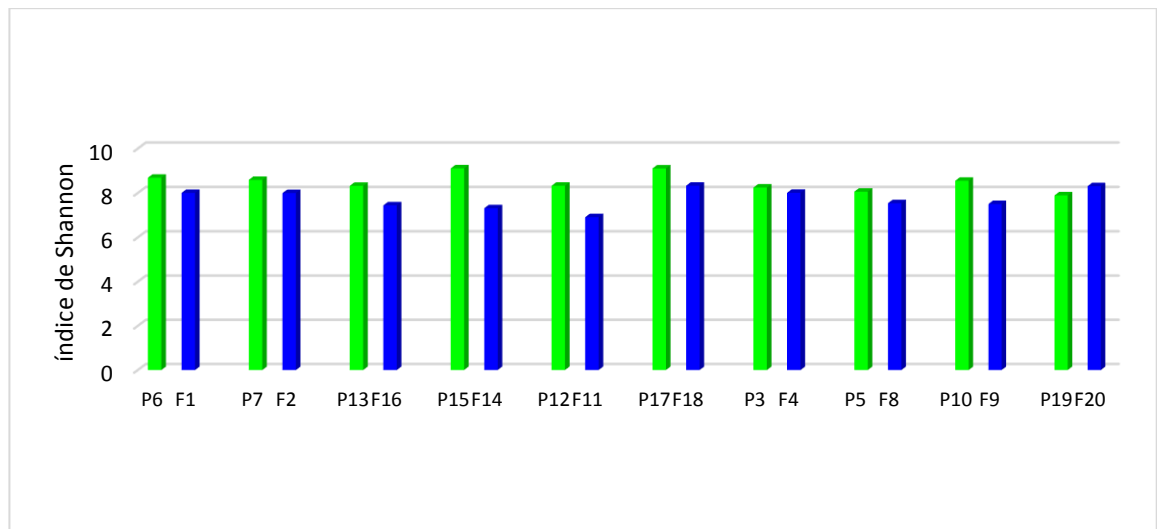


Figura suplementar 01: Valores absolutos do índice de diversidade de Shannon para cada ponto amostral, sendo pontos de coleta adjacentes de floresta e pastagem colocados lado a lado. Barras em verde representam os pontos de pastagem, e barras azul os pontos de floresta.

Tabela suplementar 01: Número de OTU's por amostra.

Pastagem		Floresta	
P3	50.006	F1	52.314
P5	43.242	F2	47.588
P6	50.754	F4	51.189
P7	51.284	F8	51.809
P10	45.709	F9	49.066
P12	43.949	F11	42.956
P13	40.298	F14	65.119
P15	41.242	F16	53.906
P17	22.865	F18	56.271
P19	50.343	F20	49.633
Total	439.692	Total	519.851

Tabela suplementar 02: Análise química dos vinte pontos amostrais.

Amostra	Cu	Fe	Mn	Zn	pH	MO	P	K	Ca	Mg	H+Al	Al	CTC	m	V
	mg dm ⁻³				Água	g kg ⁻¹	mg dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³					%		
1F	0,08	50,34	1,79	0,92	5	31,2	4	0,11	0	0,05	11,2	3,32	11,39	95	1
2F	0,7	650,48	0,94	0,69	5,5	23,8	2	0,1	0,07	0,05	7,3	1,36	7,5	86	3
8F	0,8	545,17	5,54	1,61	4,3	18,8	8	0,31	0,05	0,35	12,2	1,91	12,96	73	6
4F	0,88	608,08	53,67	2,6	5,4	11,4	5	0,14	0,03	0,16	3,8	0,83	4,14	72	8
9F	0,5	764,2	6,3	0,62	4,4	10,7	5	0,09	0,11	0,09	4,8	1,26	5,08	81	6
11F	2,79	617,42	6,35	0,49	5,5	32,1	2	0,51	2,72	0,88	4,8	0,47	8,89	10	46
14F	1,81	579,22	18,63	0,66	4	25,8	3	0,16	0,44	0,28	9,9	3,44	10,78	80	8
16F	0,14	40,07	1,84	0,73	4,5	27,2	4	0,12	0,1	0,08	7,8	3,16	8,06	91	4
18F	0,97	381,9	158,92	4,18	5,1	17,0	4	0,49	0,67	0,49	3,5	0,35	5,11	18	32
20F	0,62	216,36	85,11	2,9	5,1	14,1	4	0,23	1,3	0,44	2,6	0,26	4,61	12	43
5P	3,18	1178,14	49,79	1,56	5,8	15,8	3	0,22	0,39	0,37	4	0,6	5,03	38	20
6P	4,78	1060,22	112,04	7,59	4,7	21,3	5	0,31	0,88	0,8	6,7	1,28	8,74	39	23
7P	0,79	651,54	97,89	1,1	5,4	8,9	4	0,1	0,58	0,3	6,9	0,35	7,85	26	13
3P	0,53	379,76	12,99	1,31	5,3	10,4	2	0,19	0,21	0,22	3,5	0,98	4,09	61	15
10P	1,17	905,26	30,81	0,74	4	23,3	2	0,09	0,04	0,14	12,4	4,01	12,64	94	2
12P	0,33	1045,42	3,96	0,65	4,2	23,3	3	0,18	0,22	0,14	11,6	3,40	12,09	86	4
13P	1,07	940,82	2,4	0,49	5	15,5	2	0,09	0,38	0,14	6,3	1,97	6,88	76	9
15P	1,56	844,74	69,28	1,61	5,5	42,8	3	0,79	4,51	2,33	7,9	0,46	15,55	6	49
17P	1,3	291,71	156,94	7,75	5,9	17,0	4	0,77	2,49	1,59	2,1	0,0	6,99	00	69
19P	1,98	1105,85	37,42	1,9	5,4	13,6	3	0,43	0,74	0,41	2	0,27	3,56	15	44

Tabela suplementar 03: Classificação e abundância das sequências pertencentes ao Domínio Bacteria quanto ao Filo. Os filios com abundância superior a 1% foram destacados.

Filo	Floresta	Pastagem
AD3	0,11%	0,21%
Acidobacteria	31,03%	28,16%
Actinobacteria	14,49%	13,09%
Armatimonadetes	0,06%	0,17%
BHI80-139	0,00%	0,00%
BRC1	0,00%	0,00%
Bacteroidetes	3,12%	4,31%
Chlamydiae	0,20%	0,15%
Chlorobi	0,03%	0,20%
Chloroflexi	2,67%	4,86%
Cyanobacteria	0,23%	0,24%
Elusimicrobia	0,16%	0,14%
FBP	0,00%	0,00%
FCPU426	0,02%	0,01%
Fibrobacteres	0,00%	0,01%
Firmicutes	5,40%	8,51%
GAL15	0,12%	0,09%
Gemmatimonadetes	0,40%	0,46%
LD1	0,00%	0,00%
Lentisphaerae	0,00%	0,00%
NC10	0,01%	0,02%
NKB19	0,00%	0,00%
Nitrospirae	0,40%	0,34%
OD1	0,00%	0,01%
OP3	0,00%	0,01%
Planctomycetes	1,29%	1,78%
Proteobacteria	26,66%	23,35%
SBR1093	0,00%	0,00%
SC4	0,00%	0,00%
Spirochaetes	0,02%	0,04%
TM6	0,05%	0,07%
TM7	0,01%	0,02%
Tenericutes	0,00%	0,00%
Verrucomicrobia	7,56%	9,11%
WPS-2	4,14%	2,78%
WS3	0,03%	0,05%
WS4	0,01%	0,05%
WS5	0,00%	0,01%

CAPÍTULO 02- POTENCIAL ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS DE SOLO AMAZÔNICO PERANTE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS *BOTRYTIS CINEREA*, *FUSARIUM OXYSPOURUM* AND *COLLETOTRICHUM ACUTATUM*.

Thamar Holanda da Silva, Alan Emanuel Silva Cerqueira, Sérgio Oliveira de Paula, Adriana Cristina da Silva Nunes, Dorisvalder dos Dias Nunes, Maria Catarina Kazuya, Cynthia Canêdo da Silva.

RESUMO

SILVA, Tamar Holanda, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Potencial antagonista de bactérias e leveduras de solo Amazônico perante fungos fitopatogênicos *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum acutatum*.** Orientadora: Cynthia Canêdo da Silva. Co-orientador: Marcos Rogério Tótola.

Fitopatógenos são conhecidos pela capacidade de causar doenças em plantas. *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum acutatum* são fitopatógenos de culturas como o morango. *Fusarium oxysporum* é o fungo causador do mal do Panamá, uma infecção de bananeiras que tem devastado plantações no mundo inteiro. As medidas para o controle de infestações de fungos patogênicos ainda são predominantemente realizadas através da utilização de pesticidas químicos, que afetam a saúde humana e causam danos ao ambiente. O controle biológico, que visa à utilização de microrganismos com capacidade de competição contra os patógenos, tem se tornado uma saída viável para estes problemas. Sendo assim, este trabalho objetivou o isolamento, caracterização e triagem de bactérias e leveduras com potencial antagonista para o controle dos fitopatógenos *B. cinerea*, *C. acutatum* e *F. oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc). Um total de 54 microrganismos foram isolados das amostras de solo, destes, 45 bactérias e nove leveduras. Duas bactérias, identificadas como *Bacillus* spp. e *Lysinibacillus xylanilyticus*, e quatro leveduras apresentaram percentuais de inibição contra *B. cinerea*, que variaram de 19,69% a 44,16%. Quando testados contra *Foc* apenas três isolados de leveduras foram os responsáveis pelos resultados positivos em relação ao controle, com percentuais de 33,11% a 36,63%. Contra *C. acutatum* cinco isolados (bacteria ou levedura) foram capazes de reduzir o tamanho do fitopatógeno, com percentuais variando de 35,53% a 48,64%. O uso de leveduras e bactérias se mostra como uma excelente opção para o combate aos fitopatógenos e uma excelente alternativa ao uso de pesticidas. Sendo assim é de extrema importância a busca contínua por novos agentes que se mostrem capazes de exercer o biocontrole.

Palavras-chave: controle biológico, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum acutatum*

ABSTRACT

SILVA, Tamar Holanda, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Antagonist potential of bacteria and yeast from Amazonian soil on plant pathogens *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum acutatum*.** Advisor: Cynthia Canêdo da Silva. Co-advisor: Marcos Rogério Tótola.

Plant pathogens are known for their ability to cause disease in plants. *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum acutatum* are plant pathogens of crops, such as strawberry. *Fusarium oxysporum* is a fungus that causes the Panama disease, an infection that occurs in banana that has devastated crops worldwide. The measures to control infestations of pathogenic fungus are still predominantly carried out by the use of chemical pesticides that affect human health and damage the environment. Moreover, it has been possible to observe resistance of these pathogens to fungicides, which is the main concern of its use. Biological control of pests, which aims to use microorganisms with ability to compete against pathogens, has become a viable solution for these problems. Thus, this study aimed to isolate, characterize and screen bacteria and yeasts with antagonist potential for the control of plant pathogen *B. cinerea*, *C. acutatum* and *F. oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc). A total of 54 microorganisms were isolated from soil samples, where 45 were bacteria and 9 were yeasts. Two bacteria, identified as *Bacillus* spp. and *Lysinibacillus xylanilyticus* and four yeasts showed inhibition percentage against *B. cinerea* varying from 19.69% to 44.16%. After testing them against Foc, only three yeast isolates were responsible for the positive results in the control, with percentage varying from 33.11% to 36.63%. For the test against *C. acutatum* five isolates were able to reduce the size of the pathogen, with percentages ranging from 35.53% to 48.64%. The use of yeasts and bacteria can be an excellent option to control plant pathogens and an excellent alternative to the use of pesticides. It is important to look for continuously new agents that may be able to be used as biocontrol.

Key-words: biological control, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum acutatum*.

1.0 INTRODUÇÃO

Botrytis cinerea é conhecido como o agente causador da podridão cinzenta, principalmente em culturas de morango (SYLLA et al., 2015; FELIZIANI; LANDI; ROMANAZZI, 2015). É um dos maiores responsáveis por perdas de produção no campo e na pós-colheita.

A “queda prematura dos frutos cítricos” é uma doença causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum* (KUPPER, 2009), que produz sintomas em flores, folhas, pecíolos e raízes, e mais importante, causam podridão de frutos de morango (PERES et al., 2005). Pode ainda afetar outras culturas como tomates (*Solanum lycopersicum* L.) e maçãs (*Malus domestica*). *C. acutatum* de morango pode sobreviver em várias espécies de plantas cultivadas, como a pimenta, berinjela, tomate, feijão e espécies de ervas daninhas, sem causar sintomas da doença. Isso indica que eles podem servir como um reservatório potencial de inóculo para a infecção de morango entre as estações. Embora *C. acutatum* sobreviva no solo sob certas condições, não há estruturas de dormência específicas observadas, indicando que o agente patogênico não se comporta como um típico fungo do solo (FREEMAN, 2008).

Outro importante fitopatogênico é o fungo *Fusarium oxysporum*, este é causador do mal do Panamá, uma infecção de bananeiras que tem devastado plantações no mundo inteiro, e tem uma gama de hospedeiros relativamente ampla (PLOETZ, 2015). Ele infecta as bananeiras através do sistema radicular, e pode permanecer no solo durante décadas após a infecção inicial (WANG et al., 2015). Nem mesmo rotações de culturas e técnicas de fumigação do solo têm sido suficientes para o controle pleno da doença (GHAG et al., 2015), sendo a utilização de cultivares resistentes, no momento, a melhor forma de controle (COSTA et al., 2015). A medida predominante de controle é a pulverização com produtos químicos na época da florada. Vários produtos encontram-se registrados para esta finalidade, sendo mais eficientes os benzimidazóis, alguns triazóis e ftalimida (KUPPER; GIMENES e GOES, 2003). Porém já é encontrada certa resistência a outros fungicidas como benomyl e benzimidazoles (PERES et al., 2004). Sob condições de elevada precipitação ou de chuvas prolongadas, os fungicidas têm eficiência limitada, principalmente, pelas dificuldades de aplicações, além do que os produtos são mais facilmente lavados.

De forma geral, o controle de doenças ainda é realizado por estes fungicidas que afetam a saúde humana e causam danos ao ambiente, porém o uso de agrotóxicos continuará em vigor até que hajam alternativas viáveis para o controle dos patógenos (HAN et al.,2015). Com o aumento da demanda de produtos mais ambientalmente corretos, as práticas de controle biológico têm sido mais visadas como alternativa para os pesticidas sintéticos (HAN et al.,2015).

Sabendo que quanto maior a diversidade de uma região, maiores são as chances de obtenção de um agente biocontrolador, as buscas por estes organismos, assim como o desenvolvimento de tecnologias de utilização dos mesmos, passaram a assumir uma função estratégica para o desenvolvimento e independência tecnológica (STROBEL, 2006). Considerando-se os custos financeiros e ambientais de aplicações de pesticidas, assim como as crescentes restrições à presença de resíduos nos frutos, faz-se necessário o estudo de novas alternativas (KUPPER et al., 2009). Entres estas, o controle biológico torna-se uma alternativa importante e tecnicamente justificável.

2.0 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios desse estudo foram conduzidos no Laboratório de Imunovirologia Molecular e no Laboratório de Associações Micorrízicas, que pertencem, respectivamente, ao Departamento de Biologia Geral, e ao Departamento de Microbiologia, ambos da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

2.1 Amostragem

As amostras foram coletadas na bacia hidrográfica do rio Mutum Paraná, localizada à Noroeste do Estado de Rondônia –Brasil (BHRMP), em áreas de diferentes usos e manejos, com ênfase para pastagem e floresta, a partir de uma grade de 10x10 km² considerando os diferentes tipos de solos conforme realizado em Nunes (2012).

A coleta foi realizada em uma área de 1 m² com trado holandês de caneco. Essa área foi superficialmente limpa para retirada da matéria orgânica em decomposição e, em seguida foram retiradas 5 subamostras de solo de uma profundidade entre 0 e 20 cm (camada A) com o auxílio das seguintes ferramentas: material de Jardinagem; luvas cirúrgicas para evitar contaminação; enxada e faca. As 5 subamostras foram unidas em um recipiente (saco plástico) e misturadas originando uma amostra composta que foi conservada em gelo até o retorno ao laboratório. O montante coletado sempre foi acima de 2 Kg. Para que se evitasse contaminação, a cada coleta, as ferramentas foram devidamente “lavadas” em água corrente e álcool 70%. Cada amostra foi acondicionada em sacos plásticos, não havendo contato direto com o material coletado a fim de evitar contaminação de origem antrópica. Na visita a campo realizada em novembro de 2014, foram coletadas vinte amostras de solo, sendo dez de floresta e dez de pastagem.

2.2 Isolamento de microrganismos

Após coleta das amostras de solo, 1 g de cada uma das dez amostras de pastagem foram unidas formando uma amostra composta única, assim como para as de floresta, resultando em 10 g de solo de pastagem e 10 g de floresta. Para cada amostra composta, os 10 g foram adicionados em *Erlenmeyer* de 250 mL, contendo 90 mL de solução salina 0,9 %. Homogeneizada a mistura, uma alíquota de 1 mL foi submetida a diluições seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁸ em solução salina e 0,1 mL plaqueado em meio Ágar Nutriente

com pH 7,0 para o isolamento de bactérias e eventuais leveduras. As placas de *Petri* foram incubadas a 28 °C por até 48 horas. Cada colônia de diferente morfologia foi coletada e inoculada em uma placa de *Petri* contendo um novo meio de cultivo e este procedimento foi repetido quantas vezes necessário para obtenção da cultura pura.

2.3 Caracterização morfológica

Todos os isolados de bactérias e leveduras foram agrupados por similaridades morfológicas, de acordo com as seguintes características: cor da colônia (frente e verso), elevação da superfície, aspecto da borda, velocidade de crescimento, forma da colônia e coloração de Gram para bactérias.

2.4 Screening para atividade antagonista

Todos os isolados bacterianos e de leveduras foram testados quanto ao potencial de antagonismo contra *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc) por meio de testes de cultura pareada. Um disco de ágar com 0,5 cm de diâmetro contendo micélio de cada fungo patogênico foi inoculado em um lado de uma placa de *Petri* contendo meio de cultivo BDA (Fluka) e a placa foi incubada por 2 dias a 25 °C. Em seguida, foi estriado cerca de 20 µl de uma suspensão de cada isolado na outra extremidade da placa e incubada novamente a 25 °C por mais cinco dias. Após a inoculação da suspensão foi medido a Densidade Óptica (D.O) dos isolados de bactérias para controle do número de células. Para controle negativo do teste, foi inoculado somente o fungo na extremidade de uma placa de *Petri*. Os halos de crescimento do patógeno foram medidos no 3º, 5º e no 7º dia. As bactérias ou leveduras foram consideradas como potenciais inibidores do patógeno quando os fungos apresentaram crescimento inferior ao do controle ou quando observados halos de inibição.

Todos os ensaios foram feitos em triplicata e o percentual de inibição foi calculado segundo a fórmula: $((DM-dm)/DM) \times 100$, onde DM é o valor da média do diâmetro do patógeno entre as repetições das placas controles, dm é o diâmetro médio do patógeno na placa de cultura pareada. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa MiniTab 17 (RYAN et al., 1994).

2.5 Teste do filtrado

Com o intuito de eliminar o efeito do pH do meio de cultivo BDA sobre o crescimento das bactérias durante o teste de pareamento, um teste com o filtrado dos

isolados foi realizado, adaptado de Cirvilleri et al., (2005). Os isolados bacterianos foram crescidos em caldo nutriente por 24 hr a 30 °C sob agitação. Depois de crescidos foram centrifugados a 8.228 g por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana *Millipore*TM 0,22 µm. Foi adicionado 100 µl do sobrenadante filtrado na placa com BDA ainda líquido, através da técnica de *pour plate*. Foi então adicionado um disco de micélio do fungo patogênico em duas extremidades das placas e comparados com o controle que não obteve inserção de nenhum filtrado no meio.

2.6 Identificação taxonômica

Apenas os microrganismos com potencial para o biocontrole dos fitopatógenos foram submetidos à identificação taxonômica.

Para identificação das leveduras, as mesmas foram submetidas à extração de DNA seguido pela amplificação utilizando os primers NLI (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG) da região D1/D2 da subunidade maior do gene do RNAr de acordo com Rosa e Lachance (1998).

E para bactérias, as células foram submetidas à extração de DNA de acordo com o protocolo descrito por Pospiesh e Neumann (1995). Em seguida, submetido à reação de amplificação por PCR com os oligonucleotídeos 27f (5'-GAGTTTGATCCTGGC TCAG -3') e 1100r (5'-AGGGTTGCGCTCGTTG -3'), homólogos às extremidades conservadas do gene RNAr 16S do Domínio Bacteria (LANE et al., 1985) com as condições de reação e amplificação descritas em Silva et al. (2010).

Os amplicons obtidos foram checados quanto ao tamanho e integridade em gel de agarose 1%, visualizados em luz UV e enviados para sequenciamento na Divisão de Recursos Microbianos/CPQBA/UNICAMP.

Após obtenção das sequências, os *contigs* foram montados através do programa *DNABaser* e comparados utilizando BLASTn quanto aos valores de similaridade com aquelas depositadas no banco de dados *GenBank*. Posteriormente, foi realizado o alinhamento através do *software* MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013) e as sequências tiveram suas distâncias filogenéticas inferidas por meio de análise *Neighbor-Joining* através do *software* MrBayes (RONQUIST et al., 2012).

3.0 RESULTADOS

3.1 Atividade antagonista contra *C. acutatum*, *F. oxysporum* e *B. cinerea*

Um total de 54 microrganismos foram isolados das amostras de solo, destes, 45 bactérias e nove leveduras, mas ao longo dos procedimentos de repicagem foram perdidos 5 isolados de bacterias e 4 de levedura (Tabelas 01 e 02 Material suplementar).

O teste contra os fitopatógenos revelaram duas bactérias e quatro leveduras apresentando percentuais de inibição contra *B. cinerea*, onde os valores variaram de 19,69% a 44,16 % (Figura 01). Os halos de inibição resultantes do teste de antagonismos de leveduras contra *B. cinerea* podem ser observados na Figura 02 e contra bactérias na Figura 03.

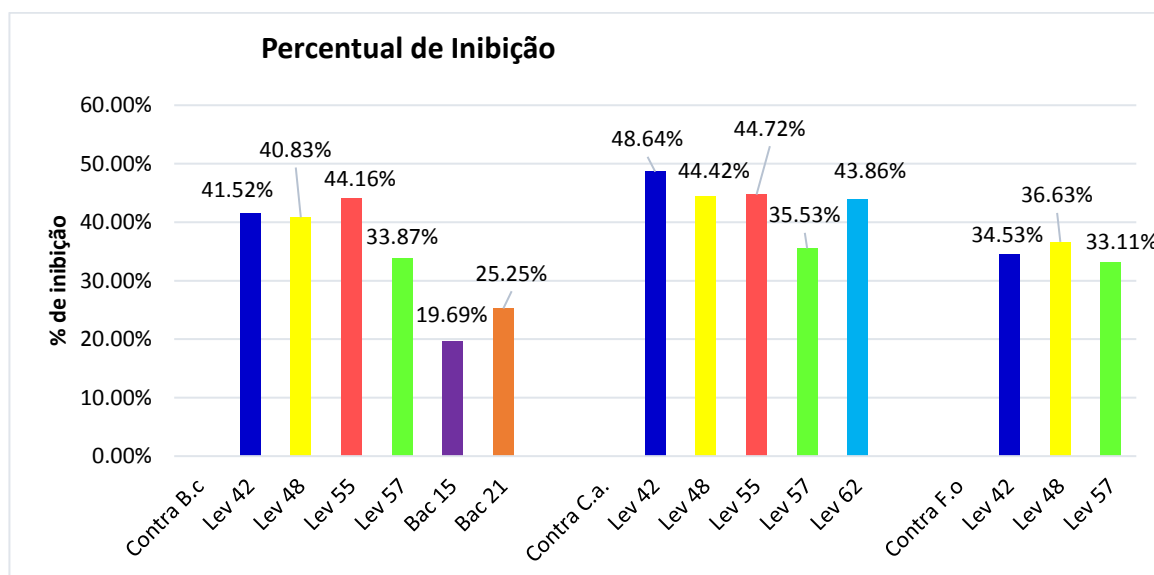


Figura 01: Percentuais de inibição dos isolados de bactérias e leveduras frente aos fitopatógenos *B. cinerea*, *C. acutatum*, *F. oxysporum*.

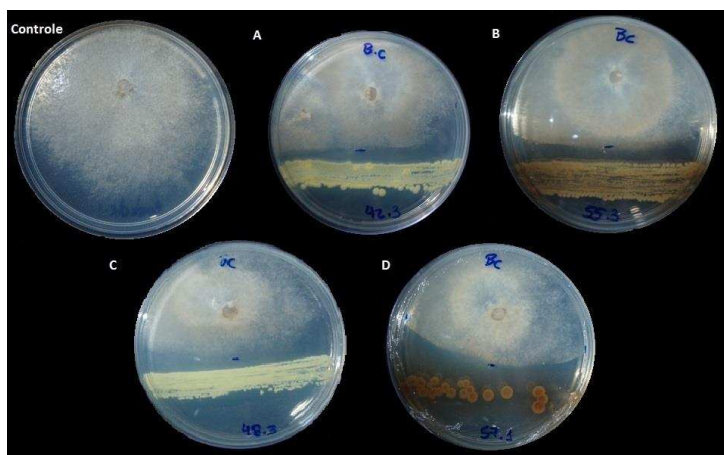


Figura 02. Isolados de levedura exercendo efeito antagonista contra *B.cinerea*. Controle: *B.cinerea* em meio BDA, A) Lev 42; B) Lev 55; C) Lev 48; D) Lev 57.

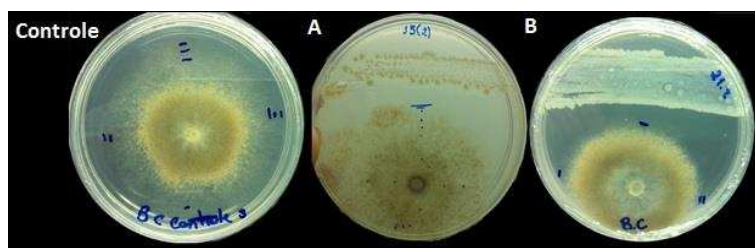


Figura 03. Isolados de bactéria exercendo efeito antagonista contra *B.cinerea*. Controle: *B.cinerea* em meio BDA, A) Bac 15; B) Bac 21.

Quando testados contra *F.oxysporum* apenas três isolados foram os responsáveis pelos resultados positivos em relação ao controle, com percentuais de 33,11 % a 36,63% (Figura 01 e Figura 04). E para o teste contra *C. acutatum* cinco isolados foram capazes de reduzir o tamanho do fitopatógeno (Figura 01 e Figura 05), com percentuais variando de 35,53% a 48,64%.

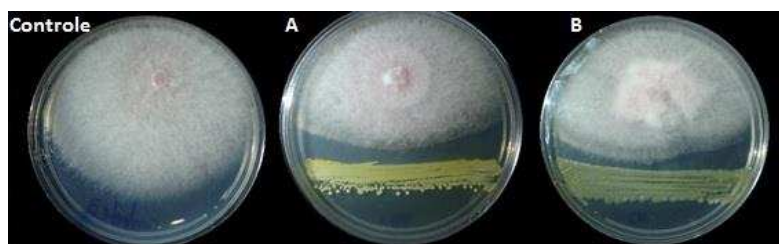


Figura 04: Isolados de levedura exercendo efeito antagonista contra *Foc*. Controle: *Foc* em meio BDA. A) Lev 42; B) Lev 48.

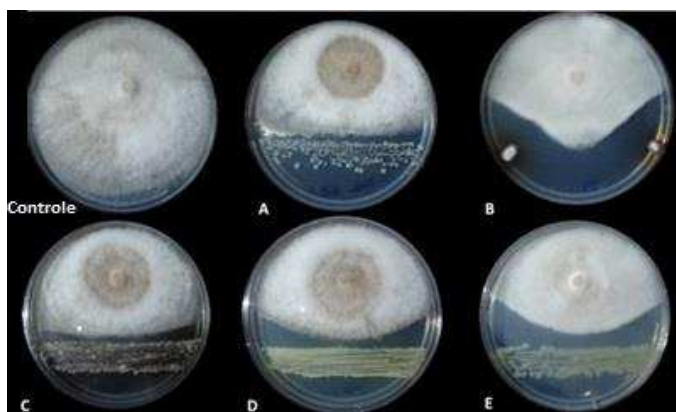


Figura 05. Isolados de levedura exercendo efeito antagonista contra *C.acutatum*. Controle: *B.cinerea* em meio BDA. A) Lev 62; B) Lev 57; C) Lev 55; D) Lev 48; E) Lev 42.

Dentre todos os isolados de bactéria obtidos, nenhum foi capaz de exercer efeito antagonista sobre os patógenos *C.acutatum* e *Foc* testados, apenas foram observados fenômenos de competição por substrato entre alguns isolados, onde o fungo crescia apenas até próximo ao isolado bacteriano. Acredita-se que um dos possíveis motivos para o não favorecimento de bactérias exercendo antagonismo contra estes patógenos tenha sido o pH ácido do meio de cultivo BDA. Todos os testes foram repetidos três vezes e os resultados foram estatisticamente diferentes (Tabela 01).

Portanto, para contornar possíveis falso-negativos devido o meio de cultivo, foi realizado o teste do filtrado. Porém, da mesma forma, nenhum resultado positivo foi encontrado para bactérias. Tal resultado pode ter sido observado, porque em alguns casos a presença do patógeno é responsável por gerar *stress* a célula e então induzir a produção de metabólitos de defesa (CAZORLA et al., 2007).

Tabela 01: Efeito das bactérias e leveduras sobre o crescimento dos Patógenos.

Isolados	Contra B. c	Contra C. a	Contra F. o
Lev 42	30,47 ± 2,83	30,267 ± 0,676	33,15 ± 1,79
Lev 48	30,83 ± 5,81	32,753 ± 1,384	31,860 ± 0,977
Lev 55	29,10 ± 1,86	32,577 ± 0,454	S/E
Lev 57	34,46 ± 6,78	38,00 ± 4,02	33,63 ± 0,00
Lev 62	S/E*	33,09 ± 1,98	S/E
Controle Lev	52,11 ± 2,44	58,94 ± 1,84	50,28 ± 1,96
Bac 15	53,00 ± 2,65	S/E	S/E
Bac 21	49,33 ± 4,04	S/E	S/E
Controle Bac	66,00 ± 1,00	S/E	S/E

*S/E: sem efeito antagonista.

Média do crescimento em mm; ± Desvio Padrão.

3.2 Identificação taxonômica

Foram identificados e classificados apenas os isolados de bactérias e leveduras que apresentaram resultado positivo nos testes de pareamento. A identificação de leveduras ainda não foi efetuada devido a problemas na padronização dos procedimentos de PCR.

Os isolados bacterianos que tiveram potencial antagonista para *B.cinerea* foram identificados como *Bacillus* spp. (Bac21) e *Lysinibacillus xylanilyticus* (Bac15) (Figura 06).

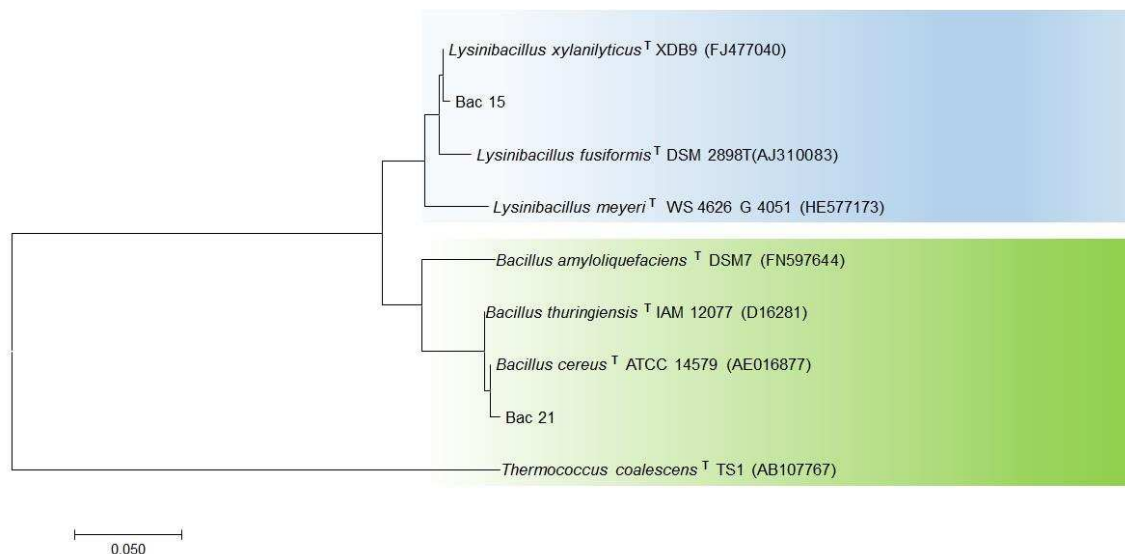


Figura 06: Análise filogenética dos genes RNAr 16S de isolados bacterianos. A árvore filogenética foi construída usando o método *Neighbor-Joining* com 1,000 *bootstrap* replicatas. O número de acesso Genbank das espécies está indicado entre parênteses. *Thermococcus coalescens* foi usado como grupo externo.

4.0 DISCUSSÃO

Na busca de alternativas viáveis ao uso de fungicidas na agricultura, os quais afetam a saúde humana e causam danos ao ambiente, existem uma série de estudos utilizando microrganismos para o controle biológico. O controle biológico está relacionado à utilização de microrganismos não patogênicos de ocorrência natural, com capacidade de reduzir os efeitos danosos de patógenos sobre as plantas, contribuindo para a supressão da doença (ZIVKOVIC et al., 2010).

O gênero *Bacillus* é amplamente citado como potencial agente controlador, existem vários estudos avaliando o potencial antagonista de *Bacillus* isolados ou combinados com outros agentes de controle biológico contra *B. cinerea* e *C. acutatum* (CHEN et al. 2008; HERNÁNDEZ-SALMERÓN et al., 2014; HAN et al., 2015; ON et al., 2015). Algumas características das cepas de *Bacillus spp.* fazem com que estes sejam promissores no controle de patógenos fúngicos, como por exemplo o estágio de esporo (resistência), além da produção de compostos antifúngicos (ŽIVKOVIĆ et al., 2010).

Testando a capacidade de produção de compostos voláteis, Chen et al. (2008) mostraram que *Bacillus subtilis* JA foram capazes de inibir significativamente a germinação de esporos e o alongamento de tubos germinais em *B. cinerea*, causando retração do protoplasma, das pontas das hifas para os esporos.

A utilização de cepas de *Bacillus subtilis* e *Brevibacterium linens* IC 10 numa co-aplicação de antagonista com patógeno significou uma redução considerável das lesões causadas pelo patógeno *B. cinerea* em tomateiros. Quando aplicado preventivamente, a eficácia foi ainda maior, devido as menores concentrações de bactérias requeridas. Porém, quando combinados os dois antagonistas os resultados foram mais promissores, indicando um efeito sinérgico entre as cepas, com produção de compostos antifúngicos, como surfactina, mostrando que a antibiose foi o mecanismo de ação contra o fitopatógeno (ON et al., 2015). Esse potencial biotecnológico, torna *Bacillus* um candidato promissor para aplicações em protocolos de controle biológico.

Quanto a cepa de *Lysinibacillus xylanilyticus*, seu primeiro relato foi de um isolado de húmus florestal, descrito pela sua capacidade de degradar xilano (LEE et al., 2010), e posteriormente quando isolada de solo foi mostrada sua capacidade de produzir enzimas fibronolíticas (RESHMA et al., 2013). Quanto ao seu papel antagonista existe apenas um relato onde isolados de alga marinha exerceram atividade antibacteriana contra as bactérias fitopatogênicas *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* e *X. axonopodis* pv. *citri* e atividade antifúngica contra *Ustilaginoidea virens* (SUVEGA e ARUNKUMAR, 2014). Entretanto, nenhum trabalho na literatura havia observado seu papel antagonista contra o fungo *B.cinerea* de morango. Afim de relatar seu papel antagonista contra os fitopatógenos, este foi o primeiro trabalho que dectou seu potencial no biocontrole de *B.cinerea*.

Leveduras do solo além de produzirem uma variedade de compostos biologicamente ativos (fitormônios, vitaminas, aminoácidos, enzimas etc.) que têm efeito no crescimento e desenvolvimento das plantas, também ajudam a aumentar a sua produtividade e produzem substâncias antimicrobianas que reduzem a infecção de fitopatógenos (IGNATOVA, 2015).

Através da capacidade de produzir compostos voláteis, *Candida intermedia* C410 foi observada inibindo a germinação dos conídeos e crescimento micelial de *B. cinerea*. Isto resultou na redução da incidência e na severidade do patógeno em culturas de morangos quando expostos aos voláteis da levedura (HUANG et al., 2011).

Cepas de leveduras *Aureobasidium pullulans* e *Rhodothorula mucilaginosa* foram relatadas pelo seu amplo espectro de ação contra 3 diferentes fitopatógenos. *A. pullulans* foi capaz de inibir *Fusarium graminearum*, *Phytophthora infestans* e *B. cinerea*, e *R.*

mucilaginoso inibiu *F. graminearum*, *Cladosporium* sp., e *B. cinerea* (IGNATOVA,2015). Esta capacidade de inibição de um amplo espectro de patógenos também foi observada no presente trabalho através dos isolados Lev 42, Lev 48 e Lev 57.

A. pullulans também já foi relatada por potencial antagonista contra *C. acutatum*, e quando inoculados artificialmente em maçãs e laranjas com os conídios do patógeno, o tratamento antagonista controlou significativamente a infecção do patógeno, confirmando os ensaios *in vitro* (DI FRANCESCO et al., 2015).

Dentre os mecanismos de inibição exercidos por leveduras, podem estar inclusos: colonização de feridas, inibição da germinação, formação de biofilme, secreção de toxinas mortais, competição por nutrientes e secreção de enzimas hidrolíticas (protease, quitinase e glucanase) (LUTZ et al., 2013).

Os testes de cultura pareada nem sempre podem ser tomados como resultados decisivos. Em teste de cultura dupla em BDA da levedura *Sporidiobolus pararoseus* YCXT3 contra *B. cinerea* não foi observada inibição do crescimento micelial, já quando as células da levedura foram inoculadas diretamente no morango houve uma redução significativa na incidência da doença porque *S. pararoseus* não acumulou substâncias tóxicas em meio por ser competidor de espaço e nutrientes limitados (HUANG et al., 2012). Porém os testes *in vitro* continuam a ser uma porta de entrada para o descobrimento do potencial de isolados em exercer atividade antagonista, e ainda se tornam mais vantajosos devido ao menor custo quando comparados aos trabalhos realizados diretamente no campo.

Como cada organismo relatado como possível antagonista de um patógeno possui uma característica peculiar no que diz respeito ao seu mecanismo de inibição, trabalhos futuros serão necessários para elucidar o mecanismo de ação de cada potencial agente de controle biológico identificado neste trabalho. Com o entendimento do mecanismo de ação característico, poderemos desenvolver novas estratégias para o controle de doenças fúngicas que têm causado perdas significativas nas culturas de morango.

5.0 CONCLUSÕES

Existem inúmeros trabalhos na literatura que buscam obter agentes microbianos para um controle biológico potencialmente eficiente, portanto um grande número de antagonistas tem sido pré-selecionados em testes *in vitro*.

As triagens de leveduras e bactérias isoladas do solo Amazônico mostraram que tais isolados tem potencial para o biocontrole dos fungos fitopatênicos *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc). O presente trabalho mostrou pela primeira vez uma cepa de *Lysinibacillus xylanilyticus* exercendo antagonismo contra o fitopatógeno *B.cinerea*. Sendo este apenas o segundo relato do potencial de controle biológico de fitopatógenos através *L. xylanilyticus*.

Embora os testes realizados no presente trabalho tenham mostrado apenas a efetividade dos agentes controladores sobre condições laboratoriais, uma validação a nível de testes *in vivo* ainda precisa ser realizada, para que seja possível pensar em um trabalho em larga escala a nível industrial e comercial. Com os resultados já encontrados pretendemos prosseguir na identificação dos isolados de levedura, bem como na identificação dos compostos responsáveis pela atividade antagonista como uma opção para o combate aos fitopatógenos e uma alternativa ao uso de pesticidas ofensivos ao ambiente e à saúde humana. Sendo assim, é de extrema importância a busca por novos agentes que se mostrem capazes de serem utilizados no biocontrole.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAZORLA, F. M. et al. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizosphere displaying biocontrol activity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 5, p. 1950-1959, 2007.
- CHEN, Hua et al. Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 5, p. 919-923, 2008.
- CIRVILLERI, G. et al. Potential biological control activity and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains. **Journal of Phytopathology**, v. 153, n. 11-12, p. 654-666, 2005.
- COSTA, S. N. et al. Genetic structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in different regions from Brazil. **Plant Pathology**, v. 64, n. 1, p. 137-146, 2015.
- DI FRANCESCO, Alessandra et al. Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. **Biological Control**, v. 81, p. 8-14, 2015.
- FELIZIANI, Erica; LANDI, Lucia; ROMANAZZI, Gianfranco. Preharvest treatments with chitosan and other alternatives to conventional fungicides to control postharvest decay of strawberry. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 111-117, 2015.
- FREEMAN, Stanley. Management, survival strategies, and host range of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. **HortScience**, v. 43, n. 1, p. 66-68, 2008.
- GHAG, Siddhesh B.; SHEKHAWAT, Upendra KS; GANAPATHI, Thumballi R. *Fusarium* wilt of banana: biology, epidemiology and management. **International Journal of Pest Management**, v. 61, n. 3, p. 250-263, 2015.
- HAN, Joon Hee; SHIN, Jong Hwan. The Plant Pathology Journal: Open Access; Antagonistic Activities of *Bacillus* spp. Strains Isolated from Tidal Flat Sediment Towards Anthracnose Pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea. **The Plant Pathology Journal**, v. 31, n. 2, p. 165-175, 2015.
- HERNÁNDEZ-SALMERÓN, J. E. et al. Isolation and characterization of genetic variability in bacteria with β -hemolytic and antifungal activity isolated from the

- rhizosphere of *Medicago truncatula* plants. **Genetics and Molecular Research: GMR**, v. 13, n. 3, p. 4967, 2014.
- HUANG, R. et al. Control of postharvest *Botrytis* fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. **Phytopathology**, v. 101, n. 7, p. 859-869, 2011.
- HUANG, R. et al. Evaluation of *Sporidiobolus pararoseus* strain YCXT3 as biocontrol agent of *Botrytis cinerea* on post-harvest strawberry fruits. **Biological Control**, v. 62, n. 1, p. 53-63, 2012.
- IGNATOVA, Lyudmila V. et al. Plant growth-promoting and antifungal activity of yeasts from dark chestnut soil. **Microbiological Research**, v. 175, p. 78-83, 2015.
- KUPPER, Katia C.; GIMENES-FERNANDES, Nelson; GOES, A. de. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 251-257, 2003.
- KUPPER, Katia Cristina; BELLOTTE, J. A.; GOES, Antonio de. Controle alternativo de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 4, p. 1004-1015, 2009.
- LANE, David J. et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 20, p. 6955-6959, 1985.
- LEE, Chang Soo et al. *Lysinibacillus xylanilyticus* sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from forest humus. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 60, n. 2, p. 281-286, 2010.
- LUTZ, M. Cecilia et al. Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. **International Journal of Food Microbiology**, v. 164, n. 2, p. 166-172, 2013.
- NUNES, D. D. Vulnerabilidade Natural à Erosão da Bacia do rio Mutum Paraná – Porto Velho/RO (relatório final de pesquisa). Porto Velho, CNPq – Universidade Federal de Rondônia, 2012.
- ON, Anna et al. Antifungal effects of compost tea microorganisms on tomato pathogens. **Biological Control**, v. 80, p. 63-69, 2015.

- PERES, N. A. et al. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, v. 89, n. 8, p. 784-796, 2005.
- PERES, N. A. R. et al. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. **Plant Disease**, v. 88, n. 2, p. 125-130, 2004.
- POSPIESH, A. and NEUMANN, B. Vesatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. **Trends in Genetics**, 11(6):217-218, 1995.
- PLOETZ, Randy C. Management of *Fusarium* wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. **Crop Protection**, v. 73, p. 7-15, 2015.
- RESHMA, C. V. et al. *Lysinibacillus xylanilyticus*, a novel bacterial strain isolated from soil with fibrinolytic activity. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 4, p. 1030 – 1037, 2013.
- RONQUIST, Fredrik et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, p. 539-542, 2012.
- ROSA, Carlos A.; LACHANCE, Marc-André. The yeast genus *Starmerella* gen. nov. and *Starmerella bombicola* sp. nov., the teleomorph of *Candida bombicola* (Spencer, Gorin & Tullock) Meyer & Yarrow. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1413-1417, 1998.
- RYAN, Thomas A.; JOINER, Brian L.; RYAN, Barbara F. **Minitab™**. John Wiley & Sons, Inc., 1994.
- STROBEL, Gary. Harnessing endophytes for industrial microbiology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 240-244, 2006.
- SILVA, Cynthia C. et al. Monitoring the bacterial community dynamics in a petroleum refinery wastewater membrane bioreactor fed with a high phenolic load. **Journal Microbiology and Biotechnology**. v. 20, p. 17-25, 2010.
- SUVEGA, T.; ARUNKUMAR, K. Antimicrobial activity of bacteria associated with seaweeds against plant pathogens on par with bacteria found in seawater and sediments. **British Microbiology Research Journal**, v. 4, n. 8, p. 841, 2014.

- SYLLA, Justine et al. Control of *Botrytis cinerea* in strawberries by biological control agents applied as single or combined treatments. **European Journal of Plant Pathology**, v. 143, n. 3, p. 461-471, 2015.
- TAMURA, Koichiro et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.
- WANG, Jingjing; ZHAO, Yan; RUAN, Yunze. Effects of Bio-organic Fertilizers Produced by Four *Bacillus amyloliquefaciens* Strains on Banana *Fusarium* Wilt Disease. **Compost Science & Utilization**, v. 23, n. 3, p. 185-198, 2015.
- ŽIVKOVIĆ, Svetlana et al. Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Archives of Biological Sciences**, v. 62, n. 3, p. 611-623, 2010.

7.0 MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela suplementar 01: Morfologia dos isolados de bactérias obtidos do solo da BHRMP.

Isolado	Cor frente	Borda	Cor verso	Elevação	Aspecto	Forma	Coloração de Gram	Observações
1	Bege claro	Ondular	Bege escuro	Chata	Brilhante	Irregular	+	
2	Bege escuro	Contínua	Bege claro	Apicoada	Brilhante	Regular	+	
3	Salmão	Contínua	Bege	Elevada	Brilhante	Regular	+	
4	Bege Claro	Contínua	Bege claro	Elevada	Brilhante	Regular	-	
6	Bege	Contínua	Bege claro	Elevada	Brilhante	Regular	+	
7	Bege	Contínua	Bege claro	Elevada	Brilhante	Regular	-	
9	Branca	Contínua	Bege	Elevada	Brilhante	Regular	+	
10	Bege	Contínua	Bege claro	Elevada	Brilhante	Regular	+	
11	Branca	Contínua	Branco	Elevada	Brilhante	Regular	+	
12	Amarela	Contínua	Amarela	Elevada	Brilhante	Regular	N/D	
13	Bege	N/D	Bege	Contínua	Brilhante	Regular	+	Crescimento extremamente rápido
14	Branco	Contínua	Branco	Contínua	Brilhante	Regular	+	
15	Amarela escura	Ondular	Bege escuro	Chata/apicoada	Brilhante	Irregular	N/D	
16	Bege translucido	Ondular	Translúcido	Elevada	Brilhante	Regular	N/D	
17	Branca	Ondular	Branca	Chata	Opaca	Irregular	N/D	
18	Salmão/Bege	Ondular	Salmão	N/D	Brilhante	Irregular	+	
19	Amarela	Ondular	Amarela	Elevada	Opaca	Irregular	+	
20	Bege escuro	Contínua	Bege escuro	Chata	Brilhante	Regular	-	
21	Bege	Contínua	Bege claro	Elevada	Brilhante	Regular	+	
24	Amarela	Contínua	Amarela	Elevada	Opaca	Regular	+	
25	Amarela Claro	Contínua	Amarelo claro	Elevada	Brilhante	Regular	+	
26	Amarelo/Transparente	Ondular	Amarelo claro	Apicoada	Brilhante	Irregular	-	
27	Bege	Ondular	Bege claro	Chata	Brilhante	Irregular	-	

29	Bege claro	Ondular	Bege claro	Chata	Opaco	Irregular	-	
30	Bege translúcido	Ondular	Bege	Chata	Semi-brilhante	Irregular	N/D	
32	Bege translúcido	Ondular	Bege	Chata	Brilhante	Irregular	-	
40	Bege	N/D	Bege	N/D	Brilhante	N/D	-	Crescimento extremamente rápido
41	Bege claro	Contínua	Bege claro	Elevada	Brilhante	Regular	+	Colônia pequena em 48hrs
43	Bege claro	Ondular	Bege claro	Chata	Opaca	Irregular	+	Crescimento rápido- colônia grande em 48hrs
45	Bege	Ondular	Bege	Chata	Opaca	Regular	+	
46	Amarelo claro	Contínua	Amarelo claro	Elevada	Brilhante	Regular	+	
47	Bege translúcida	Ondular	Bege translúcida	Apicoada	Brilhante	Irregular	+	Pontinho brilhoso no meio da colônia
49	Salmão	Contínua	Bege claro	Elevada	Brilhante	Regular	+	
50	Bege	Ondular	Bege claro	Elevada	Brilhante	Irregular	+	
51	Bege claro	Ondular	Bege claro	N/D	N/D	N/D	+	Esporulando
53	Bege	Contínua	Bege	Elevada	Brilhante	Regular	N/D	
54	Bege escuro	Ondular	Bege escuro	Apicoada	Brilhante	Irregular	N/D	Produz uma leve pigmentação
58	Bege	Ondular	Bege	Elevada	Brilhante	Radicular	-	
59	Bege claro	Ondular	Bege	Chata	Opaca	Regular	+	
61	Bege	Contínua	Bege claro	Chata	Brilhante	Irregular	+	

Tabela suplementar 02: Morfologia dos isolados de leveduras obtidos do solo da BHRMP.

Isolado	Cor frente	Borda	Cor verso	Elevação	Aspecto	Forma	Observações
42	Amarela esbranquiçada	Contínua	Amarela clara		Opaca	Regular	
48	Bege claro	Contínua	Bege claro	Apicoada	Opaca	Regular	
55	Branca	Contínua	Marrom claro	Apicoada	Opaca	Regular	Produz uma forte pigmentação escura
57	Marrom na borda e branca no centro	Ondular	Marrom	Apicoada	Opaca	Irregular	Produz uma forte pigmentação escura
62	Branca	Contínua	Bege	Apicoada	Brilhante	Regular	

CONCLUSÕES GERAIS

- I) As análises de diversidade taxonômica e funcional confirmaram que as amostras de floresta e pastagem apresentam uma complexa comunidade bacteriana, sugerindo que estas comunidades apresentam uma ampla versatilidade metabólica e, conseqüentemente, capacidade de responder às perturbações oriundas das ações antrópicas sobre o solo;
- II) O sequenciamento do gene RNAr 16S revelou que a diversidade taxonômica dos solos de pastagem é maior do que a de solos florestais;
- III) A análise funcional da comunidade microbiana total do solo mostrou através dos vários subsistemas da plataforma MG-RAST que os solos de floresta são mais estáveis que os solos de pastagem, e por isso menos susceptíveis a ação de microrganismos oportunistas, como os fitopatógenos;
- IV) A análise funcional apenas das reads afiliadas ao Domínio Bacteria pelo *software* CLC *genomics* mostrou que a abundância de todas as categorias funcionais de pastagem foi sempre maior que os de floresta;
- V) As triagens de antagonistas mostraram que cepas de bactérias e leveduras isolados do solo da BHRMP tem potencial para o biocontrole dos fungos fitopatogênicos *B. cinerea*, *C. acutatum* e *F. oxysporum* f.sp. *cubense*.