



TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**COMPOSIÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE
COMUNIDADES MICROBIANAS SOB DIFERENTES
TIPOS DE MANEJO NO CERRADO BRASILEIRO**

Acadêmico

ANTHONY DIEGO MULLER BARBOZA

**CURSO DE
GESTÃO AMBIENTAL**

ANTHONY DIEGO MULLER BARBOZA

**COMPOSIÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE COMUNIDADES MICROBIANAS SOB
DIFERENTES TIPOS DE MANEJO NO CERRADO BRASILEIRO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Gestão Ambiental, da Universidade Federal
do Pampa (UNIPAMPA, SG), como requisito
parcial para obtenção do grau de Gestor(a)
Ambiental

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Wurdig Roesch

São Gabriel, RS, Brasil 2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS SÃO GABRIEL
CURSO DE GESTÃO AMBIENTAL**

**Composição e Distribuição de comunidades Microbianas sob diferentes tipos
de Manejo no Cerrado Brasileiro**

Trabalho de Conclusão de curso
Apresentado a Universidade Federal do
Pampa como requisito parcial na
obtenção do título de graduação em
gestão ambiental

Área de concentração: Ecologia microbiana

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em 7 de outubro de 2013
Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Fernando Wurdig Roesch
Orientador
Unipampa

Prof. Dr^a. Luciana Borba Benetti
Unipampa

Prof. Ms. Beatriz Stoll
Unipampa

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Pampa e a todo corpo docente do curso de Gestão Ambiental por oportunizarem um ensino de qualidade.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Wurdig Roesch, pela oportunidade dada na iniciação científica.

Aos colegas de trabalho no laboratório, Leandro Lemos, Afnan Suleiman, Manoeli Lupatini, Pabulo Rampelotto e Miriane Saraiva, pelo belo trabalho em equipe e amizade.

Aos colegas de curso Anderson Lucas, Alex Marques, Ariane Prestes, Fernando Lima, Guilherme Andreazza, Marcio Cure e Raniéle Silveira, pelo companheirismo e amizade de sempre.

A toda a minha família, da qual sinto um imenso orgulho, por sempre acreditar na minha força de vontade para a realização deste e de outros objetivos e especialmente à minha mãe à quem dedico este trabalho.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram ou simplesmente torceram para que esta etapa da vida fosse bem sucedida.

RESUMO

O Cerrado brasileiro é considerado a savana mais rica e diversificada do mundo, e foi classificado como um dos principais "hotspots" de biodiversidade. É um bioma representativo no centro do Brasil e o segundo maior bioma em biodiversidade da América do Sul sendo considerado um importante corredor ecológico. Porém, grandes áreas de vegetação nativa foram convertidas em áreas de agricultura, seja para produção de grãos, pecuária, ou silvicultura caracterizando uma perda de aproximadamente 40% da cobertura vegetal deste bioma. Neste contexto, a compreensão de como o uso da terra afeta comunidades microbianas é fundamental para a gestão sustentável dos ecossistemas agrícolas, uma vez que os microorganismos são os principais agentes que regulam a ciclagem de nutrientes no solo, afetando diretamente a produtividade vegetal e a estabilidade dos ecossistemas. O objetivo deste trabalho foi conhecer a composição e como se distribuem as comunidades bacterianas do solo do Cerrado brasileiro associadas a diferentes sistemas de uso da terra, utilizando pirosequenciamento do gene 16S do rRNA. Foram observadas a composição e estrutura das comunidades bacterianas em solos sob diferentes sistemas de uso da terra, o que possibilitou identificar os filos quanto a sua abundância e também a distribuição das comunidades, sugerindo que o manejo do solo é fator determinante na estrutura das comunidades microbianas.

Palavras-chave: ecologia microbiana, pirosequenciamento, 16S rRNA

ABSTRACT

The Brazilian Cerrado is considered the most richest and diverse savana in the world and was rated as one of the major "hotspots" of biodiversity. It is representative biome in central Brazil and the second largest biome in South America biodiversity and is considered an important wildlife corridor. However, large areas of native vegetation have been converted into agricultural areas, whether for grain production, livestock or forestry characterizing a loss of approximately 40% of the vegetation of this biome. In this context, understanding how land use affects microbial communities is essential for the sustainable management of agricultural ecosystems, since microorganisms are the main agents that regulate the cycling of nutrients in the soil, directly affecting plant productivity and stability of ecosystems. The objective of this study was to know the composition and how to distribute the bacterial communities of the soil in Brazilian Cerrado associated with different land use systems using pyrosequencing of 16S rRNA. We observed the composition and structure of bacterial communities in soils under different land use systems, which allowed identifying phyla as their abundance and distribution of communities, suggesting that soil management is an important factor in the structure of microbial communities.

Keywords: microbial ecology, pyrosequencing, 16S rRNA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fabela 1 – Tabela de análise físico-química do solo.....	12
Figura 1 – Grafico representando abundância relativa dos filos.	17
Figura 3 – Gráfico de coordenadas principais.....	18

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1	Locais de estudo e amostragem de solo.....	11
2.2	Extração do DNA, Amplificação do gene 16S do rRNA e pirosequenciamento	12
2.3	Análises das sequências.....	13
2.4	Determinando grupos similares e dissimilares na comunidade bacteriana	15
3	RESULTADOS	16
3.1	Propriedades físico-químicas do solo.....	16
3.2	Composição e distribuição das comunidades bacterianas do solo..	16
3.3	Similaridade entre as comunidades com base na estrutura e função.....	17
4	DISCUSSÕES	Erro! Indicador não definido.
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	26
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado brasileiro é um bioma representativo no centro do Brasil e o segundo maior bioma da América do Sul cobrindo cerca de 24% da área no país. Este bioma é caracterizado por uma elevada diversidade de plantas com mais de 10.000 espécies (cerca de metade são endêmicas) e diferentes tipos de vegetação, incluindo formações florestais, savanas e pradarias (OLIVEIRA e MARQUIS, 2002). É uma das savanas mais ricas e diversificadas do mundo e foi classificado como um dos principais “hotspots” de biodiversidade (MYERS et al. 2000; MITTERMEIER et al. 2005). Além disso, o Cerrado brasileiro também é importante como um corredor ecológico para algumas espécies que habitam a Amazônia e a Mata Atlântica.

A maioria dos solos no Cerrado são bastante intemperizados, Latossolos e Argissolos, que são ácidos, pobres em nutrientes e ricos em óxidos de ferro e alumínio (OLIVEIRA E MARQUIS, 2002). No entanto, durante as últimas décadas, o Cerrado tem sido alocado para uma variedade de atividades, incluindo a produção de grãos, pecuária e silvicultura, o que fez esse bioma se tornar na maior área de produção de grãos no Brasil e uma das maiores fronteiras agrícolas do mundo. Como consequência, parte relevante do Cerrado foi rapidamente convertida em pastagens e terras agrícolas (CARVALHO et al. 2009).

Mapeamentos do uso do solo revelam que aproximadamente 40% da área com cobertura natural do Cerrado foi convertida para outros usos (SANO; BRITO; FERREIRA, 2010). Segundo o Ministério do Meio Ambiente (2009) o Cerrado sofreu um desmatamento médio anual de 14.200 km², entre 2002 e 2008. Por estas razões, o Cerrado é considerado um dos ecossistemas mais ameaçados do mundo (MARRIS, 2005; FERREIRA et al. 2012). A cobertura vegetal, por sua vez, afeta os processos ecológicos do solo, como a ciclagem de nutrientes e as emissões de gases (BISSET et al. 2011), mas ainda não está claro como essas mudanças afetam a diversidade microbiana do solo.

Os microorganismos são um dos principais componentes ativos do solo, regulando o ciclo de nutrientes e afetando a produtividade vegetal e estabilidade dos ecossistemas. Uma vez que os microrganismos são os principais agentes que regulam a ciclagem de nutrientes no solo, que afetam diretamente produtividade vegetal e a estabilidade dos ecossistemas.

O conhecimento de como a diversidade microbiana é influenciada por sistemas de manejo do solo pode ajudar-nos a compreender as mudanças no balanço de carbono, no fluxo de energia e nos fluxos de gases de efeito estufa nestas áreas que foram alteradas. Esse conhecimento é fundamental para a gestão sustentável dos ecossistemas florestais e agrícolas.

A maioria dos estudos no Cerrado têm-se centrado na diversidade de flora e fauna (KLINK e MACHADO, 2005) e poucos estudos têm comparado áreas nativas com áreas convertidas para pastagem ou agricultura (QUIRINO et al. 2009; PEIXOTO et al. 2010). Estudos que abordam a microbiologia do solo tem sido baseados em abordagens limitadas como medidas bioquímicas e/ou técnicas de impressões digitais. Além disso, os estudos foram realizados tanto em tipos distintos de solo quanto em estações diferentes, o que dificulta uma análise comparativa entre ecossistemas. Apenas um trabalho recente caracterizou a diversidade bacteriana de áreas nativas, utilizando tecnologia de pirosequenciamento (ARAUJO et al. 2012).

Uma questão ainda em aberto é a forma como os diferentes sistemas de uso da terra influenciam a diversidade e estrutura das comunidades microbianas sob o mesmo tipo de solo. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi conhecer as comunidades bacterianas do solo do Cerrado sob diferentes sistemas uso do solo, utilizando pirosequenciamento de alto rendimento do gene 16S do rRNA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Locais de estudo e amostragem de solo

A pesquisa foi realizada com amostras de solo de áreas agrícolas e naturais na região do Triângulo Mineiro, no estado de Minas Gerais, Brasil, a 18° 58' S e 47° 02' W e 939 m acima do nível do mar. O clima da região é classificado como Cwa, com temperatura média anual de 22 °C (OLIVEIRA e MARQUIS, 2002). A precipitação média anual é de cerca de 1.500 mm, mas quase 90% desta precipitação cai durante a estação chuvosa que vai de novembro a março (OLIVEIRA e MARQUIS, 2002).

A textura do solo é argilosa e classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Um total de 12 amostras de solo (três amostras aleatórias por ambiente) foram retiradas de quatro locais, sendo eles: Floresta Natural (floresta mesófila composta por espécies de *Qualea grandifolia*, *Bowdichia virgilioides*, *Pterodon pubescens*, *Caryocar brasiliense*, *Vatairea macrocarpa*, *Astronium fraxinifolium*, *Eugenia dysenterica*, e *Hymenaea stigonocarpas*); Pastagens (usado para pecuária, composta por *Brachiaria decumbens* ~ 20 anos de idade), Canavial (monocultura da cana ~ 15 anos de idade e anualmente fertilizado com N, P e K), e Floresta de Coníferas (Floresta densa de *Pinus* composta por *Caribaea hondurensis* com 32 anos de idade e a superfície do solo apresentada uma camada de 10 cm de serrapilheira).

Cada amostra de solo foi composta por blocos de solo com as seguintes dimensões 30 x 20 x 5 cm (largura, comprimento, altura). Quatro sub-amostras foram coletadas aleatoriamente e separadas, logo após foram passadas em uma peneira de 3.35mm. Todo solo foi armazenado em gelo após a coleta e transportado para o laboratório para a extração do DNA. Uma parte de cada amostra de solo foi seca e esmagada em um recipiente de porcelana para que fossem determinadas as propriedades químicas e físicas. (Tabela 1).

Tabela 1. Localização e características físico-químicas do locais de coleta: Floresta Natural, Pastagem, Cana de açúcar, e Floresta de Pinus.

Localização / Características físico-químicas do solo	Locais			
	FN	P	CA	FP
Latitude (S)	19° 20' 41''	19° 20' 42''	19° 20' 43''	19° 04' 39''
Longitude (W)	48° 00' 58''	48° 05' 22''	48° 05' 49''	48° 10' 19''
Altitude (m)	940	935	942	941
Areia (g kg ⁻¹)	140	170	160	190
Argila + Silte (g kg ⁻¹)	860	830	840	810
N (mg kg ⁻¹)	3.24±0.15	1.92± 0.08	1.64±14	1.46±0.07
P Melich (mg kg ⁻¹)	1.8±0.5	1.1±0.5	18±3.6	1.7±0.6
K (mg kg ⁻¹)	37±5	62±17	144±30	10±4
Ca ²⁺²⁺ (mg kg ⁻¹)	4.4	32.0	60.0	2.0
Mg ²⁺²⁺ (mg kg ⁻¹)	2.0	9.0	22.0	2.0
Al ³⁺ (mg kg ⁻¹)	25	2.0	0.0	20
pH (em água)	4.0	5.2	7.0	4.2
Carbono orgânico do solo (gkg ⁻¹)	48.2±1.7	32.8±1.6	23.7±1.1	25.1±1.2
Relação carbono-nitrogênio (C:N)	14.9	17.1	14.4	17.2

FN, Floresta Natural; P, Pastagem; CA, Cana de açúcar; FP, Floresta de Pinus

2.2 Extração do DNA, Amplificação do gene 16S do rRNA e pirosequenciamento

O DNA genômico foi extraído a partir de 250mg de cada amostra de solo usando o kit comercial Soil DNA Isolation Kit (*Norgen, Canada*) seguindo o protocolo do fabricante. A pureza e a concentração foram determinadas por espectrofotometria

(*BioDrop Analyzer*).

As bibliotecas com os fragmentos do gene 16S do rRNA foram criadas usando à química para seqüenciamento unidirecional de bibliotecas de amplicons 454 GS FLX Titanium (*Lib-L*). Códigos de barras foram utilizados para marcar as misturas de amplicons para que fossem separadas posteriormente a partir de processamento computacional.

Para se fazer isto, oito *barcodes* foram adicionados na terminação 5' dos oligonucleotídeos iniciadores reversos usando o método de auto correção de Hamady et al. (2008) Os oligonucleotídeos iniciadores foram anexados as seqüências (5' CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG 3') e (5' CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG 3') dos adaptadores A-key B-key GS *FLX Titanium*, respectivamente. Um link de duas bases foi inserido entre os adaptadores do 454 e os oligonucleotídeos iniciadores para reduzir a possibilidade de um efeito inesperado causado pelos oligonucleotídeos iniciadores modificados na eficiência do PCR.

Foram feitas doze reações de PCR, para isso foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores 338R e 27F para a amplificação da região hipervariável V1-V2 do gene 16S do rRNA. As condições para o PCR foram 94°C por 2 min., 30 ciclos de 94° por 45 seg., 55°C por 45 seg. e 72°C por 1min, seguido por extensão final à 72° por 6 min.

Os produtos de PCR de cada uma das amostras foram purificados e combinados em quantidades equimolares através método do kit *SequalPrep* (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*). Todas as seqüência não processadas foram submetidas ao banco de dados do *NCBI* sob o número de acesso SRA 064966.

2.3 Análise das seqüência

As seqüência obtidas foram processadas com o *software Qiime* (CAPORASO et al. 2010) utilizando-se as configurações padrão do programa. Primeiramente as seqüência bacterianas pequenas (<200pb), seqüência com baixos escores de qualidade (<25), seqüência que não demonstraram igualdade com os oligonucleotídeos iniciadores e *barcodes*, seqüência que apresentaram mais de duas bases indefinidas ou seqüência que não apresentaram mais que 60% de

semelhança com sequência de gene 16S do rRNA previamente descritas foram excluídas. Os dados também foram submetidos a ferramenta *Chimera Slayer* do software *Mothur* (SCHLOSS et al. 2009) para a identificação de potenciais sequência quiméricas. Após a remoção das sequência de baixa qualidade as sequência foram separadas em seus respectivos solos pelos barcodes. As sequência foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (UTOs) à 97% de similaridade e as sequência mais abundantes de cada UTO foi escolhida como representativa.

As sequência foram classificadas taxonomicamente com o classificador do RDP (WANG et al. 2007) que atribui a informação taxonômica completa de domínio à gênero para cada sequência no banco de dados com 80% de confiança a uma probabilidade de erro de 0.001. Para cada nível taxonômico (Filo, Classe, Ordem, Família e Gênero) e para as OTUs agrupadas à 97% de similaridade feito calculado pelo índice de *Shannon-Weaver*. Para isto um total de 1.100 sequência foram subamostradas do conjunto de dados total e re-analisadas para evitar erros causados por conjuntos de dados irregulares (LEMOS et al. 2011). O conjunto representativo de sequências, também foi utilizado para alinhar as sequências contra uma base de dados de referência e para construção de uma árvore filogenética necessária para inferências posteriores.

Essas atribuições taxonômicas foram usadas para construir uma tabela de UTOs, que é uma matriz de abundância de OTU's para cada amostra com identificadores taxonômicos significativos para cada UTO.

2.4 Determinação de grupos similares e dissimilares na comunidade bacteriana

A análise de Coordenadas principais (PCoA) foi realizada para encontrar conjuntos de grupos semelhantes entre tratamentos. O PcoA é um método de ordenação com base em análise estatística multivariada, que mapeia as amostras em diferentes dimensões e reflete a similaridade das comunidades biológicas.

Calculou-se uma matriz usando a métrica UniFrac (ponderado e não ponderado) para cada par de ambientes. As distâncias foram transformadas em pontos no espaço com o número de dimensões igual a $n-1$ (número de amostras menos um). Para testar se os resultados foram robustos foi usada a técnica de *Jackknifing*, na qual os grupos de um PCoA são reconstituídos utilizando-se sub-amostras com 600 sequência aleatórias selecionadas de cada amostra, repetido por 100 vezes. Tal procedimento gerou um gráfico em três dimensões composto pelos valores médios obtidos.

Em torno dos valores médios, elipses que representam os IQRs (medida de dispersão estatística obtida por seqüenciamento *Jackknifing*) foram construídas. Se as elipses são pequenas, o mesmo resultado pode ser atingido com um conjunto diferente de seqüências a partir do mesmo ambiente, mas se as elipses são grandes, um resultado diferente pode ser esperado. A análise foi realizada usando métrica de distância não ponderada, que representa presença e ausência de espécies microbianas e métrica de distância ponderada, que representa mudanças na abundância relativa das comunidades. O PCoA **Jackknifed** foi realizado com a utilização do software Qiime (CAPORASO et al. 2010).

3 RESULTADOS

3.1 Propriedades físico-químicas do solo

Os dados das propriedades físico-químicas das quatro diferentes áreas são representados na tabela 1. As áreas possuem condições edafoclimáticas semelhantes, com a mesma classe textural de solo e teores de argila e areia semelhantes. Em geral, foram observadas diferenças significativas no canalial, que apresentou altos níveis de P, K, Ca²⁺, e Mg²⁺ em comparação com os outros locais. Estes resultados eram esperados dado o aporte contínuo de nutrientes nesta área. A pastagem também apresentou níveis elevados de K, Ca²⁺, e Mg²⁺, embora quase duas vezes menor do que as concentrações encontradas no canalial. Em termos de carbono orgânico do solo, altos níveis foram observados na floresta natural e no canalial. Baixo pH e altos níveis de Al³⁺ foram observados nas florestas. A relação carbono nitrogênio foi semelhante entre as áreas estudadas. Em geral, observou-se que as propriedades físico-químicas do solo da floresta natural e da floresta de coníferas foram semelhantes uns aos outros (exceto para o carbono orgânico do solo e teor de nitrogênio), enquanto a pastagem e o canalial apresentaram diferentes propriedades físico-químicas em relação aos outros sistemas de uso da terra.

3.2 Composição e distribuição das comunidades bacterianas do solo

Após a filtragem das sequências com base na qualidade e remoção das sequências com menos de 200 bases, um total de 126.957 sequências de alta qualidade foram obtidas (8.000– 17.500 sequências por amostra; 23,085–45,990 sequências por área). Em todas as amostras, 83,15 % das sequências foram classificadas abaixo do nível de domínio. A análise das sequências derivadas das 12 bibliotecas apresentou um total de 20 filos dentro das quatro áreas de Cerrado (Fig.1). Seis filos (*Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacterioidetes*, *Firmicutes*, e *Gemmatimonadetes*) foram considerados abundantes com frequência de sequência acima de 2% (Figura 1a), e 14 filos (*Chlamydiae*, *Chloroflexi*,

Cyanobacteria, *Deinococcus-Thermus*, *Fusobacteria*, *Nitrospira*, *OD1*, *OP10*, *Planctomycetes*, *SR1*, *Spirochaetes*, *TM7*, *Verrucomicrobia*, e *WS3*) foram considerados pouco abundantes com frequência de sequências menor que 2% (Figura 1b). Entre eles, os filos *Chlamydiae*, *cianobactérias*, *Fusobactérias*, *espiroquetas* e apresentou abundância inferior a 0,2%.

Os filos bacterianos representativos *Proteobacteria* e *Acidobacteria* foram dominantes em todas as comunidades estudadas, correspondendo à cerca de $30,2 \pm 2,3$ % e $30,3 \pm 9,0$ % do total de sequências analisadas, respectivamente. Enquanto que *Proteobacteria* apresentou uma abundância constante em todas as áreas estudadas, o filo *Acidobacteria* foi mais abundante no solo de floresta natural e floresta de conífera que em comparação com a pastagem e o canavial. Aproximadamente $19,7 \pm 7,1$ % das sequências em cada local permaneceu sem classificação. Estas foram mais abundantes nas áreas de cana de açúcar, campo e na floresta de coníferas em comparação com a floresta natural.

O filo *Actinobacteria* também foi identificado em todas as áreas estudadas ($10,4 \pm 4,4$ %), com maior abundância na pastagem ($16,1 \pm 2,5$ %).

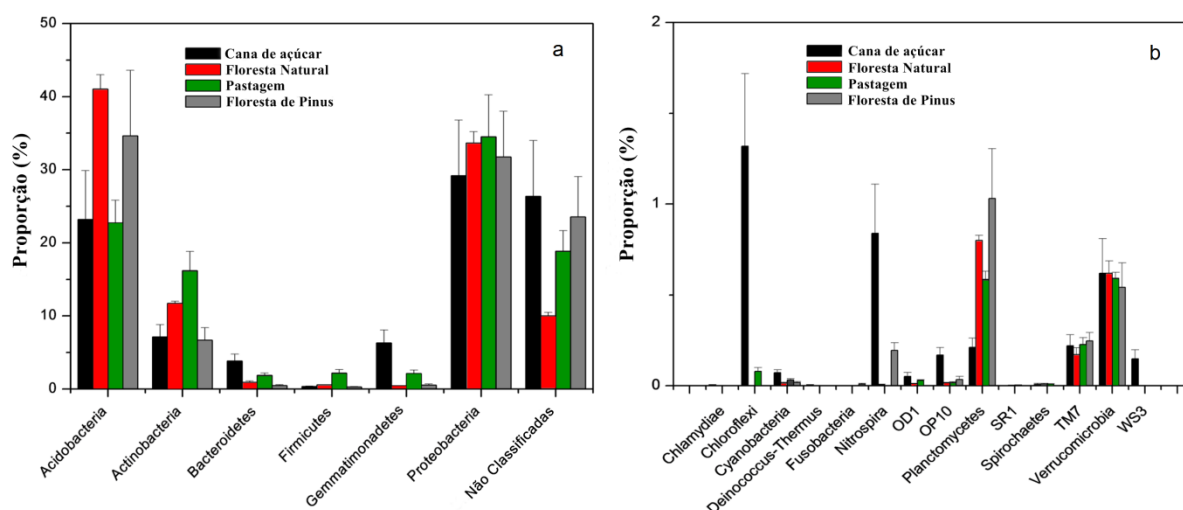


Figura 1 - Abundância relativa dos filos para cada biblioteca de solo. a) abundância relativa maior do que 2%. b) abundância relativa menor do que 2%. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

3.3 Similaridade entre as comunidades com base na estrutura e função

Para melhor explorar as semelhanças e diferenças na estrutura da comunidade bacteriana entre as áreas, comparações simultâneas de todas as 12 comunidades microbianas foram realizadas com *Jackknifed* PCoA. A análise UniFrac não ponderada demonstrou que as comunidades bacterianas do solo das áreas do Cerrado foram bastante diferentes umas das outras (Fig. 2a). Isso também ocorreu com as amostras submetidas à análise ponderada (*UniFrac* ponderado Fig.2b), que embora mais próximos umas das outras, permaneceram distintas.

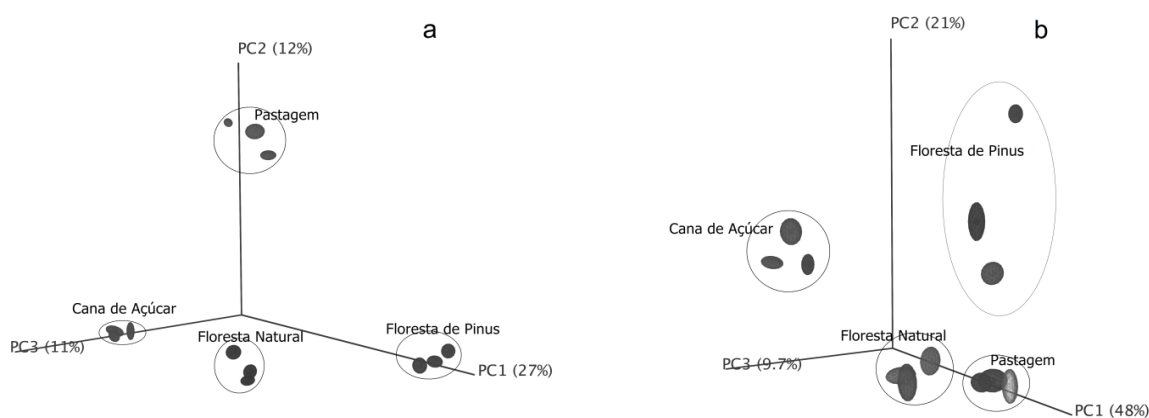


Figura 2 – Gráfico de coordenadas principais representando os grupos de comunidades bacterianas das amostras do Cerrado. **a)** representa análise ponderada. **b)** representa análise não ponderada. Os grupos foram gerados com a utilização de sub-amostras com 600 sequências de cada ambiente. A posição dos pontos representa a média dos resultados com a métrica jackknife e as elipses representam a distribuição da média em 100 repetições.

4 DISCUSSÃO

O solo é um dos ambientes mais difíceis de trabalhar, devido à complexidade da sua matriz e suas propriedades físico-químicas, (DELMONT et al. 2011). Estas propriedades únicas e desafios metodológicos adicionais conferem diversos problemas críticos para estudos de metagenômica do solo (desde a amostragem do solo até as análises dos dados do seqüenciamento) que podem distorcer a real comunidade microbiana destes solos (LOMBARD et al. 2011), e conseqüentemente, afetar a compreensão sobre a estrutura e função destas comunidades microbianas. A primeira questão a ser considerada é com relação à amostragem do solo. Em nosso estudo, os solos de todas as áreas foram classificados como latossolos (Tabela 1), isso exclui eventuais influências devido a diferenças entre os tipos de solos (as áreas estão perto umas das outras). As diferenças nas propriedades químicas são exclusivamente associadas com os sistemas de manejo adotado para cada um dos solos. As amostras foram coletadas em abril, durante o início da estação seca (de abril à setembro). Os fatores climáticos são muito importantes, pois se sabe que as estações do ano podem afetar fortemente as comunidades microbianas do solo (VIANNA et al. 2011; MENDES et al. 2012). As amostras de solo da rizosfera refletem a influência das espécies de plantas na comunidade microbiana, portanto não foram utilizadas em nosso estudo para evitar que influenciassem nos resultados. As amostras foram coletadas na camada superior do solo de 0 à 5cm de profundidade pois é a camada que apresenta uma maior comunidade microbiana e é a mais afetada pelo tipo de manejo.

A segunda questão a ser considerada é em relação à extração de DNA. Devido à grande diversidade do solo, a eficiência da extração do DNA pode variar de acordo com o tipo de solo e o protocolo utilizado. Vários estudos demonstraram diferenças na estrutura de comunidades microbianas de acordo com diferentes métodos de extração do DNA e que a eficiência destes métodos pode ter relação com o tipo de solo (FEINSTEIN; SUL; BLACKWOOD, 2009), (INCEOGLU et al. 2010), (KAKIRDE; PARSLEY; LILES, 2010) e (PETRIC et al. 2011). A maior parte dos solos do Cerrado são argilosos e os protocolos de extração de DNA normalmente são menos efetivos nestes solos (FROSTEGARD et al. 1999). Além disso, o DNA extraído de solos

geralmente apresenta concentrações elevadas de ácidos húmicos e fúlvicos, que têm propriedades químicas semelhantes às do DNA. O que faz destes compostos orgânicos fortes inibidores de reacções enzimáticas, interferindo negativamente na posterior amplificação por PCR (WILSON, 1997; SCHRIEWER et al., 2011). Além disto, os métodos de extração direta de DNA raramente alcançam mais do que 60% do DNA contido no solo (LUNA; DELL'ANNO; DANOVARO, 2006) e é estimado que 30 % do DNA bacteriano é perdido na purificação posterior à extração (HOWELER; GHIORSE; WALKER, 2003). Neste estudo, utilizou-se um kit comercial que tem sido amplamente utilizado para extrações de alta qualidade e com bom rendimento em diferentes tipos de solo, e purificações posteriores não são necessárias. Além disso, foi utilizado o mesmo protocolo para todas as amostras de solo para minimizar quaisquer alterações nos resultados pela extração do DNA.

A terceira questão a ser considerada é em relação à amplificação da PCR. A eficiência da amplificação é influenciada por inúmeros fatores como a composição do tampão, condições de ciclagem, presença de inibidores na amostra de DNA (i.e., ácidos húmicos e fulvicos), tamanho da sequência alvo, composição de bases da sequência, a especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores e a termoestabilidade da polimerase utilizada (WU et al. 2010; AIRD, et al. 2011; LÓPEZ-BARRAGÁN et al. 2011; SCHLOSS et al., 2011; PINTO & RASKIN, 2012). Em conjunto, esses fatores levam a vieses que precisam ser levados em consideração, a fim de compreender os riscos envolvidos na avaliação precisa da estrutura bacteriana e diversidade na investigação da ecologia microbiana.

Nos últimos anos, uma atenção especial tem sido dada aos vieses gerados pela utilização de oligonucleotídeos iniciadores "universais" 16S (BAKER et al., 2003; MAO et al. 2012). A escolha dos oligonucleotídeos iniciadores é um dos fatores mais importantes que afeta as análises do gene 16S do rRNA e a seleção de oligonucleotídeos iniciadores inadequados pode comprometer a interpretação dos resultados da PCR. De fato, vários estudos recentes têm demonstrado que muitos oligonucleotídeos iniciadores comuns usados em trabalhos anteriores apresentam eficiência variada na amplificação de fragmentos do gene 16S do rRNA (FARRIS & OLSON, 2007; SIPOS, et al. 2007; FRANK, et al. 2008; MORALES & HOLBEN, 2009), o que pode comprometer os resultados obtidos a partir de amostras ambientais, uma vez que não se pode estimar a verdadeira presença e abundância de todas as bactérias. Mesmo quando a diversidade microbiana é mensurada na

mesma amostra os resultados podem variar de forma relevante, dependendo da escolha dos oligonucleotídeos iniciadores (CLAESSON et al. 2010). Esse problema ocorre porque regiões hipervariáveis diferentes do gene 16S evoluem à taxas diferentes e diferentes espécies do mesmo gênero podem ser semelhantes em regiões hipervariáveis e diferentes em outras regiões. Por esta razão, as combinações de oligonucleotídeos iniciadores e o tamanho dos fragmentos torna os estudos susceptíveis à perda de alguns grupos de bactérias ou pelo menos pode subestimar a abundância de alguns táxons bacterianos.

Várias tentativas foram feitas para desenhar e aperfeiçoar os conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores “universais” para o gene 16S do rRNA (WANG et al., 2009; WINSLEY, et al. 2012), mas estes ainda não foram adotados pela comunidade científica uma vez que estudos adicionais são necessários para confirmar a eficiência dos novos oligonucleotídeos iniciadores.

Embora a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores 27F e 338R possam subestimar a abundância do filo Verrucomicrobia (BERGMANN, et al. 2011), e os códigos de barras utilizados possam ser uma fonte de erro (BERRY, et al. 2011), estes oligonucleotídeos iniciadores foram selecionados para as reações de PCR (e subsequente sequenciamento através da extremidade oposta) porque os amplicons curtos gerados por eles são menos sujeitos a vieses de heterogeneidade, de comprimento e à formação de quimeras. Além disso, as sequências produzidas por estes iniciadores são conhecidas por proporcionar uma resolução taxonômica que vai desde o nível de filo até gênero (LIU, et al. 2007). Portanto, isso os tornam adequados para a determinação de semelhanças e diferenças biologicamente significativas entre as amostras microbianas.

A quarta questão a ser considerada é sobre os erros no pirosequenciamento e elementos que ocorrem devido a imprecisões no processo de sequenciamento, independentemente da tecnologia em uso (QUINCE, et al. 2009; GOMEZ & TEAL; SCHMIDT, 2009; (TEAL & SCHMIDT, 2010; NIU, et al. 2010; QUINCE, et al. 2011). As mais altas taxas de erros dos sistemas de sequenciamento de nova geração em comparação com o tradicional sequenciamento Sanger e a ausência de uma compreensão detalhada das características dos erros tornam difícil a efetiva utilização do pirosequenciamento (WOLEY; YE, 2009; KUNIN, et al. 2010; BAKKER, et al. 2012). Neste estudo, tentou-se superar estas obliquidades tanto quanto possível. Considerando os altos níveis de robustez e

resolução da metodologia adotada, a baixa variação entre as amostras de cada área e a qualidade dos resultados, acredita-se que os problemas foram minimizados e as descobertas foram consistentes. Em geral, esse estudo expõe as diferenças e similaridades entre comunidades bacterianas do solo relacionadas com os diferentes usos do solo e manejos da agricultura.

Embora os filos *Proteobacteria* e *Acidobacteria* sejam dominantes em todas as comunidades estudadas, como geralmente são observados em bibliotecas de bactérias do solo, as distribuições não são similares (Fig. 1a). *Proteobacteria* apresentou uma distribuição constante em todas as áreas estudadas, indicando que este filo, quando analisado como um único grupo, pode não ser amplamente afetado pelas mudanças causadas pelo manejo do solo.

Acidobacterias foram mais abundantes nas áreas de floresta, que apresentaram o pH ácido (4.0–4.2) e baixos níveis de nutrientes, i.e. (Fig. 1), o que sustenta a ideia que o pH do solo regula a abundância deste filo (SAIT et al., 2006; JONES, et al. 2009). Curiosamente, um estudo anterior demonstrou que o filo *Acidobacteria* foi considerado o grupo dominante na Mata Atlântica (BRUCE, et al. 2010). A abundância de *Acidobacterias* em canaviais e pastagens foi semelhante a outros estudos que relatam que os membros desse filo constituem cerca de 20% do total das comunidades bacterianas presentes em vários tipos de solo (NACKE, et al. 2011; NAETHER, et al. 2012), muito provavelmente, devido ao pH neutro do canavial ou menos ácido da pastagem. A disponibilidade de carbono orgânico não apresentou qualquer influência sobre a distribuição desse filo, como sugerido anteriormente (FIERER et al., 2007). O modo de vida de crescimento lento adaptado aos baixos níveis de nutrientes, ampla capacidade metabólica e tolerância a variação da umidade, são considerados fatores importantes para a adaptação dos membros deste filo às condições adversas do solo. (WARD, et al. 2009), e pode explicar sua abundância em ambientes com estações do ano bem definidas, nutricionalmente limitados e ácidos encontrados no Cerrado. Além disso, mudanças no solo de florestas são relativamente raras, o que pode permitir que grandes populações, particularmente as de crescimento lento, deste grupo possam se desenvolver. Entretanto, pouco se sabe sobre as características fisiológicas e ecológicas das diferentes subdivisões de *Acidobacteria* (QUAISER, et al. 2003). Uma vez que a maioria destes organismos não foram cultivados e se conhece apenas por sequências do gene 16S do rRNA, suas funções ecológicas e possíveis

influências no solo continuam desconhecidas. Considerando a abundância, diversidade e resistência das *Acidobacterias* nos solos de todo o mundo (BARNS, et al. 1999 e 2007), os membros deste filo podem apresentar funções ecológicas relevantes nas comunidades microbianas dos solos do Cerrado (LEE et al., 2008).

Actinobacteria foi o terceiro filo em termos de abundância nas áreas do Cerrado, especialmente nas áreas de pastagem. Este grupo é amplamente distribuído em diferentes ambientes, incluindo solos ácidos e áridos (HOLMES, et al. 2000; VENTURA, et al. 2007), e desempenham um papel crítico na decomposição da matéria orgânica. Membros do filo *Actinobacteria* apresentam alta resistência a radiação UV, calor e ressecamento (LE BLANC et al., 2008; ESSOUSSI, et al. 2011). Estas características podem explicar a abundância destes organismos na área de pastagem no Cerrado. Pastagens possuem pouca cobertura vegetal e conseqüentemente são expostas a altos níveis de radiação (incluindo UV), o que leva a perda de água e o ressecamento do solo. Além disso, *Actinobacteria* são conhecidas pela produção de antibióticos e de outros metabolitos secundários, o que significa que elas podem ser capazes de excluir outras bactérias, liberando compostos químicos (QUIRINO, et al. 2009) e contribuindo para a sanidade das espécies vegetais. Membros de *Actinobacterias* foram o principal grupo encontrado em solos contaminados com metais pesados (GREMION et al., 2003; SCHMIDT, et al. 2005), e os solos do Cerrado possuem altos níveis de alumínio, manganês, ferro e provavelmente outros metais pesados (OLIVEIRA e MARQUIS, 2002). Estudos recentes indicam que o manejo do solo influencia na estrutura das comunidades de *Actinobacterias* (LAUBER, et al. 2008; HILL, et al. 2011). Considerando a relevância deste grupo na decomposição de matéria orgânica, este resultado tem implicação importante no ciclo do carbono em solos do Cerrado, que destacam a importância das *Actinobacterias* para a ecologia microbiana e gestão da agricultura da região.

Além dos três grupos dominantes (*Proteobacteria*, *Acidobacteria* e *Actinobacteria*), *Bacteriodetes*, *Firmicutes* e *Gemmatimonadetes* estavam presentes em frequências superiores a 2% ao longo das quatro áreas de Cerrado. Em geral, a abundância de *Bacteriodetes* e *Gemmatimonadetes* foi maior na cana de açúcar seguido pela pastagem.

A abundância de *Bacteriodetes* em sistemas agrícolas pode estar relacionada com a sua capacidade notável em explorar a matéria orgânica e colonizar solos logo após as culturas serem implantadas. Uma vez que estas áreas são as únicas com

pH neutro ou menos ácido, esta variável também pode influenciar esses grupos microbianos. No entanto, uma vez que várias propriedades do solo estão diretamente ou indiretamente relacionados ao pH (LAUBER, et al. 2008), não se pode determinar se o efeito do pH em tais comunidades pode ser direto ou indireto.

Firmicutes foi relevantemente abundante apenas na pastagem. Considerando que o filo *Firmicutes* é dominante em amostras de rúmen (LENG, et al. 2011), é mais provável que eles foram introduzidos nos locais de pastagem pelo gado. Assim, a excreção do gado pode ser um insumo orgânico atuando como um importante fator de diferenciação da estrutura da comunidade bacteriana da pastagem em comparação com outras áreas. Além disso, os membros deste filo (por exemplo, *Bacilluse Clostridium*) são bactérias formadoras de endosporos, e por consequência, apresentam elevada resistência a várias condições ambientais adversas mais comuns para solos de pastagens como níveis elevados de radiação UV, calor e ressecamento do solo. Os filios raros, com frequência relativa inferior a 2% (Fig.1b), também podem mediar funções que são essenciais para os ecossistemas microbianos (SOGIN, et al. 2006).

Estudos recentes demonstraram que a biosfera rara inclui linhagens novas e originais (ELSHAHED, et al. 2008), com potencialmente novas capacidades metabólicas. Além disso, várias funções dos membros da biosfera rara têm sido sugeridas como sendo muito relevantes para a ecologia do solo (PESTER, et al. 2010; SHADE et al. 2012). No entanto, a biosfera rara está apenas começando a ser explorada (PEDRÓS, 2012). Apesar dos recentes avanços nas tecnologias capazes de descobrir microorganismos com baixa abundância, a importância da biosfera rara ainda permanece desconhecida (REEDER; KNIGHT, 2009; HUBER, et al. 2010).

Uma vez que o solo é considerado o mais complexo e diverso ecossistema microbiano com a predominância de microrganismos com baixa abundância, ele pode representar o mais importante habitat da biosfera rara. Por esta razão, os estudos mais detalhados são necessários para abordar a importância ecológica e contribuição de microrganismos raros para as comunidades microbianas nos ecossistemas do Cerrado. No canavial, o constante aporte de nutrientes, promove o crescimento microbiano e a intervenção regular na preparação do solo para produção agrícola que prejudica a comunidade existente e facilita o estabelecimento de novas espécies de bactérias, pode explicar a maior diversidade observada nesta área. Em pastagens, o alto nível de diversidade observada pode ser explicado pelo

aporte de matéria orgânica por meio das excreções do gado associadas a um ambiente descoberto, o que aumenta a probabilidade de sucesso da migração de microrganismos pelo vento ou em animais. Além disso, em ambas as áreas, a celulose é o componente principal de carbono em gramíneas, que é facilmente de composto e disponível para a microbiota geral. Em contraste, o componente principal do carbono orgânico de detritos de madeira, nos solos florestais é a lignina, e esta macromolécula é difícil de ser degradada pelos microrganismos. Assim, variações na composição do substrato podem afetar as comunidades microbianas envolvidas na degradação da serrapilheira.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sistemas de produção baseados no manejo do solo são complexos e sujeitos a uma ampla variedade de práticas de gestão. Por esta razão, os processos biológicos dentro destes ecossistemas do solo permanecem pouco compreendidos. Existem ainda grandes lacunas na nossa compreensão geral das relações entre o manejo do solo e seus impactos sobre a diversidade, estrutura e função das comunidades microbianas. Para entender melhor a influência do manejo da terra sobre a dinâmica ecológica/evolutiva das comunidades do solo, precisamos de metodologias de alta qualidade capazes de quantificar mudanças induzidas pelo manejo nas comunidades microbianas, tanto filogenéticas quanto em níveis funcionais. Com esse conhecimento, será possível aumentar a sustentabilidade dos processos dos ecossistemas através da gestão eficaz das funções biológicas. Esta questão é de particular relevância para Cerrado, considerando o intenso uso do solo durante as últimas décadas e sua exploração contínua ao longo dos próximos anos. Neste estudo, usando a tecnologia de sequenciamento de alto rendimento de nova geração, foi possível medir as diferenças e semelhanças entre as comunidades bacterianas do solo sob diferentes tipos de manejo agrícola em nível filogenético.

Os resultados indicaram que a diversidade microbiana não apresentou alterações relevantes entre as áreas sob as práticas agrícolas em longo prazo. Estes achados sugerem que mais importante que a análise da diversidade geral é analisar a composição das comunidades. Uma vez que o tipo de solo foi o mesmo entre os locais estudados, pode-se supor que o uso da terra foi o principal fator determinante na estrutura das comunidades bacterianas. Os resultados apresentados neste estudo podem contribuir para o contínuo desenvolvimento da gestão sustentável dos ecossistemas florestais e agrícolas no Cerrado.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-MARTÍNEZ V, DOWD SE, SUN Y, ALLEN VG. **Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use.** *Soil Biol Biochem* 40:2762-2770, 2008

AIRD D, ROSS MG, CHEN WS, DANIELSSON M, FENNELL T, RUSS C, JAFFE DB, NUSBAUM C, GNIRKE, A. **Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries.** *Genome Biol* 12:R18, 2011

ARAUJO JF, DE CASTRO AP, COSTA MC, TOGAWA RC, PAPPAS-JÚNIOR GJ, QUIRINO BF, BUSTAMANTE MMC, WILLIAMSON L, HANDELSMAN J, KRÜGER, RH. **Characterization of soil bacterial assemblies in Brazilian Savanna-Like vegetation reveals acidobacteria dominance.** *Microb Ecol* 64:760–770, 2012

BAKER GC, SMITH JJ, COWAN D. **Review and re-analysis of domain-specific 16S primers.** *J Microbiol Methods* 55: 541–555, 2003

BAKKER MG, TU ZJ, BRADEEN JM, KINKEL LL. **Implications of Pyrosequencing Error Correction for Biological Data Interpretation.** *PLoS ONE* 7:e 44357. doi:10.1371/journal.pone.0044357, 2012

BARNS SM, CAIN EC, SOMMERVILLE L, KUSKE CR. **Acidobacteria phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum.** *Appl Environ Microbiol* 73:3113–3116, 2007

BARNS SM, TAKALA SL, KUSKE CR. **Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom Acidobacterium in the environment.** *Appl Environ Microbiol* 65:1731–1737, 1999

BERGMANN GT, BATES ST, EILERS KG, LAUBER CL, CAPORASO JG, WALTERS WA, KNIGHT R, FIERER N. **The under-recognized dominance of Verrucomicrobia in soil bacterial communities.** *Soil Biol Biochem* 43:1450–1455, 2011

BERRY D, BEN MAHFOUDH K, WAGNER M, LOY A. **Barcoded primers used in multiplex amplicon pyrosequencing bias amplification.** *Appl Environ Microbiol*: 77: 7846–7849, 2011

BISSET A, RICHARDSON A, BAKER G, THRALL PH. **Long-term land use effects on soil microbial community structure and function.** *Appl Soil Ecol* 51:66–78, 2011

BRESOLIN JD, BUSTAMANTE MMC, KRÜGER RH, SILVA MRSS, PEREZ KS. **Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian Cerrado.** *Braz J Microbiol* 41:391–403,

2010

BRUCE T, MARTINEZ I, MAIA NETO O, VICENTE A, KRUGER R, THOMPSON F. **Bacterial community diversity in the Brazilian Atlantic forest soils.** *Microb Ecol* 60:840–849, 2010

CAPORASO JG, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, BITTINGER K, BUSHMAN FD, COSTELLO EK, FIERER N, PEÑA AG, GOODRICH JK, GORDON JI, HUTTLEY GA, KELLEY ST, KNIGHTS D, KOENIG JE, LEY RE, LOZUPONE CA, MCDONALD D, MUEGGE BD, PIRRUNG M, REEDER J, SEVINSKY JR, TURNBAUGH PJ, WALTERS WA, WIDMANN J, YATSUNENKO T, ZANEVELD J, KNIGHT R. **QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data.** *Nat Methods* 7:335–336, 2010

CARVALHO FMV, DE MARCO P, FERREIRA LG. **The Cerrado into-pieces: habitat fragmentation as a function of landscape use in the savannas of central Brazil.** *Biol Conservation* 142:1392–1403, 2009

CLAESSON MJ, WANG Q, O'SULLIVAN O, GREENE-DINIZ R, COLE JR, ROSS RP, O'TOOLE PW. **Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions.** *Nucleic Acids Res* 38:e200, 2010

DELMONT TO, ROBE P, CECILLON S, CLARK IM, CONSTANCIAS F, SIMONET P, HIRSCH PR, VOGEL TM. **Accessing the soil metagenome for studies of microbial diversity.** *Appl Environ Microbiol* 77:1315–1324, 2011

ELSHAHEED MS, YOUSSEF NH, SPAIN AM, SHEIK C, NAJAR FZ, SUKHARNIKOV LO, ROE BA, DAVIS JP, SCHLOSS PD, BAILEY VL, KRUMHOLZ LR. **Novelty and uniqueness patterns of rare members of the soil biosphere.** *Appl Environ Microbiol* 74:5422–5428, 2008

ESSOUSSI I, BOUJMIL R, NOUIOUI I, ABBASSI-GHOZZI I, HAMZA A, BOUDABOUS A, GTARI M. **Genetic diversity and Esterase-Profilng of Actinobacteria isolated from Sahara desert stones and monuments.** *Geomicrobiol J* 29:23–28, 2011

FARRIS MH, OLSON JB. **Detection of Actinobacteria cultivated from environmental samples reveals bias in universal primers.** *Lett Appl Microbiol* 45:376–381, 2007

FEINSTEIN L, SUL W, BLACKWOOD C. **Assessment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from soil.** *Appl Environ Microbiol* 75: 5428–5433, 2009

FERREIRA J, PARDINI R, METZGER JP, FONSECA CR, POMPEU PS, SPAROVEK G, LOUZADA J. **Towards environmentally sustainable agriculture in Brazil: challenges and opportunities for applied ecological research.** *J Appl Ecol* 49:535–541, 2012

FIERER N, BRADFORD MA, JACKSON RB. **Toward an ecological classification of soil bacteria.** *Ecology* 88:1354–1364, 2007

FRANK JA, REICH CI, SHARMA S, WEISBAUM JS, WILSON BA, OLSEN GJ. **Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes.** *Appl Environ Microbiol* 74:2461–2470, 2008

FROSTEGARD A, COURTOIS S, RAMISSE V, CLERC S, BERNILLON D, LE GALL F, JEANNIN P, NESME X & SIMONET P. **Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils.** *Appl Environ Microb* 65: 5409–5420, 1999

GIONGO A, CRABB DB, DAVIS-RICHARDSON AG, CHAULIAC D, MOBBERLEY JM, GANO KA, MUKHERJEE N, CASELLA G, ROESCH LF, WALTZ B, RIVA A, KING G, TRIPLETT EW. **PANGEA: pipeline for analysis of next generation amplicons.** *ISME J* 4:852-861, 2010

GOMEZ-ALVAREZ V, TEAL TK, SCHMIDT TM. **Systematic artifacts in metagenomes from complex microbial communities.** *ISME J* 3:1314–1317, 2009

GREMION F, CHATZINOTAS A, HARMS H. **Comparative 16 S rDNA and 16 S rRNA sequence analysis indicates that Actinobacteria might be a dominant part of the metabolically active bacteria in heavy metal-contaminated bulk and rhizosphere soil.** *Environ Microbiol* 5:896–907, 2003

HAMADY M, WALKER JJ, HARRIS JK, GOLD NJ, KNIGHT R. **Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex.** *Nat Methods* 5:235–237, 2008

HILL P, KRIŠTŮFEK V, DIJKHUIZEN L, BODDY C, KROETSCH D, VAN ELSAS JD. **Land use intensity controls actinobacterial community structure.** *Microb Ecol* 61:286–302, 2011

HOLMES AJ, BOWYER J, HOLLEY MP, O'DONOGHUE M, MONTGOMERY M, GILLINGS MR. **Diverse, yet-to-be-cultured members of the Rubrobacter subdivision of the Actinobacteria are widespread in Australian arid soils.** *FEMS Microbiol Ecol* 33:111–120, 2000

HOWELER M, GHIORSE WC, WALKER LP. **A quantitative analysis of DNA extraction and purification from compost.** *J Microbiol Meth* 54: 37–45, 2003

HUBER JA, MORRISON HG, HUSE SM, NEAL PR, SOGIN ML, MARK-WELCH DB. **Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering.** *Environ Microbiol* 12:1889–1898, 2010.

INCEOGLU O, HOOGWOUT EF, HILL P, VAN ELSAS JD, **Effect of DNA extraction method on the apparent microbial diversity of soil.** *Appl Environ Microb* 76:3378–3382, 2010

JONES RT, ROBESON MS, LAUBER CL, HAMADY M, KNIGHT R, FIERER N. **A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing**

and clone library analyses. ISME J 3:442–453, 2009

KAKIRDE KS, PARSLEY LC & LILES MR. **Size does matter: application-driven approaches for soil metagenomics.** Soil Biol Biochem 42:1911–1923, 2010

KLINK CA, MACHADO RB. **Conservation of the Brazilian Cerrado.** Conservation Biol 19:707–713, 2005

KUNIN V, ENGELBREKTSON A, OCHMAN H, HUGENHOLTZ P. **Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates.** Environ Microbiol 12:118–123, 2010

LAUBER CL, STRICKLAND MS, BRADFORD MA, FIERER N. **The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land use types.** Soil Biol Biochem 40:2407–2415, 2008

LE BLANC JC, GONCALVES ER, MOHN WW. **Global response to desiccation stress in the soil actinomycete *Rhodococcus jostii* RHA1.** Appl Environ Microbiol 74:2627–2636, 2008

LEE SH, KA JO, CHO JC. **Members of the phylum Acidobacteria are dominant and metabolically active in rhizosphere soil.** FEMS Microbiol Lett 285:263–269, 2008

LEMON LN, FULTHORPE RR, TRIPLETT EW, ROESCH LF. **Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era.** J Microbiol Methods 86:42–51, 2011

LENG J, XIE L, ZHU R, YANG S, GOU X, LI S, MAO H. **Dominant bacterial communities in the rumen of Gayals (*Bos frontalis*), Yaks (*Bos grunniens*) and Yunnan Yellow Cattle (*Bos taurus*) revealed by denaturing gradient gel electrophoresis.** Mol Biol Rep 38:4863–4872, 2011

LIU Z, LOZUPONE C, HAMADY M, BUSHMAN FD, KNIGHT R. **Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis.** Nucleic Acids Res 35:e120, 2007

LOMBARD N, PRESTAT E, VAN ELSAS JD, SIMONET P. **Soil-specific limitations for access and analysis of soil microbial communities by metagenomics.** FEMS Microbiol Ecol 78:31–49, 2011

LÓPEZ-BARRAGÁN MJ, QUIÑONES M, CUI K, LEMIEUX J, ZHAO K, SU XZ. **Effect of PCR extension temperature on high-throughput sequencing.** Mol Biochem Parasitol 176:64–67, 2011

LUNA GM, DELL'ANNO A & DANOVARO R. **DNA extraction procedure: a critical issue for bacterial diversity assessment in marine sediments.** Environ Microbiol 8:308–320, 2006

MAO DP, ZHOU Q, CHEN CY, QUAN ZX. **Coverage evaluation of universal**

bacterial primers using the metagenomic datasets. BMC Microbiol 12:66 doi:10.1186/1471-2180-12-66, 2012

MARRIS E. **The forgotten ecosystem.** Nature 437:944–945, 2005

MENDES IC, FERNANDES MF, CHAER GM, JUNIOR FBR, **Biological functioning of Brazilian Cerrado soils under different vegetation types.** Plant and Soil 359:183–195, 2012

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Relatório técnico de monitoramento do desmatamento no Bioma Cerrado, 2002 a 2008: Dados revisados.** MMA, Brasília, 2009

MITTERMEIER RA, ROBLES GIL P, HOFFMAN M, PILGRIM J, BROOKS T, MITTERMEIER, CG, LAMOREUX J, FONSECA GAB. **Hotspots revisited: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions.** University of Chicago Press, Boston, 2005

MORALES SE, HOLBEN WE. **Empirical testing of 16S rRNA gene PCR primer pairs reveals variance in target specificity and efficacy not suggested by in silico analysis.** Appl Environ Microb 75:2677–2683, 2009

MYERS N, MITTERMEIER RA, MITTERMEIER CG, FONSECA GAB, KENT J. **Biodiversity hotspots for conservation priorities.** Nature 403:853–858, 2010

NACKE H, THÜRMER A, WOLLHERR A, WILL C, HODAC L, HEROLD N, SCHÖNING I, SCHRUMPF M, DANIEL R. **Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils.** PLoS ONE 6:e17000, 2011

NAETHER A, FOESEL BU, NAEGELE V, WÜST PK, WEINERT J, BONKOWSKI M, ALT, F, OELMANN Y, POLLE A, LOHAUS G, GOCKEL S, HEMP A, KALKO EKV, LINSENMAIR KE, PFEIFFER S, RENNER S, SCHÖNING I, WEISSER WW, WELLS K, FISCHER M, OVERMANN J, FRIEDRICH MW. **Environmental factors affect acidobacterial communities below the subgroup level in grassland and forest soils.** Appl Environ Microb, doi: 10.1128/AEM.01325-1, 2012

NIU B, FU L, SUN S, LI W. **Artificial and natural duplicates in pyrosequencing reads of metagenomic data.** BMC Bioinform 11:187, 2010

NOVAIS RC, THORSTENSON YR. **The evolution of Pyrosequencing® for microbiology: From genes to genomes.** J Microbiol Methods 86:1–7, 2011

OLIVEIRA P.S, MARQUIS R.J. **Cerrados of Brazil: Ecology and natural history of a neotropical savanna.** Columbia Press, New York, 2002

PEDRÓS-ALIÓ C. **The rare bacterial biosphere.** Ann Rev Mar Sci 4:449–466, 2012

PEIXOTO RS, DA COSTA COUTINHO HL, RUMJANEK NG, MACRAE A, ROSADO AS. **A decade of land use contributes to changes in the chemistry,**

biochemistry and bacterial community structures of soils in the Cerrado. Anton Leeuw Int 98:403–413, 2010

PESTER M, BITTNER N, DEEVONG P, WAGNER M. **A “rare biosphere” microorganism contributes to sulfate reduction in a peatland.** ISME J 4:1–12, 2010

PETRIC I, PHILIPPOT L, ABBATE C, BISPO A, CHESNOT T, HALLIN S, LAVAL K, LEBEAU T, LEMANCEAU P, LEYVAL C, LINDSTRÖM K, PANDARD P, ROMERO E, SARR A, SCHLOTTER M, SIMONET P, SMALLA K, WILKE BM, MARTIN-LAURENT F. **Inter-laboratory evaluation of the ISO standard 11063. Soil quality - Method to directly extract DNA from soil samples.** J Microbiol Methods 84:454–460, 2011

PINTO AJ, RASKIN L. **PCR biases distort bacterial and archaeal community structure in pyrosequencing datasets.** PLoS ONE 7:e43093, 2012

QUAISER A, OCHSENREITER T, LANZ C, SCHUSTER SC, TREUSCH AH, ECK J, SCHLEPER C. **Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics.** Mol Microbiol 50:563–575, 2003

QUINCE C, LANZÉN A, CURTIS TP, DAVENPORT RJ, HALL N, HEAD IM, READ LF, SLOAN WT. **Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data.** Nat Methods 6:639–641, 2009

QUINCE C, LANZEN A, DAVENPORT R, TURNBAUGH P. **Removing noise from pyrosequenced amplicons.** BMC Bioinform 12:38, 2011

QUIRINO BF, PAPPAS GJ, TAGLIAFERRO AC, COLLEVATTI RG, NETO EL, DA SILVA MR, BUSTAMANTE MM, KRÜGER RH. **Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation.** Microbiol Res 164:59–70, 2009

REEDER J, KNIGHT R. **The ‘rare biosphere’: a reality check.** Nat Methods 6:636–637, 2009

SAIT M, DAVIS KE, JANSSEN PH. **Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum Acidobacteria occurring in soil.** Appl Environ Microbiol 72:1852–1857, 2006

SANO EE, ROSA R, BRITO JLS, FERREIRA L. **Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil.** Environ Monit Assess 166:11–124, 2010

SCHLOSS PD, GEVERS D, WESTCOTT SL, **Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies.** PLoS ONE 6:e27310, 2011

SCHLOSS PD, WESTCOTT SL, RYABIN T, HALL JR, HARTMANN M, HOLLISTER EB, LESNIEWSKI RA, OAKLEY BB, PARKS DH, ROBINSON CJ, SAHL JW, STRES

B, THALLINGER GG, VAN HORN DJ, WEBER CF. **Introducing mothur: Opensource, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities.** Appl Environ Microbiol 75:7537–7541, 2009

SCHMIDT A, HAFERBURG G, SENERIZ M, MERTEN D, BÜCHEL G, KOTHE E. **Heavy metal resistance mechanisms in actinobacteria for survival in AMD contaminated soils.** Chemie der Erde – Geochem 65:131–144, 2005

SCHRIEWER A, WEHLMANN A, WUERTZ S, **Improving qPCR efficiency in environmental samples by selective removal of humic acids with DAX-8.** J Microbiol Methods 85:16–21, 2011

SHADE A, HOGAN CS, KLIMOWICZ AK, LINSKE M, MCMANUS PS, HANDELSMAN J. **Culturing captures members of the soil rare biosphere.** Environ Microbiol 1:2247–2252, 2012

SIPOS R, SZEKELY AJ, PALATINSZKY M, REVESZ S, MARIALIGETI K, NIKOLAUSZ M. **Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis.** FEMS Microbiol Ecol 60:341–350, 2007

SOGIN ML, MORRISON HG, HUBER JA, WELCH DM, HUSE SM, NEAL PR, ARRIETA JM, HERNDL GJ. **Microbial diversity in the deep sea and the underexplored ‘rare biosphere’.** Proc Natl Acad Sci USA 103:12115–12120, 2006

SPAIN AM, KRUMHOLZ LR, ELSHAHED MS. **Abundance, composition, diversity and novelty of soil Proteobacteria.** ISME J 3:992-1000, 2009

TEAL TK, SCHMIDT TM. **Identifying and removing artificial replicates from 454 pyrosequencing data.** Cold Spring Harb Protoc 4:pdb.prot5409. doi: 10.1101/pdb.prot5409, 2010

VENTURA M, CANCHAYA C, TAUCH A, CHANDRA G, FITZGERALD GF, CHATER KF, DV S. **Genomics of actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum.** Microbiol Mol Biol Rev 71:495–548, 2007

VIANA LT, BUSTAMANTE MMC, MOLINA M, PINTO AS, KISSELLE K, ZEPP R, BURKE RA. **Microbial communities in Cerrado soils under native vegetation subjected to prescribed fire and under pasture.** Pesq Agropec Bras 46:1665–1672, 2011

WANG Q, GARRITY GM, TIEDJE JM, COLE JR. **Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy.** Appl Environ Microbiol 73(16):5261–5267, 2007

WANG Y, QIAN PY. **Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies.** PLoS ONE 4:e7401, 2009

WARD NL, CHALLACOMBE JF, JANSSEN PH, HENRISSAT B, COUTINHO PM, WU M, XIE G, HAFT DH, SAIT M, BADGER J, BARABOTE RD, BRADLEY B, BRETTIN TS, BRINKAC LM, BRUCE D, CREASY T, DAUGHERTY SC, DAVIDSEN TM, DEBOY RT, DETTER JC, DODSON RJ, DURKIN AS, GANAPATHY A, GWINNIGLIO M, HAN CS, KHOURI H, KISS H, KOTHARI SP, MADUPU R, NELSON KE, NELSON WC, PAULSEN I, PENN K, REN Q, ROSOVITZ MJ, SELENGUT JD, SHRIVASTAVA S, SULLIVAN SA, TAPIA R, THOMPSON LS, WATKINS KL, YANG Q, YU C, ZAFAR N, ZHOU L, KUSKE CR. **Three genomes from the phylum acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils.** Appl Environ Microbiol 75:2046–2056, 2009

WILSON IG. **Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification.** Appl Environ Microb 63:3741–3751, 1997

WINSLEY T, VAN DORST JM, BROWN MV, FERRARI BC. **Capturing greater 16S rRNA gene sequence diversity within the domain Bacteria.** Appl Environ Microbiol 78:5938–5941, 2012

WOOLEY JC, YE Y. **Metagenomics: facts and artifacts, and computational challenges.** J Comp Sci Technol 25:71–81, 2009

WU JY, JIANG XT, JIANG YX, LU SY, ZOU F, ZHOU HW. **Effects of polymerase, template dilution and cycle number on PCR based 16S rRNA diversity analysis using the deep sequencing method.** BMC Microbiol 10:255, 2010