

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**  
**Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical**

**COMUNIDADE BACTERIANA DO SOLO E SEU POTENCIAL  
BIOTECNOLÓGICO SOB SISTEMAS INTEGRADOS NO  
ECÓTONO CERRADO AMAZÔNIA**

**KELLEN BANHOS DO CARMO**

CUIABÁ – MT

2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**  
**Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical**

**COMUNIDADE BACTERIANA DO SOLO E SEU POTENCIAL  
BIOTECNOLÓGICO SOB SISTEMAS INTEGRADOS NO  
ECÓTONO CERRADO AMAZÔNIA**

**KELLEN BANHOS DO CARMO**

Bióloga

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Oscarlina Lúcia dos Santos Weber

Coorientador: Prof. Dr. Anderson Ferreira

Tese apresentada à Faculdade de Agricultura e  
Medicina Veterinária da Universidade Federal de  
Mato Grosso, para obtenção do título de Doutor em  
Agricultura Tropical.

CUIABÁ - MT

2015

### Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

B216c Banhos do Carmo, Kellen.  
Comunidade bacteriana do solo e seu potencial biotecnológico sob sistemas integrados no ecótono Cerrado Amazônia / Kellen Banhos do Carmo. – 2015  
118 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Oscarlina Lúcia dos Santos Weber.  
Co-orientador: Anderson Ferreira.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, Cuiabá, 2015.  
Inclui bibliografia.

1. Integração Lavoura Pecuária Floresta. 2. sequenciamento 16S RNAr.  
3. Illumina. 4. DGGE. 5. bioprospecção bacteriana. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Comunidade bacteriana do solo e seu potencial biotecnológico sob sistemas integrados no ecótono Cerrado Amazônia

Autora: Kellen Banhos do Carmo

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Oscarlina Lúcia dos Santos Weber

Aprovada em 27 de fevereiro de 2015.



Prof<sup>a</sup>. Dra. Oscarlina Weber  
(UFMT-Cuiabá)  
(Orientadora)

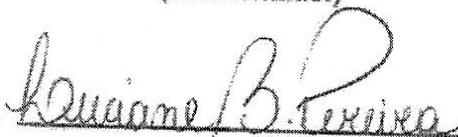


Anderson Ferreira  
Pesquisador Sênior - Cuiabá 78060-900 - MT  
Folha 123456 - Data: 15/02/2015

Prof. Dr. Anderson Ferreira  
(Embrapa Agrossilvipastoril)  
(Coorientador)



Prof. Dr. Marcel Bering  
(Embrapa Agrossilvipastoril)  
(Examinador interno)



Prof<sup>a</sup>. Dra. Luciane B. Pereira  
(UFMT)  
(Examinador externo)



Prof<sup>a</sup>. Dra. Márcia Scabora  
(FATEC/SENAI)  
(Examinador externo)

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, quem são a base de valores e luta por sempre me o incentivarem a buscar o melhor. E, a minha vizinha, Elydia, pelas orações, uma mulher de DEUS.

Às minhas irmãs pelo amor incondicional em que mesmo distante sempre soube que estariam dispostas a me ajudar no que fosse preciso. Em especial dedico essa conquista à minha irmã, Karoline e ao seu esposo Rodrigo Ontiveros, pela moradia, mas principalmente por me acolherem, apoiarem e terem sido atenciosos às minhas necessidades.

Aos meus sobrinhos, Neto, Rodrigo, Pedro, meu afilhado Arthur e Manuela que encheram minha vida de alegria e esperança.

Ao meu marido, Paulo Rogério Lima, que pelo fruto do seu amor inmensurável e apoio nos piores momentos onde desistir era meu único pensamento me ajudou a confiar e entregar tudo à Deus acreditando na vitória.

Ao meu coordenador, Dr. Anderson Ferreira, pelo crescimento profissional em que me conduziu e a relação de “estamos juntos nessa” me ajudando a acreditar que iria valer a pena.

Em especial, ao meu irmão que não tive, Bruno Rafael da Silva, que DEUS me presenteou, o qual jamais teria conseguido se não tivesse sido a sua alegria, ajuda, prontidão, companherismo e amor.

À todos os colegas que conheci e amigos que ganhei: Dryelle, Dayana, Luciana, Raquel e em especial à Kaynara e Tatiana que na etapa final me acolheram e um laço inimaginável de fidelidade se firmou para sempre.

Agradeço também àquelas pessoas que de certo modo tentaram dificultar o meu caminho, mas DEUS É FIEL e sempre abre uma nova porta, proporcionando aquilo que era melhor para mim.

Ao coordenador Ricardo S. Amorim pela prontidão em sempre me ajudar de modo profissional, competência e dedicação.

A Dra. Oscarlina Lúcia dos Santos Weber, minha orientadora de última hora, pela disponibilidade, coragem e confiança.

E por fim, agradeço à DEUS por ter me concedido saúde física e mental para ter superado os momentos mais difíceis, porém que só me fizeram crescer como pessoa.

**COMUNIDADE BACTERIANA DO SOLO E SEU POTENCIAL  
BIOTECNOLÓGICO SOB SISTEMAS INTEGRADOS NO ECÓTONO  
CERRADO AMAZÔNIA**

**RESUMO** – Sistemas integrados de produção têm sido apontados como alternativa sustentável para uso da terra. O objetivo deste trabalho foi avaliar sistemas integrados de produção agrícola por meio da ocorrência de comunidades bacterianas do solo em área de transição do Cerrado e Floresta Amazônica, além de biosprospectar o potencial de bactérias em solubilizar fosfato e antagonizar fitopatógenos. A área experimental pertence a Embrapa Agrossilvipastoril (Sinop/MT) e foram avaliados três sistemas de monocultivo (Floresta plantada de eucalipto (F), Lavoura (L) e Pastagem (P)) e sete sistemas integrados (IL-P, IP-L, ILF, IPF, ILF-IPF, IPF-ILF, ILPF) dispostos em quatro blocos casualizados, além das áreas de referências, Mata nativa e Pousio. Amostras de solo foram coletadas na profundidade de 0-10 cm nos períodos de chuva e seca no ano de 2012. Foi determinado, o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) e potencial antagonístico e de solubilização de fósforo. A estrutura e composição da comunidade bacteriana foram avaliadas por gradiente desnaturante em gel de eletroforese (DGGE) e por sequenciamento. O maior valor de UFC foi no sistema integrado no período de chuva. Por meio de contrastes ortogonais, o ILPF foi o responsável pela diferença dos demais sistemas integrados a probabilidade de 3%. Na chuva, ambas as áreas de referência tiveram menor valor de UFC, e o Pousio diferiu dentre os cinco tratamentos. A análise de DGGE agrupou nas duas estações os sistemas exclusivos entre si e o ILPF com as áreas de referências. Na chuva, 12,08% isolados bacterianos controlaram os fitopatógenos (*Rhizoctinia* sp., *Fusarium* sp., *Sclerotium rolfsii*) e 20,83% na época da seca. Dos mesmos isolados avaliados no antagonismo, 56,25% solubilizaram fosfato no período de chuva e 47,08% de seca. As bactérias com potencial biotecnológico foram classificadas nos filos Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria e Nitrospira sendo representados por nove gêneros e 14 espécies. O resultado do sequenciamento para sete tratamentos (Floresta, Lavoura, Pastagem, ILF, IPF, ILPF e Mata) mostrou as maiores abundâncias para os mesmos três primeiros filos obtidos no potencial biotecnológico nas duas estações. O Firmicutes se correlacionou no período de chuva com a Lavoura e na seca com o ILPF e Mata. Para cinco classes correspondentes aos três filos, a Lavoura se destacou por apresentar maiores oscilações na sua abundância relativa comparado aos demais tratamentos. Na análise de agrupamento por gênero na chuva, somente a Mata e o ILPF não tiveram similaridade com os demais tratamentos, porém na seca os dois se agruparam com a Floresta e IPF. Portanto, a comunidade bacteriana do solo em sistemas integrados se mostrou sensível aos sistemas de manejo com apenas dois anos de implantação do experimento. O ILPF mostrou a maior similaridade da estrutura bacteriana com o da Mata nativa. A Lavoura demonstrou as maiores oscilações na abundância relativa nos dois períodos, por ser o tratamento mais suscetível às mudanças na composição microbiana do solo. A área de transição entre Cerrado e

Amazonia é promissora na bioprospecção de bactérias com potencial biotecnológico a fitopatógenos e na solubilização de fósforo.

**Palavras-chave:** Integração Lavoura Pecuária Floresta, sequenciamento 16S RNAr, Illumina, DGGE, bioprospecção bacteriana.

# BACTERIAL COMUNITY OF THE SOIL AND YOURS BIOTECHNOLOGICAL POTENCIAL UNDER INTEGRATED SYSTEMS IN THE ECOTONE CERRADO AMAZONIA

**ABSTRACT** – Integrated production systems have been suggested as alternative to sustainable land use. The objective of this study was to evaluate integrated agricultural production systems through the occurrence of bacterial soil communities in a transition area of Cerrado and Amazon rainforest, beyond to bioprospect bacteria with potential to solubilize phosphorus and be antagonistic to plant pathogens. The experimental belongs to Embrapa Agrosilvopastoral (Sinop /MT) and were evaluated three monoculture systems (planted forest of eucalyptus, Crop and Pasture) and seven integrated systems (IL-P, IP-L, ILF, IPF, ILF-IPF , IPF-ILF, ILPF) arranged in four blocks plus Native forest and Fallow as areas of references. Soil samples were collected at depth 0-10 cm in the rainy and dry season in 2012. It had been determined the number of colony forming units (CFUs) and potencial antagonistic and to solubilize phosphorus in culture medium with  $\text{CaHPO}_4$ . The structure and composition of the soil bacterial community were assessed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and sequencing. The highest CFU was in the integrated system during the rainy season. By orthogonal contrasts, the ILPF was responsible to make difference compared at the other integrated systems with a probability of 3%. In the rain, both references areas had lower CFU and the Fallow differed among five treatments. The DGGE analysis grouped in both seasons the exclusive systems with each other and separately the ILPF with the references areas. In the rain, 12.08% bacterial isolates controlled the pathogens (*Rhizoctina* sp., *Fusarium* sp., *Sclerotium rolfsii*) and 20.83% in the dry season. The same isolates evaluated in antagonism, 56.25% solubilized phosphate in the rainy season and 47.08% dry. The bacteria with biotechnological potential were classified as phyla Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria and Nitrospira being represented by nine genera and 14 species. The result in the sequencing performed into seven treatments (Forest, Crop, Grassland, ILF, IPF, ILPF and Native) showed the greatest abundance to the same first three phyla obtained in the biotechnological potential in both seasons. The Firmicutes correlated with the Crop in the rainy period and with ILPF and Native in the dry. For five classes corresponding to the three phyla, the Crop stood out with the greatest fluctuations in their relative abundance compared to other treatments. In cluster analysis by gender in the rain, only the Forest and the ILPF had no similarity with the other treatments but in the dry the two were grouped with the Forest and IPF. Therefore, the bacterial community in the soil integrated systems was sensitive to management systems with only two years of experimental deployment. The ILPF showed the greatest similarity of bacterial structure with the Native forest. The Crop showed the highest fluctuations in the relative abundance of the two seasons, being more susceptible to treatment changes in microbial composition of the soil. The transition area between the Cerrado and Amazon is promising in bioprospecting bacteria with the biotechnological potential pathogens and phosphorus solubilization.

**Key words:** integrated crop-livestock-forest, 16S rRNA sequencing, Illumina, DGGE, bioprospecting bacterial.

## SUMÁRIO

Página	
	<b>1. INTRODUÇÃO</b> ..... 11
	<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> ..... 13
	2.1 Fungos fitopatogênicos..... 13
	2.2 Uso do fósforo em áreas agrícolas..... 14
	2.3 Sistemas integrados de produção agrícola ..... 16
	2.4 Manejo e conservação do solo ..... 20
	2.5 Comunidade microbiana do solo..... 24
	2.6 Potencial biotecnológico de microrganismos ..... 25
	2.6.1 Controle biológico e solubilizadores de fosfato ..... 26
	2.7 Ferramentas moleculares ..... 28
	2.7.1 Estrutura da comunidade bacteriana do solo ..... 29
	2.7.2 Composição da comunidade microbiana do solo ..... 33
	<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> ..... 37
	3.1 Região de estudo ..... 37
	3.2 Histórico da área experimental ..... 37
	3.3 Sistemas agrícolas ..... 38
	3.4 Áreas de referências ..... 40
	3.5 Amostragem de solo ..... 41
	3.6 Análises Microbiológicas ..... 42
	3.6.1 Isolamento e quantificação de bactérias totais..... 42
	3.6.2 Seleção de isolados bacterianos para teste de bioprospecção..... 42
	3.6.3 Teste de bactérias no controle biológico de fitopatógenos..... 43
	3.6.4 Avaliação de bactérias com potencial solubilizador de fosfato..... 43
	3.6.5 Sequenciamento parcial dos isolados com potencial biotecnológico ..... 44
	3.7 Análises moleculares..... 45
	3.7.1 Perfil da comunidade bacteriana total do solo (DGGE)..... 45
	3.7.2 Composição da comunidade bacteriana do solo..... 46
	3.7.2.1 Preparo das amostras para o sequenciamento do gene 16S rRNA ..... 46
	3.7.2.2 Classificação taxonômica das sequências obtidas..... 48
	3.8 Análises estatísticas ..... 49
	<b>4. RESULTADOS</b> ..... 51
	4.1 Unidades formadoras de colônias de bactérias (UFCs) ..... 51
	4.2 Estrutura da comunidade bacteriana do solo sob sistemas agrícolas 54
	4.3 Isolados bacterianos com potencial biotecnológico ..... 57
	4.4 Isolados bacterianos com capacidade solubilizadora de fosfato ..... 65
	4.5 Identificação taxonomica dos isolados positivos ..... 70
	4.6 Composição e flutuação da comunidade bacteriana ..... 78
	<b>5. DISCUSSÃO</b> ..... 86
	5.1 Bactérias cultiváveis e não-cultiváveis em sistemas agrícolas ..... 86
	5.2 Bactérias com potencial biotecnológico..... 88
	5.3 Composição e flutuação da comunidade bacteriana ..... 93
	<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> ..... 97
	<b>7. CONCLUSÕES</b> ..... 99
	<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> ..... 100

## 1. INTRODUÇÃO

O uso intensivo do solo, advindo de atividades agrícolas quando associado às práticas de manejo inadequadas podem resultar na baixa produtividade devido a perda da qualidade do solo. Esse cenário pode se agravar ao se tratar de solos em regiões tropicais, pois naturalmente são intemperizados, característicos por apresentarem baixa fertilidade, como é o caso dos solos do estado de Mato Grosso. Diante disso, o componente arbóreo associado aos sistemas lavoura e pastagem em uma mesma área, definidos por sistemas integrados Lavoura Pecuária Floresta (ILPF), têm sido propostos como alternativa aos sistemas convencionais de produção agrícola, na busca de torná-las sustentáveis. Esses sistemas visam uma agricultura capaz de mitigar as emissões de gases de efeito estufa com o intuito de conservar e restaurar as propriedades física, química e biológica do solo, além de serem mais rentáveis e menos suscetível a perdas econômicas diante dos fatores abióticos, em consequência da diversificação das culturas.

Atualmente, na tentativa de consolidar que os sistemas integrados de produção podem ser atividades consideradas mitigadoras é fundamental, a fim de aprimorar o uso do solo e alcançar alta produtividade na agricultura. Contribuindo diretamente na desaceleração do desmatamento de novas áreas, principalmente sobre a região dos biomas Cerrado e Amazônia, definidas por serem áreas-chaves, “*hotspots*”, e por conterem uma biodiversidade endêmica e elevado grau de degradação ambiental.

Portanto, monitorar sistemas integrados de produção, por meio do estudo dos aspectos microbiológicos do solo, é primordial para assegurar a

sustentabilidade dessa nova atividade. Visto que os microrganismos são parte integrante da funcionalidade dos ecossistemas.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto de sistemas integrados de produção agrícola por meio do estudo das comunidades bacterianas do solo em área de transição do Cerrado e Floresta Amazônica, além de verificar o potencial em bioprospectar bactérias com capacidade de solubilizar fosfato e no antagonismo à fitopatógenos nessa região.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Fungos fitopatogênicos**

Comumente, a prática adotada para o controle de pragas e doenças em lavouras é o uso de pesticidas, incluindo os fungicidas, devido à facilidade em aplicá-los sem a necessidade de compreender os processos que envolvem o agroecossistema e, principalmente, pela rápida resposta ao controle dos fitopatógenos (BETTIOL & MORANDI, 2009). Contudo, por se tratar de substâncias xenobióticas com degradação lenta, que resultam em efeitos indiretos sobre os componentes do ecossistema, esses compostos químicos sintéticos merecem atenção com relação ao impacto nos ecossistemas e na saúde pública (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

Na literatura, muitos trabalhos apontam o quão prejudicial e perigoso os ingredientes ativos de produtos químicos aplicados em grande escala, nas áreas sob monocultivos químico-dependentes, podem alcançar uma proporção cada vez maior de áreas contaminadas conduzindo a insegurança alimentar e saúde humana (FILHO & MELO, 2012; BOCCOLINI et al., 2014; LEMES et al., 2014).

Diante desse cenário e em resposta à nova consciência, mundial pela busca de práticas mitigadoras e sustentáveis na agricultura, há a urgência em desenvolver pesquisas voltadas a reduzir o uso de produtos químicos ou a utilizar exclusivamente produtos biológicos no controle de doenças fitopatogênicas associadas a práticas com manejo integrado (SOWNDHARARAJAN; MARIMUTHU & MANIAN, 2012).

Os fungos são habitantes do solo, cosmopolitos das regiões tropical e subtropical. Alguns formam estrutura de resistência, conferindo a capacidade

de sobreviver no ambiente por vários anos. Possuem, também, uma extensa gama de hospedeiros, abrangendo em torno de 500 espécies em mais de 100 famílias botânicas. Além disso, tanto as estruturas de resistência quanto o micélio são fontes de propagação, pois o fungo pode sobreviver saprofiticamente em restos culturais na forma de micélio. Dificultando, desta forma, ainda mais o processo de eliminação no ambiente agrícola (AULER; CARVALHO, & MELLO, 2013; LEONI et al., 2014).

Dentre os inúmeros fungos causadores de doenças em espécies vegetais descritos na literatura, os gêneros *Sclerotium*, *Fusarium* e *Rhizoctonia* são conhecidos por acometerem diferentes culturas, podendo ocasionar perdas significativas na produtividade agrícola.

A classificação taxonômica, conforme o MycoBank (2014), o *Sclerotium rolfsii* é apresentado como pertencente ao filo *Basidiomycota*, classe *Agaricomycetes*, ordem *Agaricales*, família *Typhulaceae* e ao gênero *Sclerotium*. No entanto, o mesmo fungo difere-se em níveis taxonômicos com a base de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2014), sendo representado pela ordem *Atheliales*, família *Atheliaceae*, gênero *Athelia* e condizente com a espécie *Athelia rolfsii*. Essas diferenças são baseadas nas fases de reprodução do fungo, sexuada e assexuada.

Segundo o NCBI (2014), o gênero *Fusarium* pertence ao filo *Ascomycota*, classe *Sordariomycetes*, ordem *Hypocreales*, família *Nectriaceae* pode ser identificado em meio de cultivo artificial por formarem estruturas de resistência: os clamidósporos. Para o gênero *Rhizoctonia*, a classificação taxonômica é filo *Basidiomycota*, classe *Agaricomycetes*, ordem *Cantharellales*, família *Ceratobasidiaceae* e apresenta, em meio artificial, estruturas denominadas como escleródios (SANFUENTES et al., 2007).

Esses três gêneros apresentam espécies que são causadores de tombamento em plantas, podridão de raízes, a queima foliar de brotações em jardim clonal, doenças foliares em pastagens naturais e gramados (ALFENAS et al., 2004; AOKI; O'DONNELL & SCANDIANI, 2005).

## **2.2 Uso do fósforo em áreas agrícolas**

O desenvolvimento vegetal é limitado pela disponibilidade de nutrientes no solo. E dentre os macronutrientes essenciais (nitrogênio/fósforo/potássio), o

fósforo (P) é considerado o macronutriente mais limitante na produção agrícola, além de responsável pela formação de ATP (Adenosina Trifosfato) e crescimento celular (SMIL, 2000; CORDELL; DRANGERT & WHITE, 2009) e, principalmente, por ser um recurso natural finito (DAWSON & HILTON, 2011). A fonte de P aplicada ao solo para produção vegetal provém da rocha fosfatada, que dependendo de sua origem tem solubilidade diferente, o que requer tratamentos químicos para otimizar o aproveitamento desse elemento no solo.

Ao mesmo tempo, é sabido que dos fertilizantes fosfatado quando aplicados na agricultura somente 10 % a 20 % são aproveitados pelas plantas, o restante é adsorvido nas partículas do solo e deste modo, a disponibilidade de formas orgânicas e inorgânicas do P no solo para as plantas estão relacionadas com a capacidade “tampão” do solo em repor reversivelmente esses íons (FAO, 2008).

Regiões subtropicais e tropicais naturalmente são cobertas por solos altamente intemperizados, e resulta no processo de adsorção do P na superfície dos colóides do solo, principalmente se o solo for de mineralogia contendo óxido de Al e Fe compostos esses responsáveis pela forte retenção do P por ocorrer em meio ácido ou se o meio for o P se precipita (OTINGA et al., 2013).

Diante da realidade do uso global do fósforo, fica explícita a necessidade de desenvolver práticas agrícolas sustentáveis, que supram a demanda por alimentos no futuro, desacelerando o processo da extinção das reservas fosfáticas e a contaminação ambiental proveniente do P-residual (KEBREAB, et al., 2012; CORDELL, NESET, & PRIOR, 2012; PARENT; PARENT & ZIADI, 2014).

O termo “uso eficiente do fósforo” refere-se às estratégias de reciclagem que tentam conter a aplicação do P no solo. O intuito é evidenciar a importância de considerar o balanço do P acumulado no solo não absorvido pelas plantas antes da realização de nova aplicação. Muitos autores têm demonstrado que é possível reaproveitar o P residual que foi acumulado no sistema ao longo do tempo. Mesmo sabendo que a disponibilidade do P é variável conforme o tipo de solo, pH, espécies agrícolas cultivadas e o tempo de aplicação do P (MACDONALD et al., 2011; VAN DER VELDE et al., 2014).

Sattari et al. (2012), enquanto simulavam o histórico do P residual no mundo, estimaram que a reutilização do P acumulado pode contribuir até 60 % com a demanda mundial por alimentos em 2050.

### **2.3 Sistemas integrados de produção agrícola**

O conceito de associar mais de uma atividade agrícola em uma mesma área foi muito utilizado normalmente em áreas menores, com o intuito apenas de sobrevivência. No entanto, ultimamente essa realidade tem sido reavivada e aprimorada, extravasando para áreas maiores com fins lucrativos e, paralelamente, alcançando as expectativas da nova consciência da sociedade mundial sob a questão da conservação ambiental e atividades sustentáveis (FAO, 2009).

Portanto, o interesse em ampliar e consolidar atividades que combinam duas ou mais atividades agrícolas, conhecidos por sistemas integrados, é um assunto atual que vai ao encontro da urgente demanda com o futuro da sociedade, a qual visa aumentar a produção agrícola sem que haja degradação do meio ambiente, norteado por ações e políticas éticas (TILMAN et al., 2002). A idéia de sustentabilidade no âmbito da agricultura tem se alastrado mundialmente visando alcançar maiores rendimentos agropecuários por meio de sistemas menos dependente de insumos externos, especialmente, fertilizantes e herbicidas e, conseqüentemente, conservando os ciclos biogeoquímicos, água, microclima, biodiversidade e melhorando a qualidade dos solos (QUINKENSTEIN et al., 2009).

Esse “novo” método produtivo é uma alternativa a atividade baseada no sistema intensivo convencional, há muito aplicado na agricultura brasileira com o desafio em adotar metodologias capazes de integrar diferentes componentes na mesma área visando o aumento da produção dos sistemas agropecuários (ALVARENGA et al., 2010; ARVOR et al., 2012). Segundo Balbino et al. (2011) o conceito de integrar o componente arbóreo aos subsistemas lavoura e pastagem visa ser uma atividade de produção sustentável realizadas na mesma área, em cultivo de rotação, sucessão ou consorciado, a fim de alcançar a sustentabilidade através do efeito sinérgico entre os componentes do agroecossistema.

O aspecto ecológico proposto nos sistemas integrados Lavoura Pecuária-Floresta (ILPF) é a tentativa de mitigar os efeitos ocasionados ao ecossistema, ao longo dos anos pela ação antrópica, em consequência de práticas agrícolas extrativistas. Entretanto, a proposta desses sistemas integrados não está baseada somente no conceito ecológico, mas atrelada ao incentivo econômico aos produtores rurais (VAYSSIÈRES et al., 2011). É esperado que a rentabilidade do sistema seja maior por consequência da recuperação da qualidade do solo e a diversificação do sistema de cultivo. Assim diminuindo a vulnerabilidade econômica do produtor diante a variabilidade de produtos (HALLORAN & ARCHER, 2008). Esta realidade também facilita ao produtor vender os produtos a mercados próximos por preços competitivos. Os custos e benefícios devem ser fundamentados conforme a necessidade da região local, restrições e valorização das culturas a serem cultivadas (TILMAN et al., 2002; FAO, 2009).

Nestes sistemas integrados, o componente forrageiro, árvores e culturas agrícolas são caracterizados por reativar o processo funcional do solo por meio das propriedades físicas, químicas e biológicas (VANLAUWE et al., 2010). Os sistemas florestais promovem maior aporte de material orgânico, formado pela serrapilheira usado como foragem, assim como na proteção das culturas cultivadas entre as árvores, diminuição da evapotranspiração permitindo melhor controle de água. Nos sistemas agroflorestais, a inclusão de leguminosas na rotação de culturas, como a soja, pode influenciar na produtividade do sistema (VERGÉ et al., 2007).

O sistema ILPF tem sido adotado em todo o Brasil, com maior representatividade nas regiões Centro-Oeste e Sul. Hoje, aproximadamente 2 milhões de hectares utilizam as diferentes modalidades da estratégia ILPF e a estimativa é de que, para os próximos 20 anos, possa ser adotada em mais de 20 milhões de hectares (BALBINO, BARCELLOS & STONE, 2011).

O cultivo mínimo ou conservador, comumente associado ao plantio direto e a rotação de culturas, tende a direcionar o sistema produtivo para a sustentabilidade, conforme relatado por Melero et al. (2009), que comparando o sistema de cultivo conservacionista a curto e a longo período, por meio da integração de diferentes culturas (cereal/girassol/legumes), com o cultivo tradicional obtiveram como resultado um aumento do carbono ativo e biomassa

microbiana de carbono para o sistema conservador a longo período. Assim como para as atividades enzimáticas do solo relacionadas à mineralização do carbono orgânico, na camada superficial do solo (0-5 cm).

Plassart et al. (2008) observaram que diferentes sistemas de manejo, sistema intensivo de lavoura, pastagem permanente, pastagem com rotação de culturas e pastagem recém estabelecidas influenciaram a estrutura e atividade da comunidade microbiana do solo. A área sob pastagem permanente aumentou a população de bactérias e fungos. A biomassa microbiana total do solo e a mineralização do carbono aumentaram gradualmente do sistema convencional para as áreas sob pastagem. Assim, os autores concluíram que o manejo do solo está associado a mudanças na comunidade microbiana e que o sistema de cultivo convencional induz a perdas funcionais relacionadas à estabilidade do solo.

A conversão de sistemas convencionais para sistemas de integração tem mostrado resultados positivos nas propriedades físico-químicas e microbiológicas do solo e no ciclo dos nutrientes devido ao aumento da matéria orgânica do solo, contribuindo para maior produtividade do sistema (RUSSELL, LAIRD & MALLARINO, 2006). Espécies florestais e arbustos estão associados com a qualidade do solo por meio da diversificação de matéria orgânica depositada no solo, promovendo o fornecimento de nutrientes em camadas mais profundas do solo por meio das raízes. Além disso, formando, embaixo do dossel, um ambiente diferenciado com benefícios de temperaturas amenas aos animais devido ao sombreamento (DIEDHIOU et al., 2009; KAUR; GUPTA & SINGH, 2002; REIS et al, 2010).

A estrutura da comunidade microbiana do solo, distribuição e abundância tanto é alterada pela condição do fator abiótico (físico e químico) quanto pelo fator biótico (interação entre espécies/fonte de nutrientes). Geralmente, os microrganismos estão distribuídos na camada mais superficial do solo, entre 0-10 cm de profundidade, em função da interação com a população vegetal. Conforme a espécie vegetal, sistema radicular, estágio de desenvolvimento, localidade e da composição dos exsudatos ocorre uma influência sobre a comunidade microbiana do solo, ora aumentando ora diminuindo a biomassa microbiana, estrutura genética e potencialidade metabólica (CALBRIX et al., 2007).

Singh et al. (2009) observaram que, dentre os fatores abióticos avaliados em áreas naturais com diferentes espécies de plantas, a umidade do solo é o fator atuante na estrutura e funcionabilidade da comunidade bacteriana. Apresentando baixo impacto na relação interespecífica, entre espécie vegetal e microrganismos, indicando que a comunidade microbiana do solo não é influenciada apenas por um fator abiótico ou biótico, mas sim pela interação dos dois. Da mesma forma, Thomset al. (2010) e Paduel, Udawatta & Anderson (2011) também encontraram resultados em concordância sob a interação da espécie vegetal com a comunidade microbiana do solo. No entanto, as maiores interações foram as relacionadas aos fatores abióticos, pH e nutrientes do solo, concluindo que a diversidade vegetal de plantas interage de forma indireta com os microrganismos do solo.

A diversidade metabólica e atividade microbiana do solo sob sistema de integração lavoura pecuária em plantio direto sofreram alterações diante da intensidade de pastejo contínuo, onde a maior diversidade funcional da microbiota e a atividade microbiana foram observadas em tratamento com ajuste de carga animal com menor intensidade de pastejo (CHÁVEZ et al., 2011). Outros autores, tais como Clegg, Attard e Degrange (2006), Papatheodorou, Efthimiadou e Stamou (2008) e Wakelin et al. (2009) corroboram com o comprometimento da diversidade bacteriana quando submetido a intenso pastejo contínuo, pois além de ocasionar a redução da quantidade de matéria orgânica retornável ao solo, há a redução dos macroporos e conseqüentemente na baixa disponibilidade de oxigênio no solo.

Lenka et al. (2012), com o objetivo de identificar o melhor sistema de cultivo capaz de recuperar áreas degradadas na Índia, avaliaram a retenção de água e carbono no solo e padrão de agregação do solo. O estoque de carbono orgânico do solo aumentou sob os tratamentos agroflorestais (planta frutífera mais forrageira) em comparação ao controle. O incremento de carbono orgânico ao solo aumentou linearmente em relação à forrageira (*Stylosanthes hamata*), grama natural e no controle. O solo apresentou maior proporção de macroagregados e carbono orgânico para todos os sistemas agroflorestais. Entretanto, o melhor sistema foi a associação de Goiabeiras com *Stylosanthes hamata*. Resultados similares, para o estoque de carbono no solo foi encontrado por (SAHA et al., 2009), encontrando maior estoque sob áreas

compostas por múltiplas espécies de árvores associado a diversas culturas em comparação a áreas sob monocultivo de uma única espécie (arroz), principalmente, nas camadas mais profundas do solo.

Kumar et al. (2012) avaliaram sistemas integrados compostos por diferentes componentes e a reciclagem dos recursos produzidos em cada modelo integrado. O modelo integrado lavoura mais peixe mais pato e mais cabra obteve maior renda líquida, maior números de empregados temporários e melhor índice de sustentabilidade. Estimado pelo reaproveitamento de 73,1 % dos recursos gerados e reutilizáveis dentro do próprio sistema, retornáveis na forma de material orgânico. Ramos et al. (2010), avaliando duas espécies de culturas (*Avena sativa* L. e *Vicia sativa* L.), dois tipos de fertilização (mineral e orgânico) submetidos a três modos de pastejo animal e comparando a sistema sob frequente manejo em áreas semi-áridas, também observaram que os sistemas integrados apresentaram melhores propriedades físico-químicas do solo pela estabilidade de agregados e aumento de carbono e nitrogênio orgânico no solo.

#### **2.4 Manejo e conservação do solo**

A fim de acompanhar a demanda por alimentos, a produção agrícola deverá manter a mesma proporção que o crescimento populacional. Entretanto, o crescimento não deve contar com a abertura de novas áreas e sim investir no manejo e a conservação dos solos sob as áreas já destinadas ao cultivo agrícola. Conforme a FAO (2009), o setor agrícola ocupa 10,8 % do total das terras aráveis na superfície terrestre do planeta, o equivalente a 500 milhões de hectares. O impacto advindo da abertura de novas áreas afeta negativamente todo o ecossistema, alterando a biodiversidade e o equilíbrio da natureza e, sucessivamente, a qualidade de vida dos seres vivos.

Raddatz (2007) observou que o tipo de manejo e a cultura agrícola influenciam os elementos climáticos, inclusive, os gases relacionados ao efeito estufa. A emissão do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) é aumentada quando ocorre abertura de novas áreas, estimando que 15 % do CO<sub>2</sub> provem da ação antrópica, manejo do solo e consumo de combustíveis fósseis (FAO, 2003; SMITH; MARTINO & CAI, 2007). Corroborando, Vergé et al. (2007) enfatizam os problemas agravados pelo uso excessivo de fertilizantes nitrogenados em

diferentes sistemas produtivos sob a poluição ambiental. Visto que, o acúmulo de N no solo, pode ocasionar impactos negativos a qualidade do ecossistema, como a perda da biodiversidade, o domínio de espécies de plantas daninhas e acidificação do solo. Considerando, dessa forma, perdas estimadas em 50 % do nitrogênio adicionado ao solo via fertilizante a cada safra. Ollivier et al. (2011) ressalta a correlação de perdas econômicas indiretas para o agricultor via a emissão de gases do efeito estufa em sistemas produtivos convencionais.

A conservação do solo é sensível às práticas do sistema de produção agrícola, podendo ser comprometida pela perda dos recursos naturais. Em especial, os recursos orgânicos, os quais são responsáveis por proporcionarem a qualidade do solo por meio de processos funcionais interligados às propriedades químicas, biológicas e físicas do solo (SPARLING & SCHIPPER, 2002).

A degradação do solo pode ser baseada na qualidade e quantidade de matéria orgânica, depleção de nutrientes, resistência a penetração das raízes ao solo, restringindo o desenvolvimento das culturas, acidez do solo e na diminuição da atividade microbiana (BEZDICEK; BEAVER & GRANATSTEIN, 2003). Conforme Emmerling, Udelhoven e Schröder (2001), manifestações na degradação do solo também são aferidas por uma relação estreita da microbiota do solo. Outro fator relacionado à degradação de solo é a compactação, a qual é ocasionada por diversas práticas de cultivo como peso dos maquinários, arado de aiveca e escarificação, comprometendo assim a produtividade da cultura e a sustentabilidade do meio ambiente (FILIPOVIC, HUSNJAK, & KOSUTIC, 2006). A perda do carbono total do solo pode desencadear elevados efeitos negativos sobre a propriedade física do solo, incluindo a estabilidade dos agregados, infiltração da água (BLAIR, FAULKNER & TILL, 2011).

Mundialmente, a preocupação com a preservação do ecossistema tem se alastrado em todos os setores passíveis de causar alterações no meio ambiente, como as atividades que geram a emissão de gases do efeito estufa. Portanto, sob esse aspecto, os países são responsáveis por controlar e buscar atividades antropogênicas mitigadoras ao meio ambiente, procurando por alternativas a atividade agropecuária e ultrapassando o usual sistema extensivo com a prática do plantio direto e rotação de culturas e para poder,

então, implementar novos conceitos que conduzam a sustentabilidade do sistema produtivo, assim garantindo a preservação do ecossistema (BAVIN, GRIFFIS & BAKER, 2009; EUGSTER, MOFFAT & CESCIA, 2010; BENNETZEN et al., 2012).

Corroborando com o impacto do manejo agrícola, a atividade da pecuária também pode conduzir à degradação do solo, água, ar e da biodiversidade, além do desmatamento de florestas (MURGUEITIO et al., 2011). Ao longo do tempo, as consequências desta atividade podem aparecer sobre a capacidade produtiva daquele solo, ou seja, da extração excessiva dos recursos naturais, da falta de reposição de nutrientes ao solo e do manejo animal inadequado, isto é, condições mínimas para manutenção sustentável do sistema (FAO, 2009). A criação de gado na década de 70 no Brasil foi marcada pela expansão de novas áreas permeada por um sistema intensivo insustentável (ARVOR et al., 2012). Segundo a FAO (2009), a pecuária ocupa 26 % de todas as terras cultiváveis do globo terrestre, correspondendo a 3,4 bilhões de hectares. Segundo Rivero et al. (2009), a pecuária, com o passar do tempo, apresenta alta correlação entre o número de cabeças bovinas com o desmatamento, observando aumento na correlação positiva de 0,6808 em 2000 para 0,7768 em 2006.

O aumento da emissão dos gases do efeito estufa tem relação direta com a atividade da pecuária, sendo que esta é responsável por 18 % das emissões do total dos gases poluidores no globo terrestre (FAO, 2006). Dentre esses, o metano ( $\text{CH}_4$ ) é o mais emitido pela criação de gado. Estima-se que até 2020, somente a pecuária será responsável pelo aumento de 30 % de  $\text{CH}_4$  acompanhado pelo crescimento populacional e aumento da demanda mundial por carne e leite (USEPA, 2006). Além disso, o sistema pecuário é fonte de contribuição de outros gases poluentes, como, por exemplo, o óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), com risco para o aquecimento global de 296 vezes a mais do que o  $\text{CO}_2$  pelo forte poder de absorver radiação e o longo tempo de vida na atmosfera. Esse representa 30 % a 50 % das emissões advindas da agropecuária e é influenciado grandemente pelo manejo e uso do solo (OENEMA, WRAGE & VELTHOF, 2005; POWLSON et al. 2011; KIRSCHBAUM et al., 2012).

As propriedades físicas do solo são importantes para a aeração, o deslocamento e retenção da água e ar no perfil do solo, particularmente, a

porosidade. No entanto, quando o solo é submetido ao intensivo pisoteio animal, a estrutura física tende a ser perdida, ocasionando a redução da porosidade em torno de 10 % a 40 % da macroporosidade total do solo (LINDSAY; KIRKEGAARD & SWAN, 2011). Além do mais, conforme manejo do solo as condições físicas podem se tornar mais críticas, como observado por Houlbrooke et al. (2011) que, comparando diferentes práticas de pecuária, concluíram que a combinação da criação de gado associado ao pasto irrigado causaram maiores danos as propriedades físicas do solo, indicado pela redução da macroporosidade e o aumento da densidade do solo.

Por tanto, a criação de gado quando não conduzida por meio de práticas sustentáveis, como o controle de lotação animal por hectare, fornecimento de suplementação mineral, controle de cupins, plantas invasoras, pode interferir nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo. Esse tipo de prática pode contribuir na perda da biodiversidade, na diminuição da qualidade e quantidade de resíduos orgânicos retornáveis ao solo, na mudança da estrutura física do solo, nos macro e microagregados. Esse conjunto de fatores pode ocasionar na perda de nutrientes e erosão do solo com consequência da degradação do mesmo (ZHAO, LI, & QI, 2007; BILOTTA, BRAZIER & HAYGARTH, 2007; FRANZLUEBBERS & STUEDEMANN, 2008; PAUDEL et al., 2011).

Godefroid e Koedam (2008) observaram que empregar a associação de espécies arbóreas e a diversificação do padrão da estrutura da implantação da silvicultura, como a desigualdade de idade das plantas, implica em menor degradação do solo. Corroborando, a plantação de florestas em áreas degradadas e desertificadas atreladas com práticas de conservação podem reduzir processos erosivos, lixiviação do solo e mananciais, além da redução na emissão de CO<sub>2</sub> pelo sequestro de carbono retido na matéria orgânica do solo (ASANTE, ARMSTRONG & ADAMOWICZ, 2011; ZHANG, GUAN & SONG, 2012).

Diante deste contexto, as atividades agropecuárias e florestais têm se mostrado, ao longo dos anos, insustentável quando associadas ao manejo inadequado dos recursos naturais, particularmente, o solo, criando a expectativa da aquisição de novas tecnologias e conceitos que englobem

práticas sustentáveis sobre o manejo e uso do solo sob os sistemas produtivos, a fim de mitigar os possíveis impactos ambientais.

## **2.5 Comunidade microbiana do solo**

Os microrganismos do solo são representados por cinco grandes grupos: bactérias, fungos, algas e protozoários. As bactérias e os fungos são os responsáveis por cerca de 90 % das atividades microbiológicas do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). Diversos estudos têm relatado a importância de fungos e bactérias como componentes “chaves”, determinantes para a diversidade, funcionamento e sustentabilidade do ecossistema (SINGH; DAWSON & MACDONALD, 2009).

A sustentabilidade do ecossistema é dependente das atividades microbiológicas no solo, capazes de influenciar as propriedades físico-químicas do solo. Além de participar da decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, degradação de poluentes, fluxo de energia e formação de agregados do solo (CHÁVEZ et al., 2011; KAMAA et al., 2011).

A microbiota é sensível à mínima alteração que ocorra no solo, respondendo de forma instantânea às mudanças nela ocasionadas, mas, ao mesmo tempo, os microrganismos apresentam alto poder de resiliência e retomam o estado inicial rapidamente, pois apresentam características de rápido crescimento e multiplicação e a diversidade de fontes de energia via metabolismo (SIX et al., 2004; SIX, FREY & THIET, 2006).

Docherty e Gutknecht (2012) enfatizaram a relevância de compreender como a comunidade microbiana do solo é afetada com as mudanças ocasionadas ao meio ambiente, no intuito de prever as consequências na sustentabilidade do ecossistema.

Nesse panorama, a sustentabilidade dos sistemas agrícolas tem sido questionada diante da multiplicidade de insumos e forma de manejo do solo ao longo do tempo, não havendo indícios de como estas atividades afetam os microrganismos do solo. Segundo a FAO (1997), a qualidade da terra e seu uso sustentável estão diretamente ligados com o tipo de manejo ao qual é submetida.

A qualidade do solo é diretamente proporcional a funções que capacitam o solo a reciclar a água, nutriente e energia (CARTER, 2001). Por isso,

determinar processos funcionais que inferem sobre a qualidade do solo é essencial para traduzir a situação atual do solo mediante as variações ocasionadas durante as práticas agrícolas (DORAN & ZEISS, 2000).

Powlson et al. (2001) ressaltaram a importância de analisar bioindicadores do solo, especificamente, os microrganismos, por serem parte viva do solo e se diferenciam em âmbito da distribuição espacial e temporal dentro do ecossistema.

Dentre os bioindicadores de qualidade do solo, Nogueira et al. (2006), Schloter, Dilly e Munch (2003) enfatizam a eficácia em utilizar variáveis relacionados a processos microbiológicos, como a densidade de grupos funcionais de microrganismos, biomassa microbiana, respirometria, processo de mineralização de carbono e nitrogênio, atividade enzimática e entre outros.

## **2.6 Potencial biotecnológico de microrganismos**

No Brasil, o registro de organismos com potencial biotecnológico é informatizado no projeto virtual SPECIESLINK (2014) criado em 2002. Atualmente, 70 % dos dados são referentes a herbários, 25 % animal, 4,5 % coleções abrangentes e somente 0,2 % de microrganismos.

A coleção referente aos microrganismos, criada desde 2004, pertence à rede Sistema de Informação de Coleções de Interesse Biotecnológico (SicolNet), é constituída por 11.992 registros sendo 5.535 georreferenciados. Particularmente, a região do Centro Oeste e Norte do Brasil possuem cadastro de 1.537 e 1.135 indivíduos catalogados, respectivamente (SICOLNET, 2014).

É notável que estudos de bioprospecção de microrganismos no Brasil ainda são poucos, particularmente, nos biomas do Cerrado e Amazônia, onde são conhecidos internacionalmente pela rica biodiversidade. Sendo imprescindível preservar e conhecer a microbiota do solo nestes biomas, visando os benefícios que os microrganismos possam oferecer diante de aspectos sócio-econômico e ambiental, os quais são inmensuráveis (ASSUMPÇÃO et al., 2009; COMPANT et al., 2013; BRADER et al., 2014). Para ampliar o acesso a essa riqueza microbiana, o interesse e a aplicação do potencial biotecnológico é dependente da participação de instituições de pesquisas políticas públicas e privadas.

É extremamente relevante o potencial biotecnológico de microrganismos, que tem sido citado na literatura, e torna mais instigador o fato do solo conter mais de 20.000 componentes microbianos com a capacidade de beneficiar outros organismos, o meio ambiente e os seres humanos (SATYANARAYANA, 2005; DEMAINE & SANCHEZ, 2009).

Basicamente, o processo de bioprospecção parte de dois princípios: o isolamento e o armazenamento do microrganismo por métodos dependentes de cultivo. Esses métodos tradicionais são fundamentais para a descoberta de novos produtos, rigorosamente testados *in vitro*, a campo e, posteriormente, na fase de produção em larga escala do produto ou do próprio microrganismo aplicável nas áreas humana ou industrial (DIAS et al., 2009).

Nas últimas décadas, muitos estudos estão focando no uso da bioprospecção de microrganismos na implantação de tecnologias sustentáveis, direcionadas no controle biológico de fitopatógenos, disponibilidade de nutrientes, promoção do crescimento vegetal, biorremediação e produção energética (MA et al., 2013).

### **2.6.1 Controle biológico e solubilizadores de fosfato (SF)**

O uso de microrganismos benéficos no controle de doenças de plantas é considerado uma alternativa na tentativa de reduzir ou substituir a utilização de agrotóxicos. Atualmente, uma extensa abordagem tem sido relatada na literatura sobre a eficácia do uso de bactérias e fungos que estimulam o crescimento vegetal, promovem a melhoria no uso do solo e no controle de fitossanidade (FERREIRA et al., 2008; QUECINE et al., 2012; ZENG et al., 2012; LANNA FILHO et al., 2013).

Diante da imensurável diversidade de microrganismos a ser explorada, ampliam-se as possíveis descobertas de ações antagônicas e o vasto campo no desenvolvimento de produtos biológicos. Além disso, muitos trabalhos tentam elucidar os mecanismos de ação e as interações que ocorrem no processo antagonista-patógeno-hospedeiro com o intuito de compreender e identificar relações interespecíficas possíveis de controlar (TRIFONOVA, POSTMA & VAN ELSAS, 2009).

O desenvolvimento de produtos biológicos com potencial biotecnológico em controlar fitopatógenos agrícolas, envolvendo a utilização de organismos

autóctone ou introduzidos (nativos ou modificados geneticamente) no ambiente, tem sido uma alternativa positiva em minimizar ou eliminar os efeitos negativos das doenças e conseqüentemente na capacidade produtiva das plantas (MACHADO et al., 2012).

Na literatura, muitos exemplares bacterianos são descritos como potenciais controladores de doenças fúngicas, tais como o *Paenibacillus polymyxa* antagonista contra *Fusarium oxysporum* (DIJKSTERHUIS et al., 1999), *Pseudomonas* e *Serratia* spp. contra *Verticillium dahliae* (BERG et al., 2006) e *Pseudomonas* spp. contra *Rhizoctonia solani* AG3 (GARBEVA, VAN VEEN, & VAN ELSAS, 2004).

As bactérias, *Pseudomonas fluorescentes* são caracterizadas por propiciarem características de promoção do crescimento às plantas e uma vasta versatilidade catabólica (YANESET al., 2012; BERENDSEN et al., 2012).

Do mesmo modo, algumas espécies de microrganismos também possuem dupla ou ampla funcionalidade, apresentando ação antgônica a mais de um fitopatógeno, ampla produção de metabólitos e a capacidade de solubilizar formas de fósforo.

A utilização de microrganismos que possuem a capacidade de solubilizar e/ou mineralizar fosfato no solo contribui para o Uso Eficiente do Fósforo. A ação realizada por estes microrganismos torna disponíveis formas inorgânicas e orgânicas de fosfato às plantas, mediada pela produção de ácidos orgânicos e mecanismos via transporte intra ou extracelular, (TAO et al., 2008; BROWNE et al., 2009; DAS, NAYEK, & CHAKRAVARTY, 2012; SPOHN & KUZYAKOV, 2013).

Dentre essas, as bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*, caracterizadas pela presença de estrutura de resistência, apresentam multiplicidade de mecanismos antagônicos favorecendo a versatilidade em driblar as defesas dos fitopatógenos. No tocante à espécie *Bacillus subtilis* demonstra excelente agente controlador de doenças, mas também estão relacionadas com a promoção de crescimento vegetal, fixação de nitrogênio às plantas, síntese de fitormônios e na solubilização de fósforo. Além dos benefícios indiretos de competição no meio ambiente ocasionando a supressão de fitopatógenos (FILHO; FERRO & PINHO, 2010).

Dentre os microrganismos solubilizadores de fosfato, muito são classificados como Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCPs), contribuindo diretamente no desenvolvimento vegetal através de ampla variedade de mecanismos. Estas bactérias podem ser empregadas no controle de doenças fitopatógenas, promoverem a redução direta do uso de agroquímicos, além de beneficiarem na biofortificação de grãos pela maior capacidade de absorver micronutrientes, ocasionando economia ao produtor pela redução do uso de fertilizantes agroquímicos (LASLO et al., 2012; RANA et al., 2012; BENEDUZI et al., 2013).

Existem duas formas de associação entre microrganismos e plantas capaz de solubilizar fósforo, os de vida livre e os simbioses (mutualismo facultativo). Os simbioses são fungos micorrízicos e ectomicorrízicos que se associam com as raízes das plantas. Os de vida livre são bactérias que não formam estruturas nas plantas como as bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* spp. (GYANESHWAR et al., 2002).

Neto et al. (2011), avaliando espécies arbóreas, anuais e perenes em dois locais da região da Amazônia, constataram baixa frequência de bactérias solubilizadoras de fosfato isoladas em meio de culturas sob duas fontes de P, cálcio e alumínio. Do total avaliado, 6,24 % e 0,50 % apresentaram bactérias positivas nos respectivos locais, enfatizando que o local e as características do solo podem influenciar diretamente na presença de bactérias solubilizadoras de P e, fracamente, podem ser dependente da espécie vegetal.

Concomitantemente, Mander et al. (2012) também observaram que o tipo de solo influencia a frequência de bactérias solubilizadoras de fosfato, assim como o tipo de manejo no solo, em que a dependência pela constante aplicação de altas doses de P no solo contribui para a redução dessas bactérias.

## **2.7 Ferramentas moleculares**

Conhecer a diversidade microbiana do solo é o aspecto mais importante a ser analisado dentro do estudo da ecologia microbiana do solo. Porém é também considerado um dos estudos mais desafiadores. Estima-se que menos de 10 % da diversidade microbiana do solo foi cultivada em laboratório

(TORSVIK; ØVREÅS, 2002) devido às limitações em isolar e cultivar os microrganismos *in vitro* em condições artificiais e controladas (LIU, ZHAO & CHEN, 2006).

Desta forma, o isolamento de microrganismos, em meio de culturas advindas de amostras de solos, não condiz com a real diversidade presente no ambiente. Além disso, na tentativa de isolar os microrganismos do solo é notado que grupos dominantes e abundantes podem sobressair (DUBEY, TRIPATHI & UPADHYAY, 2006).

O estudo de ecologia microbiana é uma nova área da ciência do solo, em consequência dos avanços molecular e tecnológico, a qual visa aprofundar o conhecimento da diversidade, abundância, distribuição e funcionamento das comunidades microbianas no meio ambiente. Ademais, tenta compreender a relação complexa que existe entre fatores bióticos, abióticos e os microrganismos.

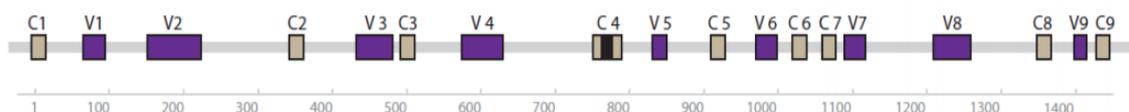
O desenvolvimento das ferramentas moleculares possibilitou descobrir microrganismos pertencentes a grupos filogenéticos que nunca tinham sido cultivados em meio artificial, consolidando a classificação taxonômica, as funções dos microrganismos e sua relação com a sustentabilidade dos agroecossistemas (RANJARD, POLY, & NAZARET, 2000; PAREKH & BARDGETT, 2002; DUBEY et al., 2006; TRABELSI et al., 2012).

No entanto, ao relacionar as comunidades microbianas do solo com a sustentabilidade dos ecossistemas, é preciso elucidar principalmente dois pontos: quais os fatores que influenciam a distribuição, diversidade, estrutura e abundância das comunidades microbianas e como a dinâmica e interação entre os níveis populacionais das comunidades microbianas interferem nos processos ambientais (TRABELSI et al., 2012).

### **2.7.1 Estrutura da comunidade bacteriana do solo**

A estratégia comumente utilizada para estudar a diversidade bacteriana do solo é através do gene 16S RNA ribossomal (16S RNAr), a menor subunidade do ribossomo de procariontes. Os 16S RNAr são considerados importantes marcadores moleculares por que: I) estão presentes em todos os procariontes; II) são estruturalmente e funcionalmente conservadas; III)

apresentam tanto regiões conservadas quanto variáveis e altamente variáveis para cada espécie; IV) apresentam aparente ausência de transferência gênica horizontal; V) têm tamanho satisfatório, com cerca de 1500 nucleotídeos, suficientes para fazer inferências filogenéticas (Figura 1.) (LOUWS, RADEMAKER & BRUIJN, 1999; LACAVALA, et al., 2006; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2005).



**FIGURA 1.** Representação esquemática do gene 16S RNA ribossomal composto por 1400 pares de bases nucleotídicas. Regiões variáveis destacada pela cor roxa e regiões conservadas com a cor bege. A região destacada em preto representa região invariável entre todas as bactérias. Figura extraída do livro intitulado, a review of publications featuring Illumina® Technology, Metagenomics 2nd edition (ILLUMINA, 2014).

A partir da amplificação dos 16S RNAr, pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), a avaliação da comunidade pode ser analisada por diferentes técnicas moleculares. Com auxílio da eletroforese, baseada na geração de perfis provenientes da separação física da sequência de genes do RNAr ou DNA em um meio gelatinoso, engloba-se a técnica do DGGE, ARDRA, T-RFLP, RISA, RAPD.

A DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) pode ser utilizada tanto para estudos de diversidade bacteriana total quanto para grupos bacterianos específicos a nível de gênero ou funcionalidade. Alguns exemplos são os iniciadores moleculares chamados “*primers*”, o gene *rpoB* que codifica a subunidade β da RNA polimerase, essencial no metabolismo de todas as bactérias (PEIXOTO et al., 2002) e genes funcionais como o gene *nifH* (fixação de N atmosférico) e *amoA* (oxidação do amônio) (CHU et al., 2007a; INNEREBNER et al., 2006). Além disso, a técnica serve como ferramenta para monitorar as mudanças em âmbito espacial e temporal da estrutura da comunidade microbiana e identificar as espécies microbianas dominantes.

A técnica de DGGE é caracterizada por apresentar a capacidade de determinar a estrutura genética da comunidade bacteriana independente de cultivo em meio artificial. A técnica basicamente identifica diferenças na

comunidade microbiana pela composição dos pares de bases dos quatro nucleotídeos e não pelo tamanho do fragmento (MUYZER, DEWAAL & UITTERLINDEN, 1993). A DGGE exige técnica laboratorial para a calibração do reagente desnaturante e os *primers* devem conter grampos de bases de nucleotídeos CG.

A metodologia separa fragmentos do gene em gel de poliacrilamida (acrilamida e Bis-acrilamida), contendo gradiente desnaturante linear, formado por uréia e formamida e submetido a corrente elétrica e uma temperatura constante (ANDREOTE et al., 2009). Ao longo do perfil vertical, o gradiente desnaturante é crescente e os fragmentos carregados pela eletroforese com diferenças na composição da fita dupla de DNA irão desnaturar em concentrações diferentes permanecendo em diferentes posições do gel. Ao final, um complexo de perfis de bandas por todo o gel representando as comunidades bacterianas poderá ser visualizado com a presença de corante (RANJARD et al., 2000).

Considerando a importância da comunidade microbiana em promover a sustentabilidade do ecossistema e manter a qualidade e saúde do solo, Montecchia et al. (2011) avaliaram o comportamento estrutural e funcional da comunidade microbiana do solo sob diferentes manejos e vegetações. Os padrões de bandas provenientes da análise de DGGE foram agrupados por similaridades e identificados quais os domínios de comunidades bacterianas relacionadas com o manejo do solo. A área sob recente desmatamento florestal apresentou maior similaridade com a comunidade bacteriana com as áreas exposta à monocultura de soja por 20 anos e duas áreas cultivadas com cana de açúcar, 40 anos e 100 anos de uso da terra, respectivamente.

Nesta perspectiva, avaliar a estrutura microbiana do solo por meio de técnicas moleculares tem visado elucidar tipos de manejos que podem causar distúrbios na qualidade do solo. Peixoto et al. (2006), comparando sistemas de manejos convencional e conservacionista, observaram, por análise de PCR-DGGE por meio dos genes 16S RNAr e *rpoB*, diferenças na população bacteriana evidenciando o uso da metodologia como indicador de qualidade do solo através de mudanças ocasionadas na estrutura bacteriana do solo.

Wang et al. (2009), considerando a estrutura da comunidade microbiana do solo como indicadora de qualidade do solo, investigaram o efeito de três

sistemas de manejo sob a estrutura da comunidade bacteriana do solo em três profundidades. A partir da análise do 16S RNAr por meio de PCR-DGGE, o perfil de bandas indicaram menor número na camada mais superficial do solo (0-10 cm) em relação às demais profundidades, sugerindo na camada superficial maior população microbiana, porém com a estrutura bacteriana de menor diversidade.

O uso excessivo de metal pesado e de agrotóxicos pode alterar a estrutura da comunidade microbiana, caracterizando perdas na diversidade genética e funcional microbiana. Demanou et al. (2006) investigaram o efeito de fungicida combinado ao cobre sobre a comunidade bacteriana e fúngica do solo em áreas agrícolas até então isenta do uso de pesticidas, por meio da técnica de PCR-DGGE com os genes 16S e 18S do RNAr. Os autores conseguiram observar o detrimento da população fúngica contrário a população bacteriana. No entanto detectaram um novo grupo populacional na estrutura da comunidade de bactérias do solo e evidenciaram a eficiência e sensibilidade da metodologia em detectar mudanças na comunidade bacteriana do solo por alterações ocasionadas em um curto período de tempo.

A aplicação correta e balanceada de fertilizantes no solo condiciona as mudanças na estrutura da comunidade bacteriana do solo, como foi relatado por Chu et al. (2007b) em campo experimental avaliado por 16 anos. Os autores detectaram diferenças na estrutura da comunidade bacteriana em solo tratado com resíduo orgânico observado na análise filogenética advinda do resultado da DGGE pela seleção de genes alvos, 16S RNAr, do domínio *Eubacteria*, indicando incremento na diversidade populacional bacteriana devido ao estímulo do composto incorporado ao solo.

Ferrero, Menoyo e Lugo (2010) analisaram a comunidade bacteriana rizosférica de pastagens nativas localizadas ao Sul da América sobre diferentes altitudes em áreas sob alta radiação solar e aridez por meio da técnica de PCR-DGGE, incluindo o cultivo dependente e independente. Observaram somente a riqueza de bandas em relação à diferença de altitude com a baixa diversidade bacteriana.

Oliveira et al. (2009) avaliaram a diversidade funcional e genética de bactérias associadas à rizosfera de genótipos de milho quanto à eficiência de uso de fósforo, por meio do teste de fontes de carbono em eletroforese em gel

de gradiente desnaturante (DGGE) dos fragmentos amplificados dos genes 16S ribossomais (DNAr) das bactérias. Não houve diferença na diversidade bacteriana entre bactérias associadas a genótipos eficientes e ineficientes no uso de P. Com base no sequenciamento do 16S DNAr, foi verificado que a rizosfera de genótipos de milho sob estresse de P parece selecionar grupos específicos de bactérias. A estrutura populacional genética de bactérias da rizosfera foi mais influenciada pelo teor de fósforo no solo do que pela eficiência das plantas em usar o fósforo.

O uso desta ferramenta molecular possibilita avaliar tanto as comunidades bacterianas cultivadas, quanto as não cultivadas nos meios de cultura normalmente utilizados para estudá-los. Desta forma, a biologia molecular por meio da técnica de DGGE pode auxiliar no estudo e monitoramento do componente microbiológico do solo, o qual é considerado um dos indicadores de qualidade de solos diante do uso e condições ambientais.

### **2.7.2 Composição da comunidade microbiana do solo**

O solo é o maior reservatório de diversidade genética microbiana do planeta. Estima-se que em apenas 1 g de solo existam cerca de 10 bilhões de microrganismos (TORSVIK & OVREAS, 2002; ROSSELÓ-MORA; AMANN, 2001). A realidade, de que pouco se conhece sobre a composição da microbiota dos solos e nos diferenciados habitats do planeta, foi consolidada a partir do advento dos estudos metagenômicos (HANDELSMAN, 2004). Tornando evidente a ampla abundância de microrganismos que ainda não foram possíveis de identificar tradicionalmente ou devido a técnicas moleculares alongadas, elaborosas e onerosas (RAPPE & GIOVANNONI, 2003; ANDREOTE et al., 2009; STEWART, 2012).

Este panorama barrava o acesso à diversidade de genes microbianos, seus metabólitos, o entendimento da ecologia microbiana e as influências dos microrganismos na sustentabilidade dos ecossistemas (ZENGLER, 2009).

A metagenômica tem sido amplamente empregada para determinar a composição a nível taxonômico da comunidade microbiana, como também obter sua frequência e diversidade dos mais variados ambientes; além de

poder monitorar a dinâmica populacional das comunidades (KENNEDY; MARCHESI & DOBSON, 2007). Estes estudos são possíveis através das novas ferramentas tecnológicas aprimoradas em 2005 e hoje o acesso vem crescendo por todo o mundo. São os chamados Nova Geração de Sequenciadores (NGS) (CARVALHO & SILVA, 2010).

Os NGS são representados pelos sequenciadores da plataforma 454 FLX da Roche, Solexa da Illumina, da SOLiD da Applied Biosystem e também já existe os novos lançamentos das plataformas de segunda geração de sequenciadores (SGS) da Ion Torrent, HeliScope, 5500 SOLiD, PacBio RS e do Illumina com a plataforma MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA). Independente da tecnologia selecionada, a maioria dos sequenciadores identifica as sequências das bases nitrogenadas por reações químicas, geram arquivos eletrônicos em formato de dados que as representam e, por fim, são manipulados em ferramentas computacionais gratuitas. Ressaltando que cada tipo de sequenciamento tem suas peculiaridades, conforme o objetivo a ser alcançado no estudo.

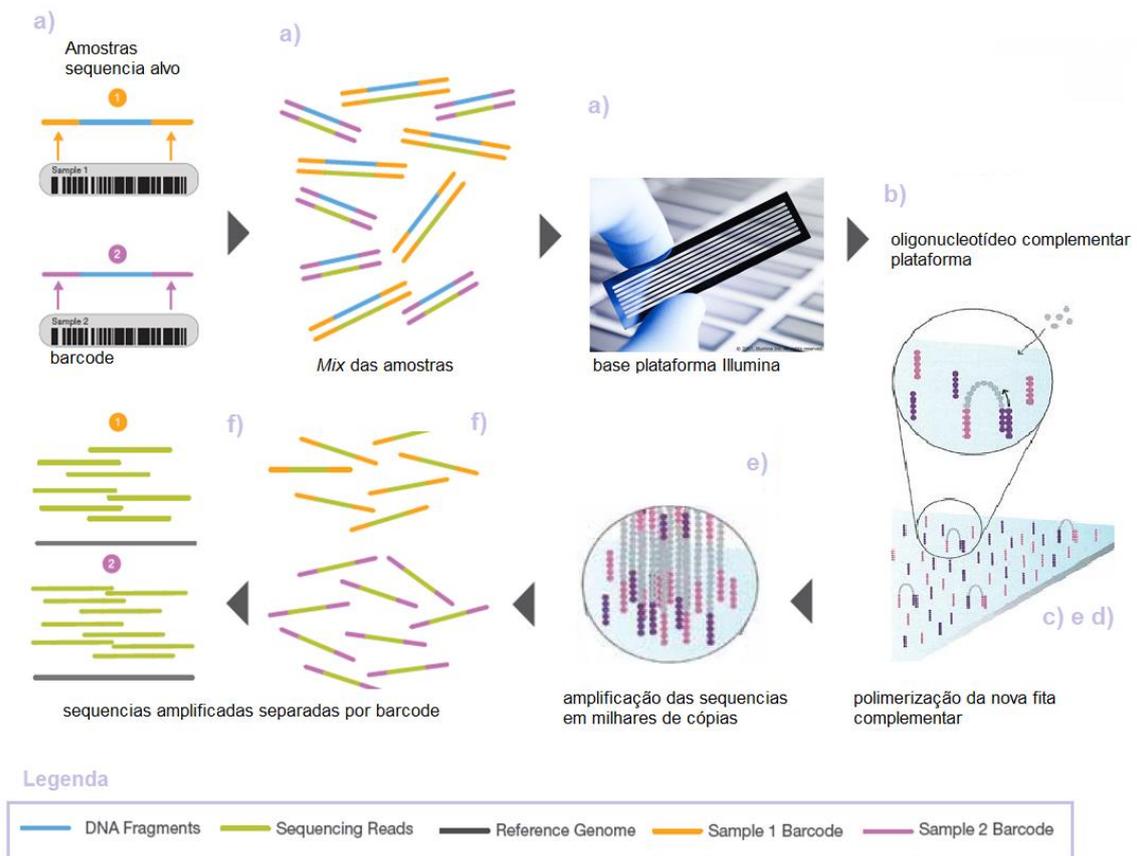
A tecnologia para a plataforma MiSeq oferece kits de reagentes para estudos de metagenômica. Dentre as particularidades do processo, estão: a) combinação da sequência alvo (amostra) com oligonucleotídeos conhecidos (*barcode*) aderidos à adaptadores específicos e mistura de todas as amostras em único “*mix*”; b) ligação do oligonucleotídeo da amostra com o oligonucleotídeo complementar presente na base da plataforma MiSeq; c) polimerização da nova fita complementar a sequência alvo seguido da sua desnaturação e lavagem da mesma; d) oligonucleotídeo localizado na outra extremidade da sequência alvo se liga com o outro tipo de oligonucleotídeo presente na base do Illumina; e) inicia o processo de amplificação e a clonagem de milhões de cópias da sequência originalmente alvo representado região do gene 16S RNAr; f) separação das cópias das sequências alvo conforme seu respectivo barcode (Figura 2).

Conforme avaliado em Caporaso et al. (2012), o tempo para sequenciar 2167 amostras com seus respectivos barcodes - cada referente a uma amostra - foi de 12 h. Cada amostra gerou 740 sequências provenientes de sequência pareadas com 150 pb (pares de bases) e dentro do orçamento total de US\$800 dólares. O resultado rápido e de baixo custo pode ser explicado pelo método

misturar todas as amostras em uma única plataforma do sequenciador (termo definido como “*multiplexing*”).

Giongo et al. (2013), na tentativa de identificar microrganismos presente em amostras de areia e poeira comparando metodologias de sequenciamento, puderam verificar cem vezes mais microrganismos com a tecnologia Illumina™ em relação ao método por isolamento, cultivo, clonagem e sequenciamento. Além disso, dentre duas bases de dados referentes à procariontes conseguiram classificar mais de 50 % das sequências quando usaram a RDP (Ribosomal Database Project) em comparação a base de dados SILVA (2014).

Entretanto, a base de dados SILVA (2014) tem ganhado citações no campo de referência científica, voltadas para pesquisas de sequenciamento de RNAr, tendo alcançando mais de 2000 vezes o número de citações em 2014. Além disso, Quast et al. (2013) afirmam que a base de dados SILVA contém extensa informação de dados não redundantes para as subunidades 16S, 18S e 23S, 28S em constante atualização e sequências de boa qualidade referente aos domínios *Bacteria*, *Archaea*, *Eukarya*.



**FIGURA 2.** Esquema representativo do sequenciamento sob plataforma Illumina™. Imagens retiradas da internet com autoria da tecnologia Illumina (2014) e Harvard (2014).

O aumento da acuracidade do sequenciamento pela tecnologia Illumina, para detectar microrganismos com baixa abundância relativa em amostras ambientais, foi analisada por Bartram et al. (2011). Os autores conseguiram desenvolver uma metodologia menos onerosa em comparação aos sequenciadores Sanger e Roche. A redução das sequências com erros e o aumento da eficácia do sequenciamento devido a utilização de *primers* com maior número de pares de bases (sequências pareadas com 150 pb cada) juntamente com *primers* sinalizadores (6 pb). Além de, enfatizarem pela primeira vez uma metodologia com acesso a organismos de baixa abundância relativa e sua possível comparação de diversidade taxonômica presente no complexo das comunidades microbianas.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Região de estudo**

O local de estudo está localizado no município de Sinop no estado de Mato Grosso sob as coordenadas 11° 51' S, 55° 35' W. A região está inserida em área de transição entre os biomas, Cerrado e Floresta Amazônica (HAIDIR et al., 2013).

O clima segundo Köppen é tropical (Aw) com inverno seco e caracterizado por apresentar médias anuais de temperatura de 25°C, umidade relativa de 82,5 % e precipitação de 2.550 mm (INMET, 2014).

O solo é classificado como Latossolo Vermelho Amarelo distrófico com relevo plano e altitude de 380 m (DIEL et al., 2014).

#### **3.2 Histórico da área experimental**

No início da década de 80, a área experimental foi desmatada para cultivo da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com término do desmatamento na década de 2000. No início dos anos 90 passou a ser cultivado arroz (*Oryza sativa* L.) e, posteriormente, soja (*Glycine max* (L.) Merr.). Entre os anos de 2002 a 2007, soja e milho safrinha (*Zea mays* L.) passaram a ser cultivados sob sistema convencional e, nas safras de 2007/2008 e 2008/2009, foi implementado o sistema de sucessão com soja e algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (DIEL et al., 2014).

Hoje, a área pertence ao campo experimental da Embrapa Agrossilvipastoril e entre a safra de 2010/2011 a área experimental permaneceu sem o cultivo de culturas agrícolas.

### 3.3 Sistemas agrícolas

Os tratamentos avaliados foram implantados em outubro de 2011 e estão vinculados ao projeto aprovado pelo CNPq em 2010 (562850/2010-4): “Estabelecimento e avaliação de sistemas de ILPF no Estado de Mato Grosso” com planejamento de ser avaliado durante 16 anos.

Antecedendo a instalação dos tratamentos foi determinado os atributos químicos e granulométrico na camada de 0–20 cm: pH em H<sub>2</sub>O de 5,7; 8,7 mg dm<sup>-3</sup> de P (Mehlich<sup>-1</sup>); 74 mg dm<sup>-3</sup> de K (Mehlich<sup>-1</sup>); 2,5 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de Ca; 0,81 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de Mg; 0,02 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de Al; e 1,6 dag kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica (MO). A textura do solo é argilosa com 322 g kg<sup>-1</sup> de areia, 118 g kg<sup>-1</sup> de silte e 560 g kg<sup>-1</sup> de argila (DIEL et al., 2014). Posteriormente foi aplicado calcário nas parcelas experimentais, incorporado com gradagem e seguido do não revolvimento do solo.

Para todos os tratamentos, foi adotado o sistema de plantio direto e atendida as recomendações agronômicas conforme a espécie cultivada. Nas parcelas com o componente florestal, o preparo das linhas de plantio foi realizado com sulcador florestal na profundidade de 50 a 60 cm de profundidade. As árvores de *Eucalyptus urograndis* clone ‘H-13’ (híbrido *E. urophylla* x *grandis*—HUG) foram transplantadas em Novembro de 2011. Os sistemas de cultivo monoespecífico de eucalipto atendeu o espaçamento 3,5 x 3,0 m entre as plantas e nos sistemas integrados com eucalipto e culturas agrícolas foi realizado em faixas (renques) de linhas triplas, espaçadas por 3,5 m x 3,0 m entre planta e na distância de 30 m entre renques. Foram aplicados no sulco de plantio do eucalipto, 350 kg ha<sup>-1</sup> de superfosfato simples e realizadas adubações de cobertura por planta com 100 g de NPK 20-00-20.

Os tratamentos com lavoura foram cultivados com soja variedade BRS Favorita (*Glycine max* (L.) Mer.) no verão para o primeiro ano e BRSGO 8560 RR no segundo ano. Para a cultura da soja (safra) foi fornecido 400 kg ha<sup>-1</sup> de NPK 00-20-20 no primeiro e segundo ano agrícola e no milho safrinha consorciado com pastagem (*Urochloa brizantha* 'Marandu') foi adubado com 400 kg ha<sup>-1</sup> de NPK 04-30-16.

Nos tratamentos exclusivos com pastagem foi aplicado  $400 \text{ kg ha}^{-1}$  de NPK 04-30-16, somente no primeiro ano agrícola. Os tratamentos, consorciados ou não com *Urochloa brizantha* 'Marandu', não tiveram a presença de animal em pastejo, apenas ocorreu à realização de fenação na safra 2011/2012 e a entrada dos animais está prevista para a safra 2014/2015.

O delineamento experimental é o de blocos ao acaso com quatro repetições, contido em área total de 78 hectares (ha), representado na Figura 3.



**FIGURA 3.** Imagem de satélite do experimento ILPF gado de corte da Embrapa Agrossilvipastoril, indicando a disposição dos dez tratamentos no bloco 4 e a área de pousio representado em formato de círculo entre os blocos do experimento (GOOGLE, 2014).

A área experimental é composta por dez tratamentos, sendo três sistemas de monocultivo (Lavoura (L), Pastagem (P) e Floresta plantada de eucaliptos (F)) e sete sistemas integrados (IL-P, IP-L, ILF, IPF, ILF-IPF, IPF-ILF, ILPF) formados por diferentes arranjos com as culturas de monocultivo.

Na descrição inicial do projeto do CNPq, alguns sistemas integrados foram definidos para alternarem a composição do arranjo do sistema em ciclos de dois em dois anos e posteriormente de quatro em quatro anos. Por isso, este estudo englobou a avaliação de tratamentos com sistemas integrados que

acabaram sendo compostos pela mesma cultura agrícola, em virtude de terem sido avaliados somente no ano de 2012, como está descrito na Tabela 1.

**TABELA 1.** Composição agrícola dos dez tratamentos avaliados no ano de 2012 nos períodos de chuva e seca.

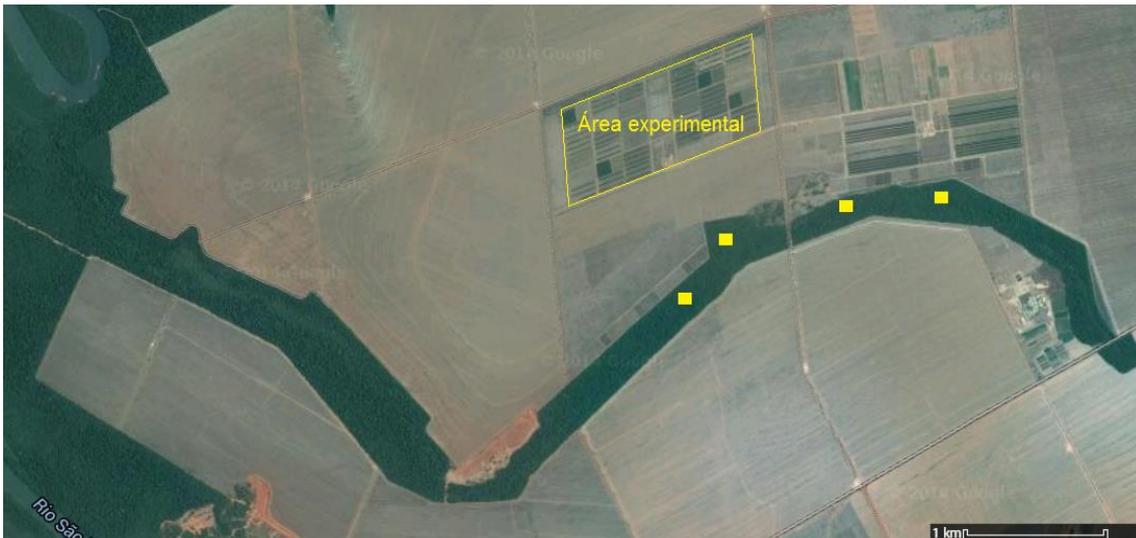
Tratamentos (sigla)	Culturas agrícolas	
	Época de coleta	
	Chuva (Fev-Mar)	Seca (Ago-Set)
1- Floresta (F)	eucalipto*	eucalipto
<sup>a</sup> 2- Lavoura (L)	soja – milho safrinha**	-
<sup>b</sup> 3- Pastagem (P)	braquiária***	braquiária
<sup>b</sup> 4- integração Pastagem Lavoura (IP-L)	braquiária	braquiária
<sup>a</sup> 5- integração Lavoura Pastagem (IL-P)	Soja – milho safrinha	-
<sup>c</sup> 6- integração Lavoura Floresta (ILF)	eucalipto integrado com soja – milho safrinha	eucalipto
<sup>d</sup> 7- integração Pastagem Floresta (IPF)	eucalipto integrado com braquiária	eucalipto integrado com braquiária
<sup>c</sup> 8- integração Lavoura Pastagem Floresta (ILF-IPF)	eucalipto integrado com soja – milho safrinha	eucalipto
<sup>d</sup> 9- integração Pastagem Lavoura Floresta (IPF-ILF)	eucalipto integrado com braquiária	eucalipto integrado com braquiária
10- integração Lavoura Pastagem Floresta (ILPF)	eucalipto integrado com soja – milho safrinha	eucalipto integrado com braquiária

\*: *Eucalyptus urograndis* clone 'H-13'; \*\*: Consorciado com *Urochloa brizantha* 'Marandu'; \*\*\*: *Urochloa brizantha* 'Marandu'; -: Presença dos restos culturais da safra anterior; <sup>a,b,c,d</sup>: Tratamentos com letras iguais possuem a mesma composição agrícola entre si para as duas coletas.

### 3.4 Áreas de referências

A 1ª área está localizada entre os blocos do experimento da fazenda experimental da Embrapa Agrossilvipastoril e desde 2010 deixou de ser área agrícola sendo naturalmente revegetada por gramíneas invasoras.

A 2ª área está coberta por mata nativa composta por Floresta Estacional Perenifolia (HAIDAR et al., 2013). O fragmento avaliado está localizado próximo a área experimental da fazenda da Embrapa Agrossilvipastoril, formando corredor ecológico a partir da mata ciliar do rio Teles Pires com extensão total de 7,3 km e largura média de 200 m (Figura 4).



**FIGURA 4.** Imagem de satélite do fragmento de Mata nativa próxima a área do experimento, destacando em amarelo os locais de amostragem do solo (GOOGLE, 2014).

### 3.5 Amostragem de solo

A coleta das amostras de solo foi realizada em 2012 nas estações de chuva e de seca. Durante a coleta na época da chuva, fevereiro a março, a precipitação total foi de 199 mm (36 dias de precipitação) com temperatura média de 27 °C e umidade relativa média de 80 %. Na época de coleta na seca, agosto a setembro, a precipitação total foi de 41 mm (4 dias de precipitação) com temperatura média de 28 °C e umidade relativa média de 53 % (INMET, 2014).

Na área de cada sistema de cultivo solteiro foram coletadas 20 subamostras aleatórias em ziguezague, com trado holandês desinfestado com álcool 70 % a cada parcela, na profundidade de 0 a 0,10 m para formar uma amostra composta

Para as áreas contendo sistema integrado com o componente florestal, a amostragem do solo foi coletando-se cinco subamostras nas entrelinhas de eucalipto e cinco subamostras entre plantas na mesma linha e as demais dez subamostras coletadas na área dispostas entre os renques de eucalipto totalizando 20 subamostras.

As amostras foram embaladas, identificadas e acondicionadas em caixa de isopor com gelo até serem transportadas ao laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Embrapa Agrossilvipastoril. No

laboratório, o solo foi homogeneizado e armazenado sob temperaturas de 5°C e -80°C para análises microbiológicas e moleculares, respectivamente.

### **3.6 Análises Microbiológicas**

#### **3.6.1 Isolamento e quantificação de bactérias totais**

Foi realizada diluição seriada a partir de 10 g de solo com umidade natural em 90 mL de solução fosfatada tamponada esterilizada (PBS: 1,44 g mL<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24 g mL<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,20 g mL<sup>-1</sup> de KCl; 8,00 g mL<sup>-1</sup> de NaCl e pH 7,4), submetido em agitador orbital mecânico a 150 rpm por 60 min a 28°C. O plaqueamento foi realizado com alíquota de 100 µL das respectivas diluições 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-5</sup> sobre meio de cultura TSA 10 % (Tryptona Soja Agar). Os isolamentos foram realizados em triplicata e incubados por 48 h a 28 °C em BOD. A enumeração e quantificação das bactérias totais foi realizada e a contagem dada em Unidades Formadoras de Colônias (UFCs).

#### **3.6.2 Seleção de isolados bacterianos para teste de bioprospecção**

Para cada tratamento foi pré-determinado a seleção de 48 isolados bacterianos baseado na diversidade morfológica e de coloração (morfocromática) das UFCs previamente plaqueadas e crescidas em meio TSA. Ao final foram armazenados 1.152 isolados bacterianos respectivos as duas épocas de coleta.

Para purificar os isolados bacterianos selecionados foi realizado o método por estrias de esgotamento em nova placa de Petri contendo TSA 10 %. Após obtido os isolados puros, os mesmos foram crescidos em meio líquido TSA 10 %, conservados sob solução final de glicerol a 20 % e armazenados sob temperatura de -80 °C.

Posteriormente, para os testes de avaliação do potencial biotecnológico de antagonismo e solubilização de fosfato, foram escolhidos vinte isolados bacterianos por tratamento para cada coleta, baseado pelas diferenças visuais dentre as características morfocromáticas das colônias bacterianas de modo aleatório. Resultando na escolha de 240 isolados bacterianos por época para serem realizados os testes *in vitro*.

### **3.6.3 Teste de bactérias no controle biológico de fitopatógenos**

Os fitopatógenos foram isolados de milho e soja com lesões de doenças fúngicas na região de Sinop/MT, identificados morfologicamente como *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. e *Sclerotium* sp. e posteriormente foram identificados em espécies. Esses fitopatógenos foram cedidos pelo Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia da Universidade Federal de Mato Grosso - Campus de Sinop/MT.

O teste de antagonismo adotado foi o método da cultura pareada, modificado de Araujo, Henning e Hungria (2005) e Mariano (1993). Ao canto da placa de Petri contendo meio BDA foi inoculado o fitopatógeno e ao lado oposto o isolado bacteriano. Após, período de incubação a 28°C por 15 dias, o isolado bacteriano foi considerado como positivo quando observado presença do halo de inibição de crescimento formado ao seu redor e entre o fitopatógeno. A fim de certificar os resultados obtidos, os procedimentos foram repetidos com os isolados bacterianos positivos.

### **3.6.4 Avaliação de bactérias com potencial solubilizador de fosfato**

O teste para identificar bactérias Solubilizadoras de Fosfato (SF) foi testada com os mesmos isolados utilizados no teste de antagonismo, previamente descrito, para as duas épocas de coleta em 2012.

Em placa de Petri de vidro (raio de 3,5 cm), cinco isolados bacterianos foram inoculados sobre meio específico para microrganismos Solubilizadores de Fosfato (10 g Glicose, 5 g NH<sub>4</sub>Cl, 1 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1 g NaCl, 0,8 g CaHPO<sub>4</sub>, 15 g Ágar, pH 7,2 por litro de água) e incubados por 15 dias em estufa incubadora refrigerada tipo BOD (demanda biológica de oxigênio). A presença do halo de solubilização de fosfato caracterizou os isolados como positivos em solubilizar a fonte de fosfato inorgânica testada. Para os isolados positivos, os procedimentos foram repetidos.

### **3.6.5 Sequenciamento parcial dos isolados com potencial biotecnológico**

A identificação molecular foi determinada para os isolados bacterianos que apresentaram potencial biotecnológico para ambas aptidões, antagônica e solubilizadora de fosfato.

Primeiramente, os isolados foram cultivados em meio de cultura TSA 10 %, transferido uma porção da colônia, com o auxílio de um palito de madeira esterilizado, para microtubos contendo 200 µL de água deionizada ultra-pura autoclavada e, a partir desta, a suspensão bacteriana foi aplicada diretamente a PCR para amplificar o fragmento do gene 16S RNAr (FERREIRA et al., 2008).

Na PCR, as reações foram realizadas com volume final de 50 µL contendo 1 µL da suspensão bacteriana, como descrito acima, 5 µL de tampão 10x com MgCl<sub>2</sub> (Sigma), 0,2 mM dos desoxirribonucleotídeos trifosfato, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Sigma) e 200 mM de cada primer (iniciador) PO27 (5' - GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') e primer (finalizador) 1378 (5' - CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG - 3').

A PCR foi conduzida em termociclador (Bio-Rad T100™ Thermal Cycler) programado para realizar desnaturação inicial a 94°C por 4 min seguidos de 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 62,5 °C por 1 min, 72 °C por 1 min e extensão final de 72 °C por 7 min. A presença e tamanho do fragmento amplificado na PCR, 1400 pb, foram confirmados em gel de agarose 1 % (p/v) corado com GelRed™ 20 x, submetido a eletroforese 70 V por 40 min, observado sobre luz ultravioleta e fotodocumentado (Loccus Biotecnologia). Posteriormente, os fragmentos foram purificados com adição de álcool Isopropanol 100 % seguido de centrifugação por 15 minutos a 9000 Xg, lavado com etanol 70 % por duas vezes e ressuspendido o sedimento em 10 µl de água ultra pura.

O produto purificado foi quantificado em Nanodrop (Thermo Scientific) e enviado para o Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células – Tronco da USP responsável por sequenciar os isolados bacterianos. A sequência de cada isolado bacteriano foi recebida via e-mail, extraída pelo programa Chromas Lite.Ink (2009) e contrastando a identificação da similaridade entre a sequência desconhecida com as sequências depositadas na base de dados do portal do National Center for Biotechnology Information

(NCBI), por meio do programa *online* BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) *nucleotide blast* (<http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (ALTSCHUL et al., 1990).

### 3.7 Análises moleculares

#### 3.7.1 Perfil da comunidade bacteriana total do solo (DGGE)

A análise foi realizada com a técnica de Gel em Eletroforese com Gradiente Desnaturante (DGGE – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Para isso, o DNA total do solo foi extraído com PowerSoil™ DNA *isolation kit* (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA., USA), conforme protocolo descrito pelo fornecedor. Primeiramente, a fim de evitar a amplificação de possíveis DNAs de cloroplastos do material genômico extraído do solo, uma PCR-1 foi realizada (CHELIUS; TRIPLETT, 2001).

Cada reação da PCR foi calculada para volume final de 25 µL, contendo 1 µL do DNA total extraído (5-10 ng), 5 µL de tampão 10x com MgCl<sub>2</sub> (Sigma), 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeos trifosfato, 0,4 µM de cada primer (iniciador 799 e finalizador 1492), 2,5 U de Taq DNA polimerase (Sigma), tampão 1x (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl pH 8,4), 0,2 mg de BSA (albumina de soro bovino).

A PCR-1 foi conduzida em termociclador (Bio-Rad T100™ Thermal Cycler) programado para realizar desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguido de 35 ciclos a 94°C por 20 seg, 53°C por 40 seg, 72°C por 40 seg e com extensão final de 72°C por 7 min. O produto da PCR foi corado com GelRed™ 20x aplicado em gel de agarose 1 % (p/v), submetido a eletroforese de 70 V por 40 min e observado sobre luz ultravioleta. Para cada amostra, dois fragmentos de DNA foram observado, correspondendo a 1090 pb e 735 pb referentes ao DNA mitocondrial e bacteriano respectivamente, posteriormente o gel foi fotodocumentado (Loccus Biotecnologia).

Em seguida, a PCR-2 específica para aplicar na técnica do DGGE foi realizada, visando amplificar a região V3 do gene 16S RNAr, a partir do produto amplificado na PCR-1 mencionada anteriormente. A reação da PCR-2 foi realizada para volume final de 50 µL, contendo 1 µL da amostra (20 ng), 0,4 µM de ambos primers U968GC (5'- grampo CG+ AACGCGAAGAACCTTAC-3') e

1378 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3'), 5 µL de tampão 10x com MgCl<sub>2</sub> (Sigma), 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeos trifosfato, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Sigma), tampão 1x (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl pH 8,4), 1 % de formamida.

A amplificação do fragmento do gene 16S RNAr foi realizada em termociclador (Bio-Rad T100™ Thermal Cycler) com desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguido de 35 ciclos a 94°C por 1 min, 56°C por 1 min, 72°C por 1 min e extensão final de 72 °C por 10 min. As amostras amplificadas foram coradas com GelRed™ 20x, aplicadas em gel de agarose 1 % (p/v), submetidas a corrente de 70 Volts por 40 min e observadas sobre luz ultravioleta. A presença e o tamanho do gene bacteriano amplificado, 410 bp, foi certificado e fotodocumentado (Loccus Biotecnologia).

Para análise em DGGE, os amplicons (300 ng) da última PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida 6 % (p/v) (30 % Acrilamida/Bis-acrilamida 37:1 m:m) com gradiente desnaturante linear de 45 % a 65 % formado pela combinação de formamida e uréia (solução desnaturante de 100 % contendo 30 % de formamida e 7 M de uréia). A corrente elétrica aplicada foi de 70 V por 16 horas a uma temperatura constante de 60°C sob Dcode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Inc., Hercules, USA) em tampão de corrida TAE 0,5X. Após a eletroforese, o gel foi submerso na solução de GelRed™ em TAE 0,5x (concentração) por 40 min e fotodocumentado (Loccus Biotecnologia).

A partir dos géis fotodocumentados foi realizado a normalização das imagens e dos fragmentos de 16S RNAr (bandas) no programa BioNumerics versão 7.1 (Applied Maths, Sint Martens Latem, Bélgica) e gerados os dendrogramas de similaridade.

### **3.7.2 Composição da comunidade bacteriana do solo**

#### **3.7.2.1 Preparo das amostras para sequenciamento do gene 16S rRNA**

Para determinar a composição bacteriana do solo foram selecionados seis tratamentos: 1-Floresta Plantada (F); 2-Lavoura (L); 3-Pecuária (P); 6-Integração Lavoura Floresta Plantada (ILF); 7-Integração Pecuária Floresta Plantada (IPF); 10-Integração Lavoura Pecuária Floresta Plantada (ILPF) e

área de referência- Mata Nativa (Mata), com suas respectivas repetições para ano de 2012 nas duas épocas, totalizando 56 amostras.

As amostras de DNA total foram extraídas como descrito anteriormente, liofilizadas e, posteriormente, determinada a qualidade e quantidade de DNA por espectrofotometria em NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc), a fim de estipular concentração de 20 ng de DNA por amostra.

A reação de PCR foi realizada com volume final de 50  $\mu$ L, contendo 25  $\mu$ L GoTaq<sup>®</sup> Colorless Master Mix 2x (Taq Buffer pH 8.5, 400  $\mu$ M dATP, 400  $\mu$ M dGTP, 400  $\mu$ M dCTP, 400  $\mu$ M dTTP e 3 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,5  $\mu$ L de cada primer 10  $\mu$ M (341F: 5'- 3' e 806R: 5'-GGA CTA CVS GGG TAT CTA AT-3' contendo sequências únicas de barcode) região alvo V3 –V4 do gene bacteriano 16S RNAr (CAPORASO et al., 2012) e 22  $\mu$ L de água ultra pura esterilizada. Posteriormente, as amostras foram amplificadas em termociclador (Mastercycler<sup>®</sup> Thermal cyclers Eppendorf) com a temperatura inicial desnaturante a 95°C por 3 min, 25 ciclos a 95°C por 45 s, 53 C por 30 s, 73°C por 1 min e 30 s para amplificação e 73°C por 10 min para a etapa final de extensão. Ao final, 56 barcodes únicos e respectivos para cada amostra conteve os fragmentos alvos como pré-requisito para a tecnologia Illumina (Illumina, Inc., CA, USA).

O tamanho esperado do fragmento a ser amplificado ( $\pm$  450 pb) foi verificado em gel de agarose 1 % dissolvido em tampão 0,5 X TBE, corado com brometo de etídeo 1 % e aplicado 3  $\mu$ L da amostra com 1  $\mu$ L corante carregador (Blue/Orange loading dye, 6x, Promega<sup>®</sup>). O gel de agarose foi submetido à corrente constante de 150 mA mantendo voltagem  $\pm$  65 V por 40 min. Confirmando o tamanho obtido do fragmento amplificado, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta e salvo a imagem em formato *jpg*.

A concentração de DNA obtida no produto da PCR foi quantificada em Qubit<sup>®</sup> 2.0 fluorometro com o kit: double strand (ds) DNA High Sensivity (HS) Assay (Life Technology<sup>™</sup>) para DNA com fita dupla e de alta qualidade. Foi estipulado 40 ng de DNA em cada amostra, a fim de minimizar a variabilidade do resultado no tamanho das sequências e garantir o alto desempenho do sequenciamento.

### 3.7.2.2 Classificação taxonômica das sequências obtidas

As amostras foram sequenciadas pelo laboratório Interdisciplinary Center for Biotechnology Research (ICBR) na Universidade da Flórida com o sequenciador da tecnologia Illumina sob a plataforma MiSeq.

Para cada amostra foram gerados milhares de sequências dispostas em duas sequências paeradas, cada uma contendo 300 pb. No entanto, uma delas sempre no sentido 3'- 5' como descrito por Fagen et al. (2012). A análise e filtragem das sequências com qualidade relevante para sua identificação taxonômica foram realizadas através de ferramentas computacionais, disponível gratuitamente na internet <https://github.com/Bioinfo-Tools/> e [http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/).

Primeiramente, as sequências foram convertidas para o sentido 5'-3' e unidas às sua respectiva sequência pareada, obtendo em cada tratamento sequências com tamanho de 600 pb. As sequências foram separadas, conforme os respectivos marcadores de cada amostra, considerando erro de até duas pb em cada marcador e removido os respectivos marcadores.

Em seguida, a qualidade das sequências foram filtradas conforme critério de qualidade utilizado pela tecnologia Illumina, ou seja, 99 % de chance de obter um par de base errada (*Phred quality score*) e mantido pelo menos 70 % destas contendo este critério. Sequências-controle, referentes ao vírus (phiX), adicionadas pela tecnologia Illumina foram identificadas e excluídas (ILLUMINA, 2013). As sequências filtradas foram convertidas do formato FASTq para FASTA (EWING et al., 1998).

Para obter a classificação taxonômica completa de cada sequência, o contraste das mesmas foi realizado com a base de dados online, SILVA (2014), através de nova versão paralela de alta performance do BLAST, o MPI-blastn (DIAS et al., 2014), responsável por localizar e adicionar o respectivo identificador taxonômico em cada sequência para posteriormente ser obtido a classificação taxonômica completa por meio do programa SILVA-taxcollector, versão adaptada do algoritmo utilizado pelo NCBI-taxcollector (<https://github.com/Bioinfo-Tools/SILVA-taxcollector>).

Por fim, o padrão de similaridade para os níveis taxonômicos foi no mínimo de 80 % para domínio e filo, 90 % para ordem, classe e família, 95 % para gênero e 99 % para espécies. Do total das sequências identificadas, para

cada táxon uma matriz de frequência foi criada utilizando programa modificado Megaclust e transpassada a informação na forma de tabela, contendo as respectivas Unidades Taxonômicas Operacionais (“Operational Taxons Units - OTUs”) juntamente com o auxílio do Megaclustable, ambos os programas disponíveis em <https://github.com/Bioinfo-Tools/PANGEA-plus> (GIONGO et al., 2010).

### 3.8 Análises estatísticas

Os dados de contagens de bactérias totais não atenderam aos pressupostos para realização da análise de variância (normalidade e homogeneidade de variâncias). Os valores de UFC foram transformados em logaritmo decimal e expressos em log UFC/g solo seco e após atendido os pressupostos os dados foram submetidos à análise de variância, considerando a época de coleta como parcela subdividida.

As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey (5 %) e feito uma comparação entre grupos de tratamentos através de contrastes ortogonais: sistemas monocultivos vs sistemas integrados (C1 = F + L + P vs IP-L + IL-P + ILF + IPF + ILF-IPF + IPF-ILF + ILPF); sistemas monocultivos vs sistemas integrados com um e dois componentes (C2 = F + L + P vs IP-L + IL-P + ILF + IPF); sistemas monocultivos vs sistemas integrados com dois e três componentes (C3 = F + L + P vs ILF-IPF + IPF-ILF + ILPF); sistemas integrados com dois componentes vs sistemas integrados com três componentes (C4 = IP-L + IL-P + ILF + IPF vs ILF-IPF + IPF-ILF + ILPF); sistemas integrado com Pastagem vs sistemas integrados com Lavoura (C5 = IP-L + IPF vs IL-P + ILF); sistema monocultivo de pastagem vs sistema integrado com pastagem (C6 = P vs IP-L + IPF); sistema monocultivo Pastagem vs sistema integrado com Pastagem (C7 = P vs P-L + IPF + IPF-ILF); sistema monocultivo Floresta vs sistemas integrados (C8 = F vs ILF + IPF + ILF-IPF + IPF-ILF + ILPF); sistema monocultivo Lavoura vs sistemas integrados (C9 = L vs ILF + IPF + ILF-IPF + IPF-ILF + ILPF).

A matriz de similaridade foi gerada para as repetições dos tratamentos em cada período com o coeficiente de correlação de Pearson e representada por dendrogramas pelo método da ligação da média não ponderada (“UPGMA

– unweighted pair group with average arithmetic linkage method”) através do programa BioNumerics versão 7.1 (Applied Maths, Sint Martens Latem, Bélgica)

Para os dados de metagômica as análises foram realizadas através do programa R (R Development Core Team, 2011) com os pacotes Vegan, gplots, MASS, proto, ggplot2 e do programa XLSTAT-Pro 2011 (Addinsoft's core software).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Unidades formadoras de colônias de bactérias (UFCs)

Para o número de UFCs de bactérias totais do solo (Tabela 2), houve diferença para bloco, tratamentos e época, porém não houve interação entre tratamentos e épocas de avaliação, indicando o efeito independente entre as duas fontes de variação.

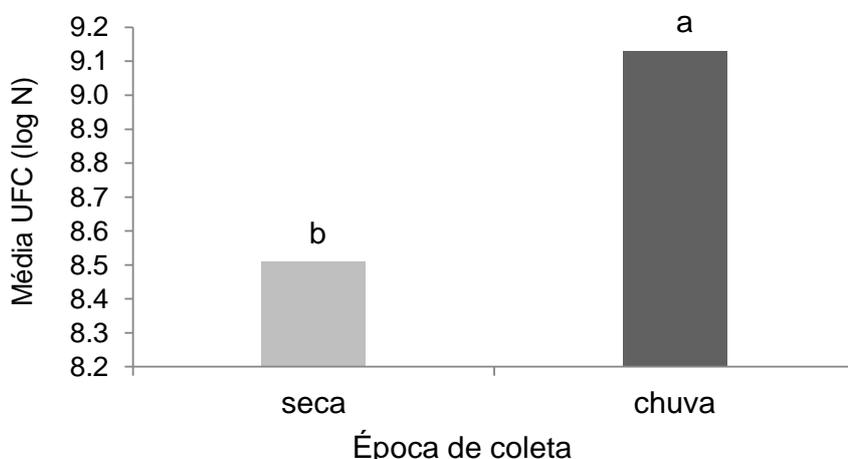
**TABELA 2.** Análise de variância de Unidades Formadoras de Colônias em sistemas agrícolas avaliados nos períodos de chuva e seca no ano de 2012.

<b>FV</b>	<b>GI</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Bloco	3	0,564	0,188	6,71	0,002**
Tratamento (T)	9	0,688	0,076	2,73	0,021**
Erro (a) experimento	27	0,756	0,028		
Epoca (E)	1	7,798	7,798	222,01	0,000**
E*T	9	0,217	0,024	0,69	0,715
Erro (b) coleta	30	1,054	0,035		
Total	79	11,078	0,140		
Média			8,82		
<sup>a</sup> CV %			1,9 (53,7)		
<sup>b</sup> CV %			2,1 (60,1)		

<sup>a</sup>: Erro associado ao delineamento experimental e <sup>b</sup>: erro associado ao período de coletas. \*: valor do coeficiente de variação sem transformação em Log. \*\*: resultado significativo a  $p \leq 0,05$ .

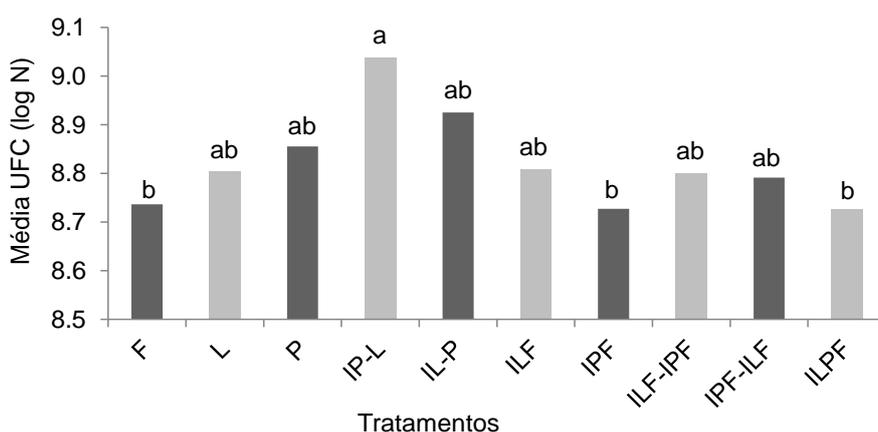
A diferença entre as épocas revela que a maior densidade de bactérias totais cultiváveis ocorreu no período de chuva com valores de log de 9,13 UFCs/g de solo seco e menor no período de seca com 8,51 UFCs/g de solo

seco (Figura 5). Esse comportamento foi o mesmo independente dos tratamentos.



**FIGURA 5.** Relação de unidades formadoras de colônia de bactérias (log UFC/g de solo seco) em função da época de coleta, em 2012. Letras iguais nas colunas indicam que não há diferença entre as épocas de coleta pelo teste de Tukey (5 %).

Por isso, a comparação entre as médias de UFCs entre os tratamentos foi analisado isoladamente independente do período. O maior valor de UFC foi observado no IP-L (9,04) e menores para Floresta (8,74), IPF (8,73) e ILPF (8,73) (Figura 6.).



**FIGURA 6.** Média dos valores de unidades formadoras de colônia de bactérias totais do solo sob sistemas agrícolas (log UFC/g de solo seco) em função dos sistemas de produção independente da época. Tratamentos: Floresta (F); Lavoura (L); Pastagem (P); integração Pastagem – Lavoura (IP-L); integração Lavoura – Pastagem, (IL-P); integração Lavoura Floresta (ILF); integração Pastagem Floresta (IPF); integração Lavoura Floresta e integração Pastagem Floresta (ILF – IPF); integração Pastagem Floresta e integração Lavoura Floresta (IPF – ILF); integração Lavoura Pastagem Floresta (ILPF). Letras iguais nas colunas indicam que não há diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey (5%).

Na comparação entre sistemas de monocultivo (Floresta, Lavoura, Pastagem) *versus* sistemas integrados (IP-L, IL-P, ILF e IPF) no contraste (C2) a diferença foi de 10 % de probabilidade (Tabela 3). Quanto ao contraste C4, sistemas integrados com Lavoura (IL-P e ILF) e Pastagem (IP-L e IPF) *versus* os sistemas integrados (ILF-IPF, IPF-ILF e ILPF) a diferença foi a 3 % de probabilidade. Os demais contrastes não diferiram.

**TABELA 3.** Quadrados médios da análise de variância (QM) dos contrastes (C1 a C9) entre o número de unidades formadoras de colônias de bactérias (log UFC/g de solo seco).

Contraste	QM	p
C1 - (F + L + P) <i>vs</i> (IP-L + IL-P + ILF + IPF+ ILF-IPF+ IPF-ILF + ILPF)	0,02	0,43
C2 -(F + L+ P) <i>vs</i> (IP-L + IL-P+ ILF+ IPF)	0,08	0,10
C3 - (F+ L+ P) <i>vs</i> (ILF-IPF + IPF-ILF + ILPF)	0,01	0,60
C4 - (IP-L + IL-P + ILF + IPF) <i>vs</i> (ILF-IPF + IPF-ILF + ILPF)	0,14	0,03
C5 - (IP-L + IPF) <i>vs</i> (IL-P + ILF)	0,00	0,79
C6 (P) <i>vs</i> (IP-L + IPF)	0,00	0,71
C7 - (P) <i>vs</i> (IP-L + IPF + IPF-ILF)	0,00	0,96
C8 - (F) <i>vs</i> (ILF + IPF + ILF-IPF + IPF-ILF + ILPF)	0,01	0,60
C9 - (L) <i>vs</i> (ILF + IPF + ILF-IPF + IPF-ILF + ILPF)	0,00	0,86
Média	8,82	
CV % (a)	1,9 (57,3) <sup>*</sup>	
CV % (b)	2,1 (60,1) <sup>*</sup>	

Erro associado ao delineamento experimental (a) e coletas (b). <sup>\*</sup>: valor do coeficiente de variação sem transformação em Log. Tratamentos: Floresta (F); Lavoura (L); Pastagem (P); integração Pastagem – Lavoura (IP-L); integração Lavoura – Pastagem, (IL-P); integração Lavoura Floresta (ILF); integração Pastagem Floresta (IPF); integração Lavoura Floresta e integração Pastagem Floresta (ILF – IPF); integração Pastagem Floresta e integração Lavoura Floresta (IPF – ILF); integração Lavoura Pastagem Floresta (ILPF).

A UFC das áreas de referência, Mata e Pousio, comparadas com os tratamentos pelo teste de *t* (student) na época chuvosa demonstrou que a Mata diferiu do IP-L a 10 % de probabilidade, com maior média para o sistema integrado (Tabela 4). O Pousio diferiu entre os tratamentos Pastagem ( $p \leq 0,02$ ), IP-L ( $p \leq 0,00$ ), IL-P ( $p \leq 0,08$ ), ILF ( $p \leq 0,04$ ), IPF ( $p \leq 0,01$ ), ILF-IPF ( $p \leq 0,05$ ) e ILPF ( $p \leq 0,05$ ), sempre apresentando menor média de UFC em relação aos tratamentos. Ao comparar as duas áreas de referência entre si,

houve diferenças significativas com maior média para a Mata ( $p \leq 0,06$ ). Na época de seca não houve diferença entre tratamentos e áreas de referências.

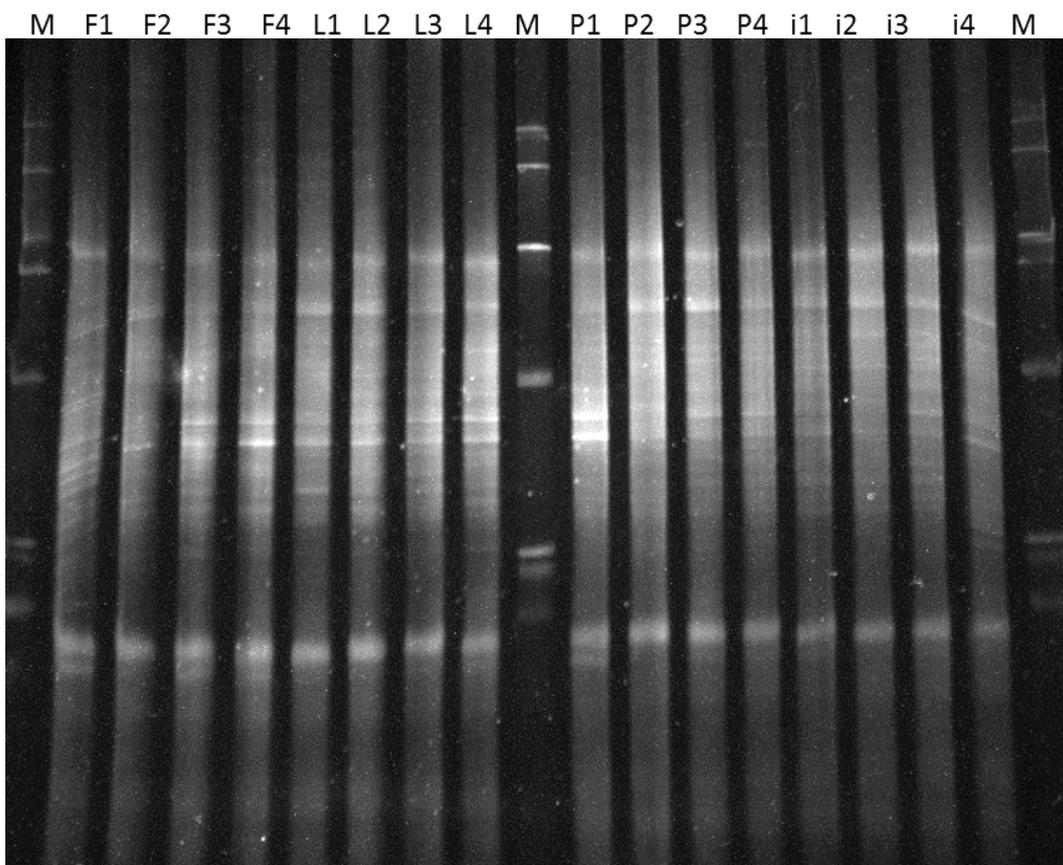
**TABELA 4.** Comparação do número de unidades formadoras de colônia de bactérias (log UFC/g solo seco) através do teste *t* entre tratamentos e áreas de referência (mata e pousio) na chuva.

Tratamentos	Média UFC (Log)	Mata	Pousio
		Valor p	
Floresta	9,04	0,80	0,32
Lavoura	9,11	0,86	0,36
Pastagem	9,22	0,39	0,02
IP-L	9,30	0,10	0,00
IL-P	9,15	0,75	0,08
ILF	9,08	0,73	0,04
IPF	9,14	0,37	0,01
ILF-IPF	9,14	0,52	0,05
IPF-ILF	9,10	0,87	0,22
ILPF	9,06	0,77	0,05
Pousio	8,77	0,06	-
Mata	8,98	-	0,06

Tratamentos: integração Pastagem – Lavoura (IP-L); integração Lavoura – Pastagem, (IL-P); integração Lavoura Floresta (ILF); integração Pastagem Floresta (IPF); integração Lavoura Floresta e integração Pastagem Floresta (ILF – IPF); integração Pastagem Floresta e integração Lavoura Floresta (IPF – ILF); integração Lavoura Pastagem Floresta (ILPF). Área de referência: Pousio e Mata Nativa.

#### 4.2 Estrutura da comunidade bacteriana do solo sob sistemas agrícolas

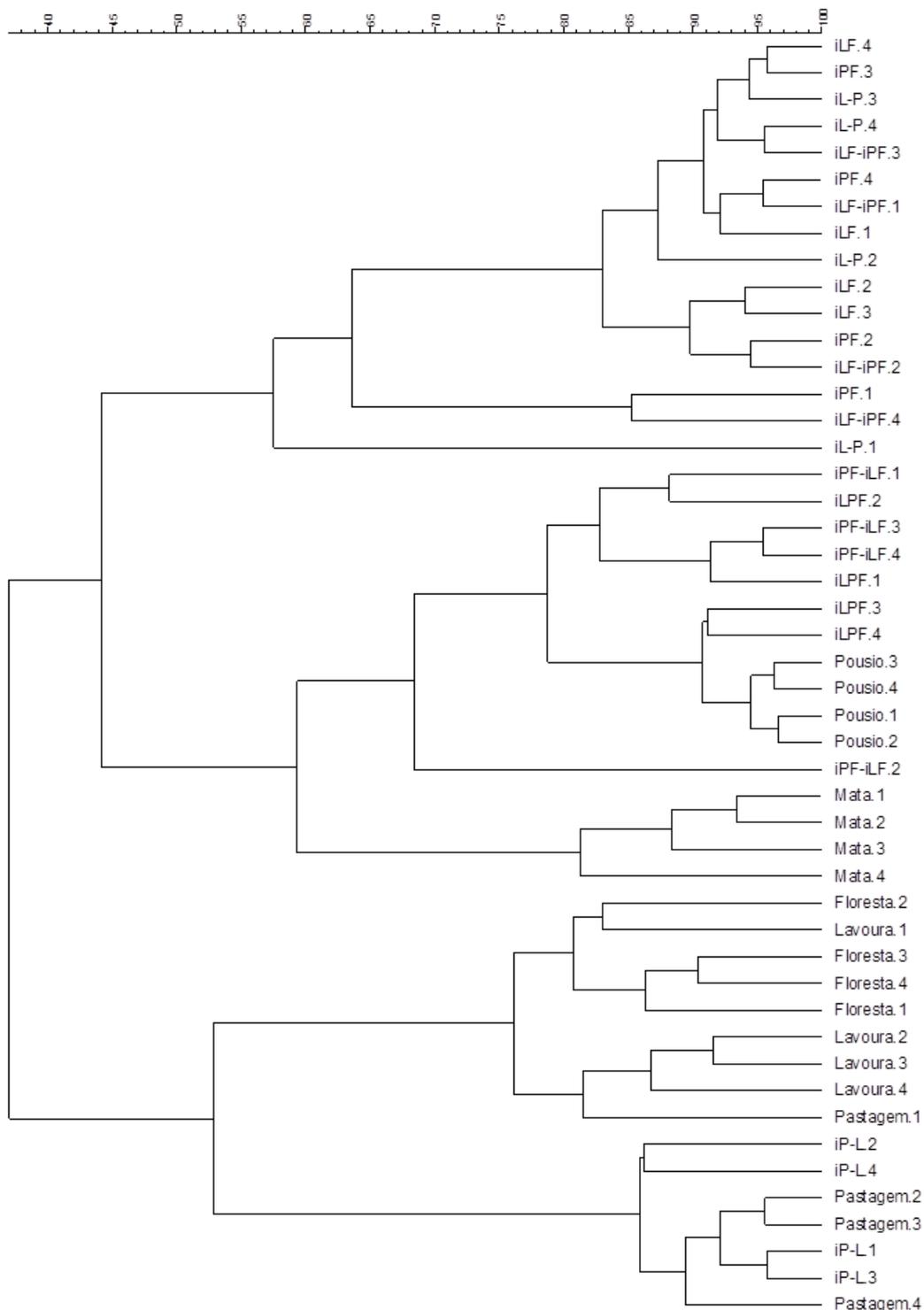
A estrutura das comunidades bacterianas obtidas através de gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante está representada na Figura 7. Cada canaleta contém a réplica de cada tratamento, sendo possível observar visualmente o perfil de bandas formadas ao longo do gel. Cada banda representa o fragmento do 16S RNAr para a espécie de bactéria amplificada. O mesmo procedimento foi realizado para as demais repetições assim como para as áreas de referências.



**FIGURA 7.** Imagem do DGGE com perfil de bandas obtido com amostras de solo coletas nos períodos de chuva sob sistemas agrícolas. M: Marcador molecular, F(1-4): Floresta, L(1-4): Lavoura, P(1-4): Pastagem e i(1-4): integração IP-L (Pastagem – Lavoura).

A comparação dentre as repetições dos tratamentos foi realizada pela correlação de Pearson a partir de uma matriz de similaridade baseada no perfil densitométrico das bandas e posteriormente agrupando os tratamentos com maior similaridade pelo método de UPGMA.

A técnica de PCR-DGGE diferenciou a composição das comunidades bacterianas do solo para todos sistemas avaliados (Figuras 8. e 9.). O dendrograma analisado no período de chuva formou dois grupos distantes entre si com 38 % de similaridade, em que os sistemas de monocultivo, Floresta, Lavoura, Pastagem e o IP-L foram agrupados com similaridade de 55 % e o outro ramo conteve os sistemas integrados e áreas de referências com 45 % de similaridade. No entanto, as áreas de referência e o ILPF foram agrupados entre si com 60 % de similaridade e os demais tratamentos também foram similares com a mesma distância de 60 % (Figura 8.).



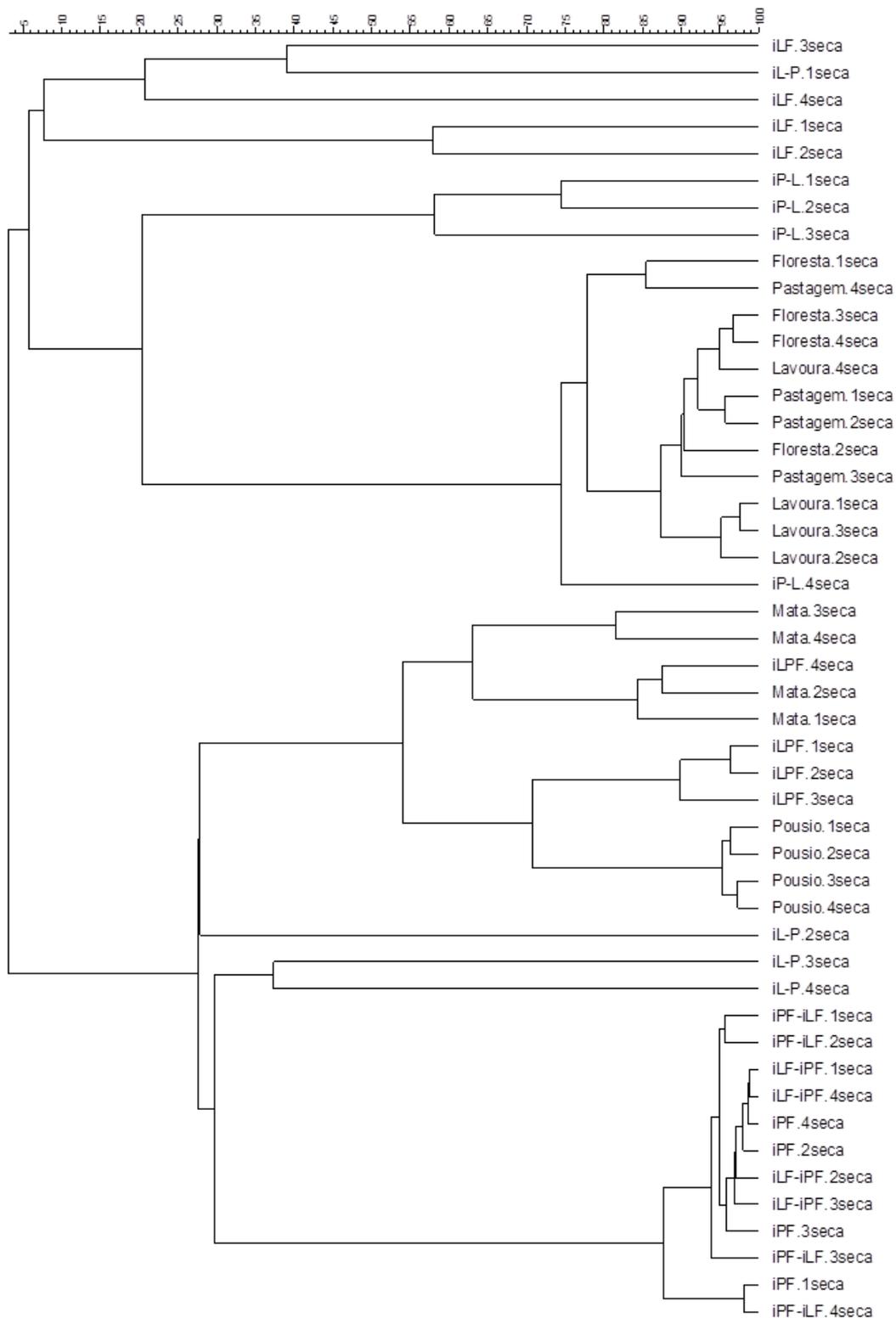
**FIGURA 8.** Tratamentos agrupados conforme a similaridade do perfil estrutural das comunidades bacterianas do solo por PCR-DGGE durante o período de chuva. Dendrograma obtido através do coeficiente de Pearson e método UPGMA. Repetição dos tratamentos 1, 2, 3 e 4. Tratamentos: integração Pastagem – Lavoura (IP-L); integração Lavoura – Pastagem, (IL-P); integração Lavoura Floresta (ILF); integração Pastagem Floresta (IPF); integração Lavoura Floresta e integração Pastagem Floresta (ILF – IPF); integração Pastagem Floresta e integração Lavoura Floresta (IPF – ILF); integração Lavoura Pastagem Floresta (ILPF). Áreas de referência: Pousio e Mata Nativa.

Para o período de seca, o dendrograma manteve dois grupos distintos a 4 % de similaridade. As áreas de referências e ILPF se mantiveram agrupadas com IL-P, ILF-IPF, IPF e IPF-ILF com 30 % de similaridade. No outro ramo, os sistemas exclusivos de monocultura permaneceram agrupados com 75 % de similaridade entre si, distando com 20 % de similaridade do IP-L e 12 % dos demais tratamentos.

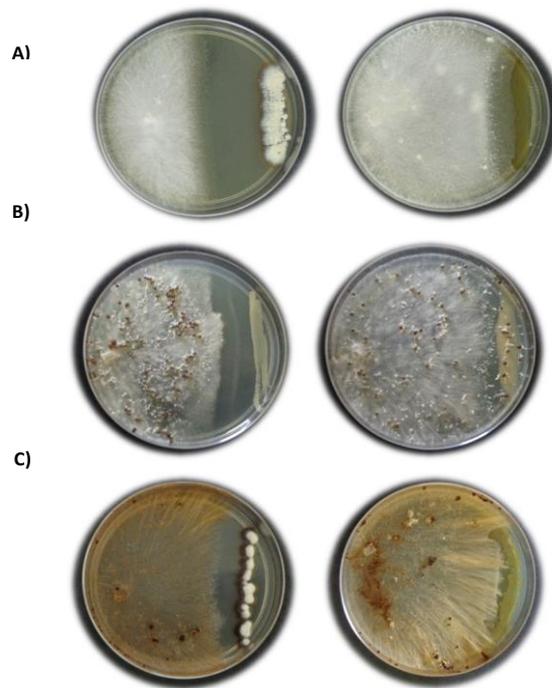
#### **4.3 Isolados bacterianos com potencial biotecnológico**

O teste *in vitro* realizado com a metodologia pareada proporcionou a detecção de isolados positivos e negativos facilmente, devido a observação da presença de halo de inibição formada pelo isolado bacteriano contra o crescimento do fitopatógeno, podendo assim identificar o potencial biotecnológico dos isolados bacterianos em controlar os respectivos fitopatógenos, *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. e *Sclerotium rolfsii* (Figura 10).

De todos os isolados bacterianos testados (240) com possível potencial antagônico aos fitopatógenos *Rhizoctonia* sp. *Fusarium* sp. e *Sclerotium rolfsii* realizado por teste *in vitro*, 29 isolados (12,08 %) foram positivos no período de chuva e 50 (20,83 %) no período de seca.

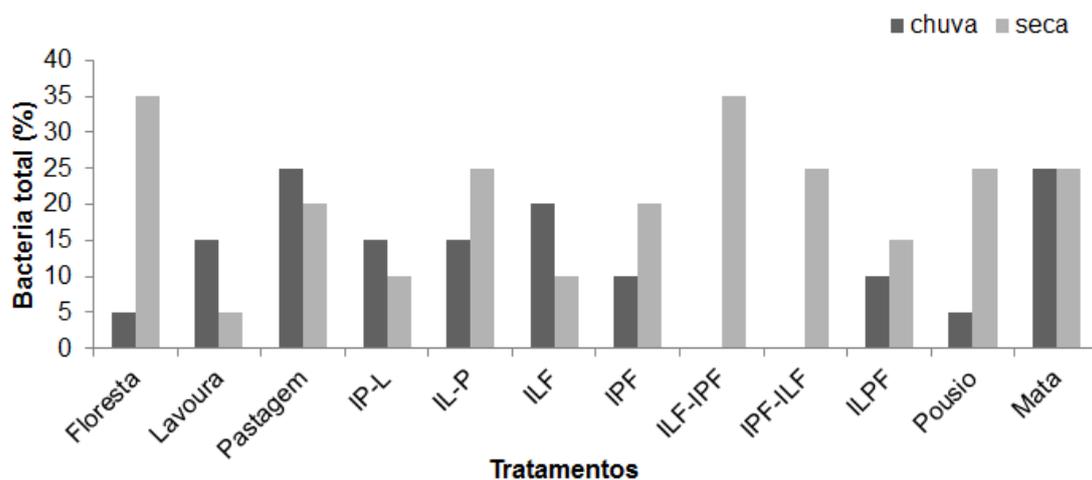


**FIGURA 9.** Tratamentos agrupados conforme a similaridade do perfil estrutural das comunidades bacterianas do solo por PCR-DGGE durante o período de seca. Dendrograma obtido através do coeficiente de Pearson e método UPGMA. Repetição dos tratamentos 1, 2, 3 e 4. Tratamentos: integração Pastagem – Lavoura (IP-L); integração Lavoura – Pastagem, (IL-P); integração Lavoura Floresta (ILF); integração Pastagem Floresta (IPF); integração Lavoura Floresta e integração Pastagem Floresta (ILF – IPF); integração Pastagem Floresta e integração Lavoura Floresta (IPF – ILF); integração Lavoura Pastagem Floresta (ILPF). Áreas de referência: Pousio e Mata Nativa.



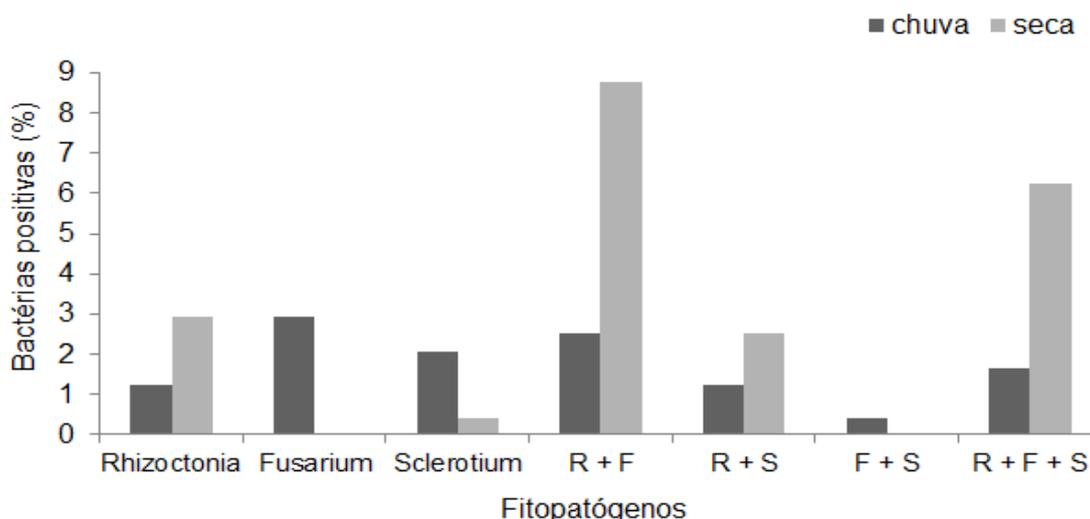
**FIGURA 10.** Imagem do teste *in vitro* do controle biológico pelo método pareado em meio de cultura TSA 10 % de isolados bacterianos com potencial biotecnológico. Placas à esquerda indicam resultados positivos pela formação do halo de inibição e à direita resultado negativo. **A)** Fitopatógeno *Fusarium* sp., **B)** Fitopatógeno *Sclerotium rolfsii*, **C)** Fitopatógeno *Rhizoctonia* sp.

Os isolados positivos encontrados sob os sistemas avaliados diferiram entre as épocas avaliadas (teste  $t$   $p \leq 0,00$ ) (Figura 11). Na época chuva, os tratamentos de maior porcentagem de isolados positivos foram encontrados sob Pastagem e Mata (25 %), menores sob Floresta e Pousio (5 %) e nenhum isolado sob ILF-IPF e IPF-ILF. Diferentemente, na seca as maiores porcentagens foram observados sob os tratamentos Floresta e ILF-IPF (35 %) e menor sob Lavoura (5 %).



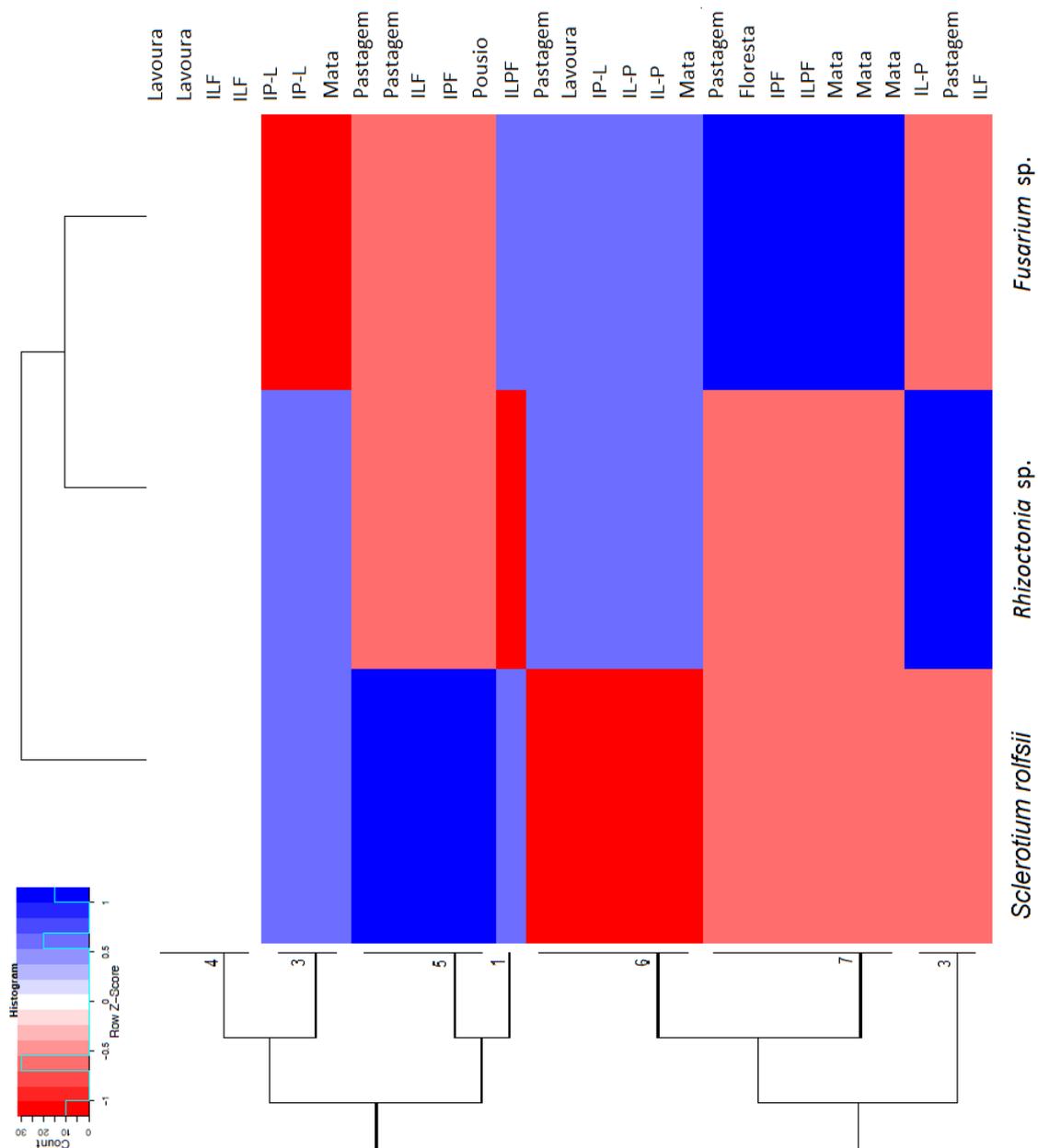
**FIGURA 11.** Porcentagem de bactérias antagônicas aos patógenos (*Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. e *Sclerotium rolfsii*) por tratamento nas respectivas épocas de coleta, chuva e seca. Tratamentos: integração Pastagem – Lavoura (IP-L); integração Lavoura – Pastagem, (IL-P); integração Lavoura Floresta (ILF); integração Pastagem Floresta (IPF); integração Lavoura Floresta e integração Pastagem Floresta (ILF – IPF); integração Pastagem Floresta e integração Lavoura Floresta (IPF – ILF); integração Lavoura Pastagem Floresta (ILPF). Área de referência: Pousio e Mata Nativa.

Ao considerar a porcentagem total de isolados capazes de controlar determinado patógeno (Figura 12), nota-se que na época da chuva não houve destaque dentre as maiores porcentagens no controle dos patógenos, no entanto, o maior valor foi observado sob *Fusarium* sp. (2,92 %) e o menor para ambos os patógenos *Fusarium* e *Sclerotium rolfsii* (0,42 %). Já na época da seca, os isolados capazes de controlar *Rhizoctonia* e *Fusarium* apresentam a maior porcentagem (8,75 %) seguido de isolados capazes de controlar os três patógenos (6,25 %) e o menor para *Sclerotium* (0,42 %).



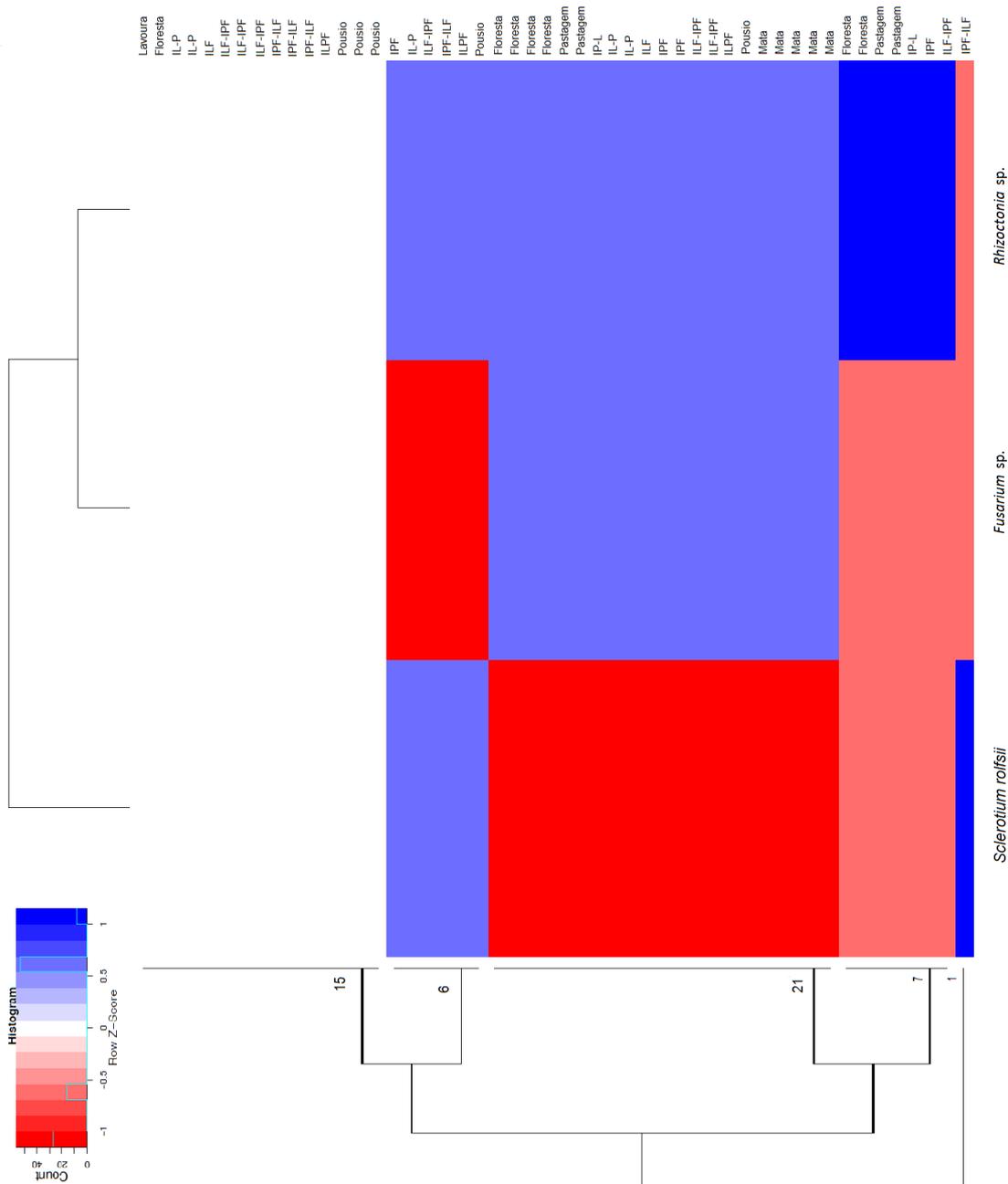
**FIGURA 12.** Porcentagem dos isolados bacterianos antagonísticos no controle dos fitopatógenos nos períodos de coleta. R: *Rhizoctonia* sp., F: *Fusarium* sp. e S: *Sclerotium rolfsii*.

A relação de cada bactéria com sua capacidade de controlar um ou mais fitopatógeno durante a época da chuva está representada no dendrograma agrupados em sete ramos da Figura 13. Cada ramo agrupou isolados com a mesma resposta de controle contra os fitopatógenos testados, onde quatro bactérias tiveram a capacidade de controlar os três fitopatógenos isolados dos tratamentos Lavoura e ILF, três controlaram *Rhizoctonia* sp. e *Sclerotium rolfsii* isolados do IP-L e Mata, cinco controlaram *Sclerotium rolfsii* provenientes dos tratamentos Pastagem, ILF e Pousio, um isolado controlou *Fusarium* sp. e *Sclerotium rolfsii* do ILPF, seis controlaram *Rhizoctonia* sp. e *Fusarium* sp. de Pastagem, Lavoura, IP-L, IL-P e Mata, sete controlaram somente *Fusarium* sp. dos tratamentos Pastagem, Floresta, IPF, ILPF e Mata, e três controlaram *Rhizoctonia* sp. do IL-P, Pastagem e ILF. Do total de bactérias antagonísticas isoladas por tratamento, o maior número foi encontrada na área de Mata com cinco bactérias, seguido pela Pastagem com quatro, Lavoura, IP-L e ILF com três isolados, IL-P, IPF e ILPF com dois e Floresta e Pousio com apenas um isolado bacteriano.



**FIGURA 13.** Dendrograma representado por escala colorimétrica a similaridade do efeito antagonístico dos vinte e nove isolados bacterianos positivos aos fitopatógenos *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia sp.*, *Fusarium sp* em seu respectivo tratamento na chuva. Tratamentos: integração Pastagem – Lavoura (IP-L); integração Lavoura – Pastagem, (IL-P); integração Lavoura Floresta (ILF); integração Pastagem Floresta (IPF); integração Lavoura Floresta e integração Pastagem Floresta (ILF – IPF); integração Pastagem Floresta e integração Lavoura Floresta (IPF – ILF); integração Lavoura Pastagem Floresta (ILPF). Área de referência: Pousio e Mata Nativa (Mata).

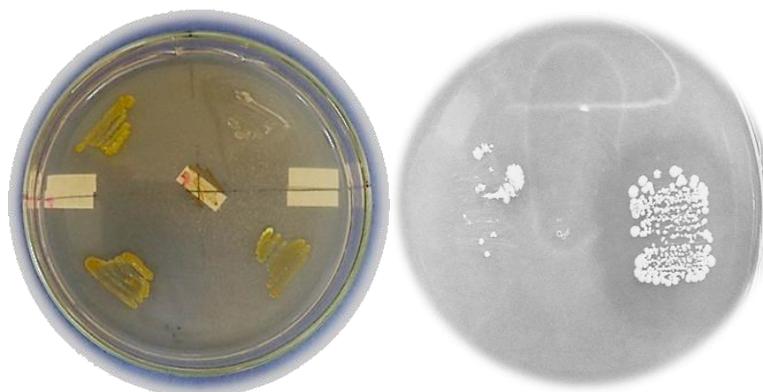
Da mesma forma foi realizado para o período de seca, em que a relação de cada bactéria com sua capacidade de controlar um ou mais fitopatógeno está representada no dendrograma agrupados em cinco ramos (figura 14). Cada ramo representa isolados que possuem a mesma resposta de controle biológico contra os fitopatógenos testados, onde quinze conseguiram controlar os três patógenos provenientes dos tratamentos Lavoura, Floresta, IL-P, ILF, ILF-IPF, IPF-ILF, ILPF e Pousio, seis controlaram *Rhizoctonia* e *Sclerotium rolfsii* dos tratamentos IL-P, IPF, ILF-IPF, IPF-ILF e ILPF, 21 controlaram *Rhizoctonia* sp. e *Fusarium* sp. de dez tratamentos exceto na Lavoura e IPF-ILF, sete controlaram somente *Rhizoctonia* sp. para os tratamentos Floresta, Pastagem, IP-L, IPF, ILF-IPF e o último ramo contendo apenas um isolado no controle do *S. rolfsii* no tratamento IPF-ILF. Do total de bactérias antagônicas isoladas por tratamento, o maior número foi encontrado sob a área de Floresta e ILF-IPF com sete isolados, seguido pela IL-P, Pousio e Mata com cinco isolados, quatro na Pastagem e IPF, três no ILPF, dois no IP-L e ILF e apenas um único isolado sob a Lavoura.



**FIGURA 14.** Dendrograma representado por escala colorimétrica a similaridade do efeito antagonístico dos cinquenta isolados bacterianos positivos aos fitopatógenos *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp em seu respectivo tratamento na seca. Tratamentos: integração Pastagem – Lavoura (IP-L); integração Lavoura – Pastagem, (IL-P); integração Lavoura Floresta (ILF); integração Pastagem Floresta (IPF); integração Lavoura Floresta e integração Pastagem Floresta (ILF – IPF); integração Pastagem Floresta e integração Lavoura Floresta (IPF – ILF); integração Lavoura Pastagem Floresta (ILPF). Área de referência: Pousio e Mata Nativa (Mata).

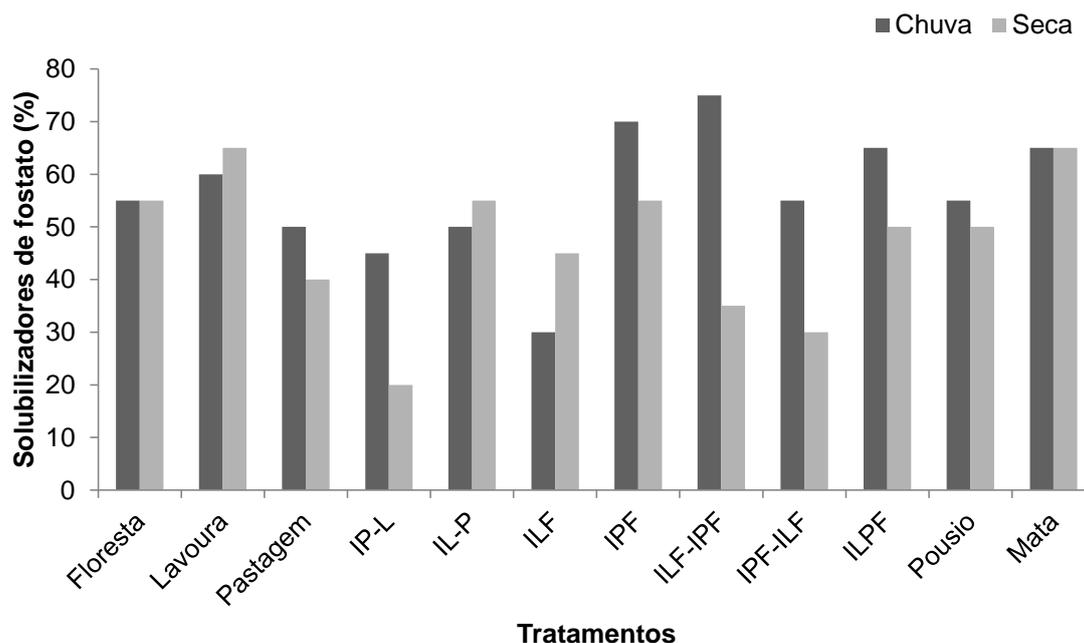
#### 4.4 Isolados bacterianos com capacidade solubilizadora de fosfato

Dos mesmos 240 isolados bacterianos testados com pontencial atangônico, 135 (56,25 %) e 113 (47,08 %) apresentaram potencial biotecnológico em solubilizar fosfato inorgânico ( $\text{CaHPO}_4$ ) na chuva e seca, respectivamente (Figura 15.).



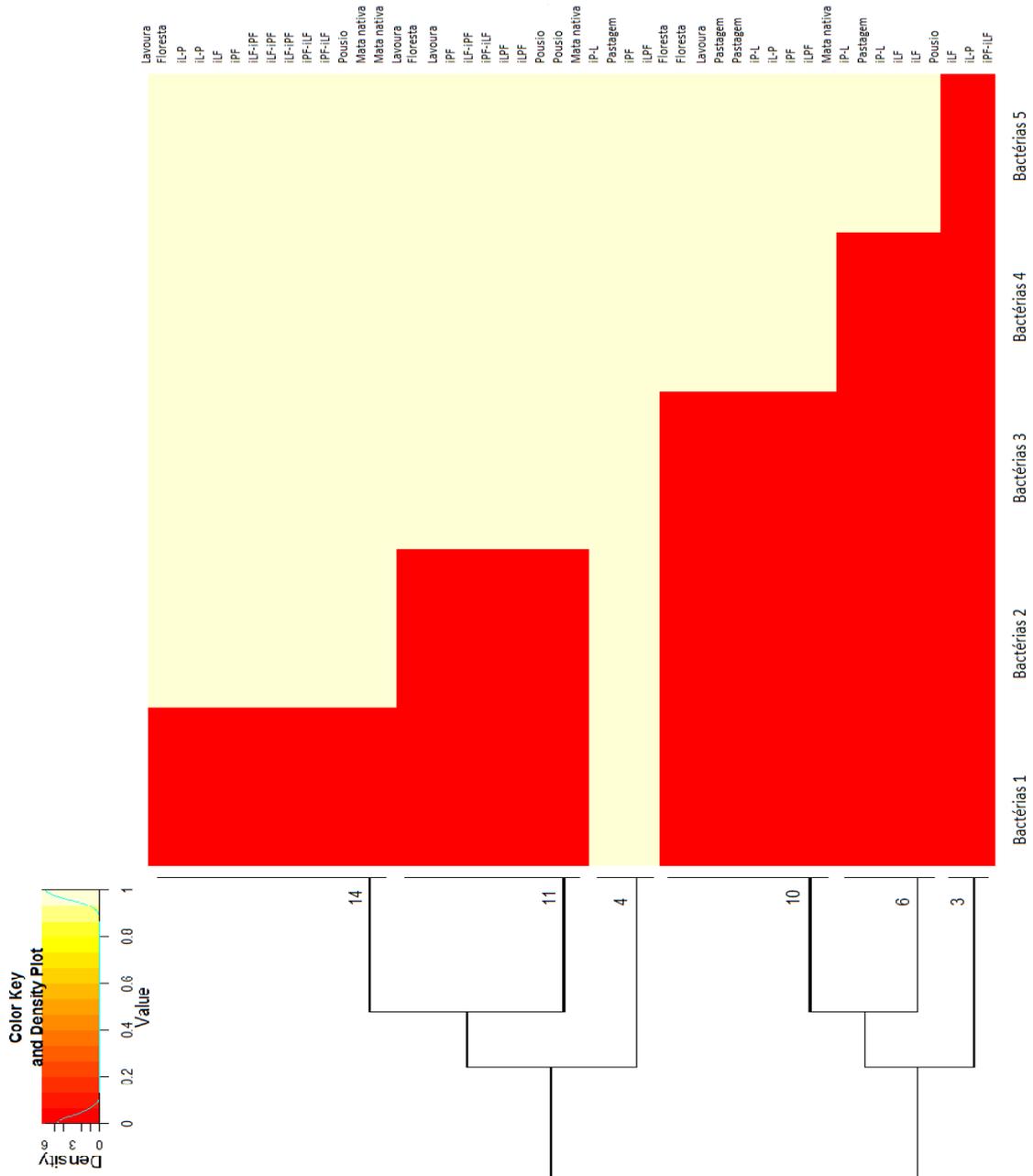
**FIGURA 15.** Teste *in vitro* de isolados bacterianos antagonistas com potencial em solubilizar fosfato inorgânico ( $\text{CaHPO}_4$ ) em meio específico. Imagem da esquerda representa o teste inicial com cinco isolados e na direita imagem ampliada com dois isolados, isolado negativo ao lado esquerdo e isolado positivo ao lado direito com a formação de halo de solubilização (imagem editada para evidenciar o halo).

O total de bactérias avaliadas sob os tratamentos apresentaram diferenças significativas entre as épocas (teste  $t p \leq 0,03$ ). Na época da chuva, foi possível observar maior relação de isolados positivos nos tratamentos ILF-IPF (75 %), intermediário no IPF (70 %) e igualmente entre ILPF e Mata (65 %). As menores porcentagens de solubilizadores de fosfato foi para o tratamento ILF (Figura 16.). Exclusivamente, a Mata manteve a mesma porcentagem de isolados positivos em ambas as épocas de coletada. No período de seca, o tratamento Lavoura apresentou maior porcentagem de solubilizadores com os mesmos valores aos da Mata. Os tratamentos com valores intermediários foram a Floresta, IL-P e IPF com 55 % e menor porcentagem para o tratamento IP-L.



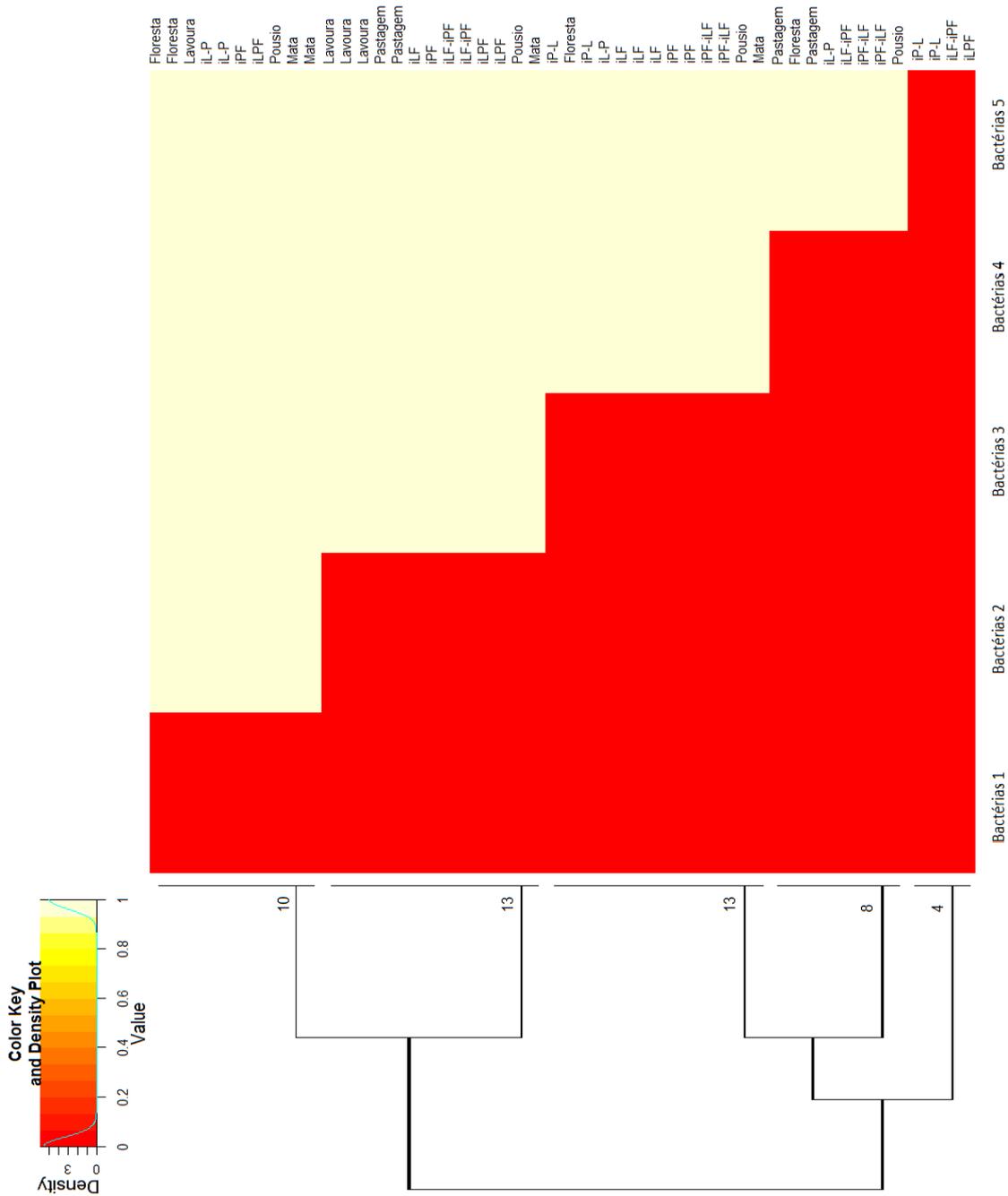
**FIGURA 16.** Porcentagem de bactérias capazes de solubilizar fosfato por tratamento em função da época coleta (Diferença significativa entre épocas,  $p \leq 0,03$ ). Tratamentos: integração Pastagem – Lavoura (IP-L); integração Lavoura – Pastagem, (IL-P); integração Lavoura Floresta (ILF); integração Pastagem Floresta (IPF); integração Lavoura Floresta e integração Pastagem Floresta (ILF – IPF); integração Pastagem Floresta e integração Lavoura Floresta (IPF – ILF); integração Lavoura Pastagem Floresta (ILPF). Áreas de referência: Pousio e Mata Nativa.

A resposta dos isolados bacterianos em solubilizar fosfato na época da chuva está representada no dendrograma da figura 17., tendo sido agrupado em seis ramos pela função das bactérias em solubilizar ou não fósforo. Dos cinco isolados testados nas quatro repetições de cada tratamento, 14 foram agrupadas por conterem quatro isolados com potencial solubilizador, 11 com três isolados, quatro com os cinco isolados, dez com dois isolados, seis com apenas um isolado e três com nenhum isolado positivo. O tratamento ILF-IPF conteve o maior número de isolados com total de quinze bactérias SF, seguido pelo IPF com 14 isolados, ILPF e Mata com 13 isolados, Lavoura com doze isolados, a Floresta, IPF-ILF e Pousio com onze isolados, a Pastagem e IL-P com dez isolados, IP-L com nove e o iL-F com seis isolados.



**Figura 17.** Dendrograma representando a capacidade solubilizadora de isolados bacterianos nos respectivos tratamentos no período de chuva. Os cinco isolados testados por tratamento estão descritos como: Bactérias 1, Bactérias 2, Bactérias 3, Bactérias 4 e Bactérias 5. Tratamentos: integração Pastagem – Lavoura (IP-L); integração Lavoura – Pastagem, (IL-P); integração Lavoura Floresta (ILF); integração Pastagem Floresta (IPF); integração Lavoura Floresta e integração Pastagem Floresta (ILF – IPF); integração Pastagem Floresta e integração Lavoura Floresta (IPF – ILF); integração Lavoura Pastagem Floresta (ILPF). Área de referência: Pousio e Mata Nativa (Mata).

Para a época da seca, a resposta do potencial biotecnológico dos isolados bacterianos avaliados em solubilizar fosfato está representada no dendrograma da figura 18., sendo agrupada em cinco ramos pela função das bactérias em solubilizar ou não fósforo. Dos cinco isolados testados para as 48 repetições de cada tratamento, 10 foram agrupadas por conterem quatro isolados com potencial solubilizador, 13 com três isolados, 13 com dois isolados, oito com somente um isolado e quatro com nenhum isolado positivo. Os tratamentos Lavoura e Mata Nativa foram os que apresentaram maior número de isolados positivos com total de treze bactérias SF, seguido pela Floresta, IL-P e IPF com onze isolados, o ILPF e Pousio com dez isolados, o ILF com nove isolados, a Pastagem com oito, o ILF-IPF com sete, o IPF-ILF com seis e o IP-L com quatro isolados.



**Figura 18.** Dendrograma representando a capacidade solubilizadora de isolados bacterianos nos respectivos tratamentos no período de Seca. Os cinco isolados testados por tratamento estão descritos como: Bactérias 1, Bactérias 2, Bactérias 3, Bactérias 4 e Bactérias 5. Tratamentos: integração Pastagem – Lavoura (IP-L); integração Lavoura – Pastagem, (IL-P); integração Lavoura Floresta (ILF); integração Pastagem Floresta (IPF); integração Lavoura Floresta e integração Pastagem Floresta (ILF – IPF); integração Pastagem Floresta e integração Lavoura Floresta (IPF – ILF); integração Lavoura Pastagem Floresta (ILPF). Área de referência: Pousio e Mata Nativa (Mata).

#### 4.5 Identificação taxonomica dos isolados positivos

Os isolados positivos antagonistas aos fitopatógenos e capazes de solubilizarem fosfato foram identificados e classificados taxonomicamente como descritos nas tabelas 5. e 6.

Na época da chuva todos os isolados foram pertencentes aos filos Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria. Apenas um isolado da Pastagem não apresentou similaridade suficiente para ser classificado taxonomicamente. Os demais isolados foram representados por seis gêneros, tendo sido classificados oito espécies únicas (Tabela 5.). Os gêneros mais abundantes em ordem decrescente foram *Burkholderia* com nove isolados, *Bacillus* com sete, *Streptomyces* com seis, *Paenibacillus* com três, *Pseudomonas* com dois e *Brevibacillus* com um isolado. Dois isolados classificados somente em nível de gênero, *Pseudomonas* sp. foi identificado exclusivamente nesta época sob o tratamento Pastagem e IPF. Foi possível observar oito espécies exclusivas, duas presentes na Lavoura *Streptomyces sporoverrucosus* e *Bacillus amyloliquefaciens*, duas no ILPF *Streptomyces phaeopurpureus* e *Streptomyces abikoensis*, uma na Pastagem *Bacillus safensis*, uma no IL-P *Brevibacillus brevis*, uma no ILF *Bacillus stratosphericus* e uma no IPF *Streptomyces crystallinus*. Nota-se que todos os isolados positivos foram contidos dentre dez tratamentos, permanecendo os tratamentos ILF-IPF e IPF-ILF sem algum isolados com potencial biotecnológico.

Na época da seca, além dos três filos presentes na chuva um quarto filo foi identificado, sendo do filo Nitrospira e isolado da Mata nativa. (Tabela 6). Os doze tratamentos apresentaram pelo menos um dos isolados com potencial em controlar os fitopatógenos e solubilizar fósforo. Além dos gêneros descritos na época da chuva, três outros foram inéditos na época da seca, *Streptococcus* no tratamento IPF, *Staphylococcus* no IPF-ILF e *Nitrospira* na Mata, sendo cada gênero representado por um único isolado. Sete isolados foram identificados como bactérias não cultiváveis e um não classificada. O gênero *Bacillus* foi classificado dentre dezesseis isolados, porém não estando presente nos tratamentos IP-L e ILPF. O gênero *Streptomyces* foi representado por nove isolados presente nos tratamentos Floresta, IP-L, IL-P, IPF, ILF-IPF, IPF-ILF e ILPF. O gênero *Burkholderia* entre oito isolados e presentes nos tratamentos Pastagem, ILF-IPF, IPF-ILF, Pousio e Mata. O gênero *Paenibacillus* conteve

quatro isolados sob os tratamentos Floresta, Pastagem, Pousio e Mata. E, o gênero *Brevibacillus* com dois isolados nos tratamentos Floresta e ILPF.

De todos os isolados positivos, dezesseis não se repetem, ou seja foram idifenticados uma única vez (Tabela 7.). Desses, quatro isolados foram isolados na chuva e classificados como *Streptomyces sporoverrucosus* isolado na Lavoura, *Brevibacillus brevis* no IL-P, *Bacillus stratosphericus* no ILF e *Streptomyces crystallinus* no IPF. Na seca, de dozes isolados, três foram classificados como *Paenibacillus peoriae*, *Streptomyces avellaneus* e *Bacillus cereus* todos no tratamento Floresta, um isolado *Streptomyces bungoensis* no IL-P, outro no IPF como *Streptococcus* sp., *Burkholderia metallica* no ILF-IPF, dois como *Staphylococcus epidermidis* e *Streptomyces luteovorticillatus* no IPF-ILF, e o isolado *Brevibacillus agri* no ILPF, porém este apresentando somente o potencial antagônico, o isolado *Burkholderia cenocepacia* no Pousio e na Mata o *Nitrospira* sp. e o *Paenibacillus aestuarii*.

**TABELA 5.** Classificação taxonômica de 29 isolados bacterianos, com potencial biotecnológico *in vitro* em controlar fitopatógenos *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. ou *Sclerotium rolfsii* e solubilizar fosfato (CaHPO<sub>4</sub>), de solo sob sistemas integrados no ecótono Cerrado Amazônia durante período de chuva.

(Continua)

Tratamento	Isolado	Filo	Gênero	Espécie	%*	Táxon de referência**
Floresta	25.2	Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>	99	KJ634149.1
	26.11	Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>sporoverrucosus</i>	97	KC508633.1
Lavoura	21.12	Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>abikoensis</i>	91	KC954556.1
	26.2	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>amyloliquefaciens</i>	94	EF094506.1
	2.2	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>safensis</i>	89	JX126862.1
	2.1	Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	sp.	84	KJ729599.1
Pastagem	11.4	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>pumilus</i>	81	HM756474.1
	30.4	Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>abikoensis</i>	98	KC954556.1
	30.5	----- Similaridade não encontrada -----				
	29.5	Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>	sp.	98	KJ672507.1
IP-L	10.6	Firmicutes	<i>Paenibacillus</i>	sp	97	LC020522.1
	15.3	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>safensis</i>	96	LC015558.1
	34.1	Firmicutes	<i>Brevibacillus</i>	<i>brevis</i>	98	KJ735916.1
IL-P	34.10	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>pumilus</i>	91	EF029070.1
	34.11	Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>	94	KJ634149.1

**TABELA 5.** Classificação taxonômica de 29 isolados bacterianos, com potencial biotecnológico *in vitro* em controlar fitopatógenos *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. ou *Sclerotium rolfsii* e solubilizar fosfato (CaHPO<sub>4</sub>), de solo sob sistemas integrados no ecótono Cerrado Amazônia durante período de chuva.

(Conclusão)

Tratamento	Isolado	Filo	Gênero	Espécie	%*	Táxon de referência**
ILF	9.4	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>safensis</i>	91	KF835724.1
	14.8	Firmicutes	<i>Paenibacillus</i>	<i>polymyxa</i>	98	EU741059.1
	22.7	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>stratosphericus</i>	93	KJ621593.1
	22.1	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	99	KJ736013.1
IPF	27.8	Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>crystallinus</i>	99	KM067119.1
	18.4	Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	sp.	90	FJ527671.1
ILPF	26.7	Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>abikoensis</i>	84	KC954556.1
	8.4	Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>	sp.	91	KC987404.1
	21.5	Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>phaeopurpureus</i>	90	KC466283.1
Pousio	44.11	Firmicutes	<i>Paenibacillus</i>	<i>polymyxa</i>	90	AY359621.1
	46.12	Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>	sp.	92	GU479034.1
Mata	47.10	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	99	KJ736013.1
	46.1	Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>	sp.	98	GU479034.1
	47.1	Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>	sp.	93	AF247494.1

Similaridade da sequência do isolado com sequência de referência depositada na base de dados do NCBI/Blastn. \*\* Código da sequência referência disponível no NCBI. Tratamentos: integração Pastagem – Lavoura (IP-L); integração Lavoura – Pastagem, (IL-P); integração Lavoura Floresta (ILF); integração Pastagem Floresta (IPF); integração Lavoura Floresta e integração Pastagem Floresta (ILF – IPF); integração Pastagem Floresta e integração Lavoura Floresta (IPF – ILF); integração Lavoura Pastagem Floresta (ILPF). Área de referência: Pousio e Mata nativa (Mata).

**TABELA 6.** Classificação taxonômica de 50 isolados bacterianos, com potencial biotecnológico *in vitro* em controlar fitopatógenos *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. ou *Sclerotium rolfsii* e solubilizar fosfato (CaHPO<sub>4</sub>), de solo sob sistemas integrados no ecótono Cerrado Amazônia durante período de seca.

(Continua)

Tratamento	Isolado	Filo	Gênero	Espécie	%*	Táxon de referência**
	6.10	-----	Bactéria não cultivada	-----	85	HM111767.1
	25.9	-----	Bactéria não cultivada	-----	84	KF841905.1
Floresta	25.5	Firmicutes	<i>Paenibacillus</i>	<i>peoriae</i>	85	NR_117739.1
	32.7	Firmicutes	<i>Brevibacillus</i>	<i>brevis</i>	89	JX490070.1
	19.9	Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>phaeopurpureus</i>	92	KC466283.1
	25.7	Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>avellaneus</i>	97	GU350496.1
	32.10	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i>	97	KP224309.1
Lavoura	31.5	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	89	KJ124577.1
	40.5	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>pumilus</i>	97	HM172502.1
Pastagem	11.12	Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>	95	KJ634149.1
	30.3	Firmicutes	<i>Paenibacillus</i>	sp.	99	LC020522.1
	2.11	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>safensis</i>	93	KP261071.1
IP-L	29.2	Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	sp.	84	AB847904.1
	10.12 <sup>▲</sup>	Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>abikoensis</i>	99	KC954556.1
IL-P	34.5	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>subitillis</i>	82	AB634827.1
	34.12	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	sp.	85	KF228923.1
	3.6	Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>bungoensis</i>	99	KM370028.1
	3.10	-----	Bactéria não classificada	-----	100	JQ607855.1
	3.11	Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>abikoensis</i>	86	KC954556.1

**TABELA 6.** Classificação taxonômica de 50 isolados bacterianos, com potencial biotecnológico *in vitro* em controlar fitopatógenos *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. ou *Sclerotium rolfsii* e solubilizar fosfato (CaHPO<sub>4</sub>), de solo sob sistemas integrados no ecótono Cerrado Amazônia durante período de seca.

(Continuação)

Tratamento	Isolado	Filo	Gênero	Espécie	%*	Táxon de referência**
ILF	22.1	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	95	AP011541.2
	39.5	-----	Bactéria não cultivada	-----	77	KF088528.1
IPF	36.11	Firmicutes	<i>Streptococcus</i>	sp.	78	HQ051504.1
	36.12	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	96	KM246509.1
	1.10	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>safensis</i>	95	KP261071.1
	27.6	-----	Bactéria não cultivada	-----	94	EU790031.1
ILF-IPF	7.10	Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>abikoensis</i>	98	KC954556.1
	16.7	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	97	KJ736013.1
	24.9 <sup>▲</sup>	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>safensis</i>	92	KP261071.1
	16.1	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	98	EU862558.1
	16.5	Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>	<i>metallica</i>	93	JX133238.1
	16.9	-----	Bactéria não cultivada	-----	90	KF109649.1
	16.12	-----	Bactéria não cultivada	-----	93	JX013304.1
IPF-ILF	4.6	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>pumilus</i>	93	HQ164544.1
	28.11	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	89	JQ045774.1
	38.9	Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>	sp.	99	KJ672506.1
	4.10	Firmicutes	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	100	KM874438.1
	4.11	Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>luteovorticillatus</i>	98	NR_118282.1

**TABELA 6.** Classificação taxonômica de 50 isolados bacterianos, com potencial biotecnológico *in vitro* em controlar fitopatógenos *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. ou *Sclerotium rolfsii* e solubilizar fosfato (CaHPO<sub>4</sub>), de solo sob sistemas integrados no ecótono Cerrado Amazônia durante período de seca.

(Conclusão)

Tratamento	Isolado	Filo	Gênero	Espécie	%*	Táxon de referência**
ILPF	37.7 <sup>▲</sup>	Firmicutes	<i>Brevibacillus</i>	<i>agri</i>	84	FJ715821.1
	8.1	Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	sp.	95	CP003987.1
	21.11	-----	Bactéria não cultivada	-----	97	KC887986.1
Pousio	44.11	Firmicutes	<i>Paenibacillus</i>	<i>polymyxa</i>	91	EU741059.1
	41.3	Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>	<i>cenocepacia</i>	98	FJ232612.1
	42.7	Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>	99	JF927933.1
	42.2	Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>	96	FJ232612.1
	43.6	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>amyloliquefaciens</i>	96	GU122948.1
	46.7	Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>	sp.	99	GU479034.1
Mata	45.11	Nitrospira	<i>Nitrospira</i>	sp.	85	JF833528.1
	45.10	Firmicutes	<i>Paenibacillus</i>	<i>aestuarii</i>	99	NR_116365.1
	45.6	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>pumilus</i>	92	KJ542381.1
	45.5	Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>	sp.	98	GU479034.1

<sup>▲</sup>: Isolado sem potencial solubilizador. \*Similaridade entre a sequência do isolado com a sequência depositada na base de dados do NCBI - Blastn. \*\* Código da sequência de referência disponível no NCBI. Tratamentos: integração Pastagem – Lavoura (IP-L); integração Lavoura – Pastagem, (IL-P); integração Lavoura Floresta (ILF); integração Pastagem Floresta (IPF); integração Lavoura Floresta e integração Pastagem Floresta (ILF – IPF); integração Pastagem Floresta e integração Lavoura Floresta (IPF – ILF); integração Lavoura Pastagem Floresta (ILPF). Área de referência: Pousio e Mata nativa (Mata).

**TABELA 7.** Isolados exclusivos com potencial biotecnológico *in vitro* em controlar os fitopatógenos *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. ou *Sclerotium rolfsii* e solubilizar fosfato (CaHPO<sub>4</sub>), comparado entre as duas estações de chuva e seca.

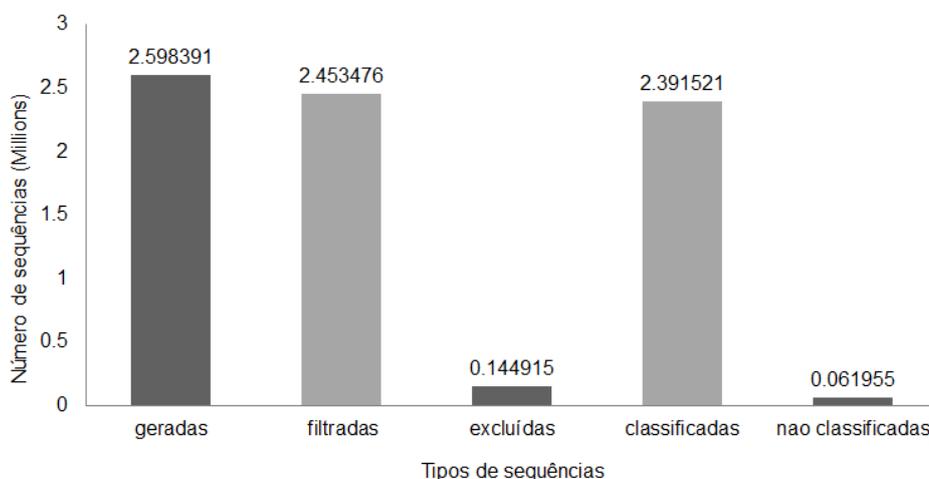
Tratamento	Isolado	Filo	Gênero	Espécie	%*	Táxon de referência**
CHUVA						
Lavoura	26.11	Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>sporoverrucosus</i>	97	KC508633.1
IL-P	34.1	Firmicutes	<i>Brevibacillus</i>	<i>brevis</i>	98	KJ735916.1
ILF	22.7	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>stratosphericus</i>	93	KJ621593.1
IPF	27.8	Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>crystallinus</i>	99	KM067119.1
SECA						
Floresta	25.5	Firmicutes	<i>Paenibacillus</i>	<i>peoriae</i>	85	NR_117739.1
	25.7	Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>avellaneus</i>	97	GU350496.1
	32.1	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i>	97	KP224309.1
IL-P	3.6	Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>bungoensis</i>	99	KM370028.1
IPF	36.11	Firmicutes	<i>Streptococcus</i>	<i>sp.</i>	78	HQ051504.1
ILF-IPF	16.5	Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>	<i>metallica</i>	93	JX133238.1
IPF-ILF	4.1	Firmicutes	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	100	KM874438.1
	4.11	Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>luteovorticillatus</i>	98	NR_118282.1
ILPF	37.7 <sup>▲</sup>	Firmicutes	<i>Brevibacillus</i>	<i>agri</i>	84	FJ715821.1
Pousio	41.3	Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>	<i>cenocepacia</i>	98	FJ232612.1
Mata	45.11	Nitrospira	<i>Nitrospira</i>	<i>sp.</i>	85	JF833528.1
	45.1	Firmicutes	<i>Paenibacillus</i>	<i>aestuarii</i>	99	NR_116365.1

<sup>▲</sup>: Isolado sem potencial solubilizador. \*Similaridade entre a sequência do isolado com a sequência depositada na base de dados do NCBI - Blastn. \*\*Código da sequência de referência disponível no NCBI. Tratamentos: integração Lavoura – Pastagem, (IL-P); integração Lavoura Floresta (ILF); integração Pastagem Floresta (IPF); integração Lavoura Floresta e integração Pastagem Floresta (ILF – IPF); integração Pastagem Floresta e integração Lavoura Floresta (IPF – ILF); integração Lavoura Pastagem Floresta (ILPF). Área de referência: Pousio e Mata nativa (Mata)

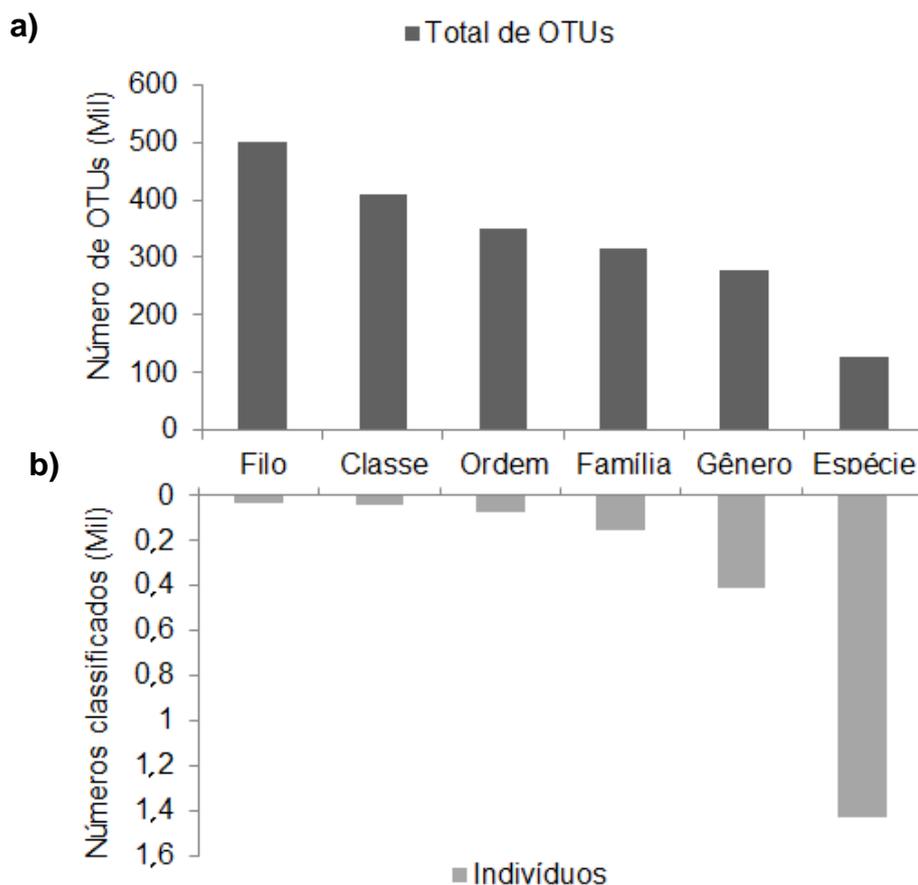
#### 4.6 Composição e flutuação da comunidade bacteriana

Do total de sequências geradas pelo MiSeq para as 56 amostras de seis tratamentos e área de Mata nativa, 5,58 % (144,915) foram excluídas por não apresentarem a qualidade mínima aceitável. Dentre as sequências mantidas, 97,47 % (2.391,521) foram identificadas dentro dos níveis taxonômicos (Figura 19.).

Das sequências classificadas, as frequências de OTUs diminuíram conforme os sete graus de classificação taxonômica (Domínio, Filo, Classe, Família, Ordem, Gênero e Espécie) e contrariamente à quantidade de indivíduos classificados por táxons aumentou (Figura 20.). Ao nível Domínio, foram obtidos dois domínios com 2.172,432 e 3,564 OTUs referente a Bacteria e Archaea, respectivamente, e, o número de indivíduos distribuídos entre esses domínios dentro dos outros táxons foi de 33 filós, 45 classes, 72 ordens, 150 famílias, 414 gêneros e 1,427 espécies.

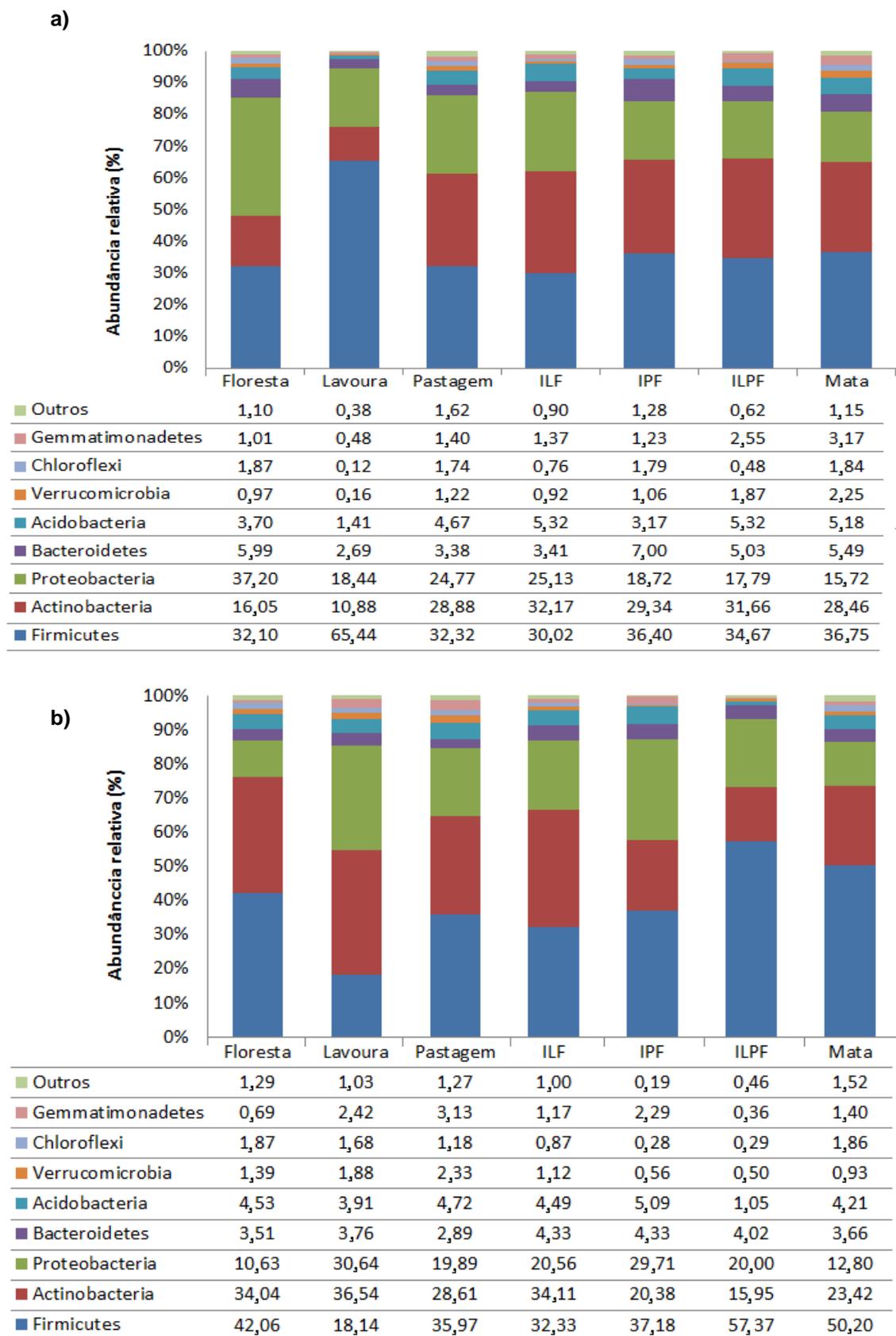


**FIGURA 19.** Relação do número de sequências geradas pelo sequenciador MiSeq (Illumina™) e classificadas, após etapa de exclusão por parâmetros de qualidade e identificação por similaridade na base de dados.



**FIGURA 20.** Relação do número de OTUs gerados pelo sequenciador Miseq de amostras sob seis sistemas agrícolas e mata nativa em função de indivíduos classificados (a) e para cada nível taxonômico (b).

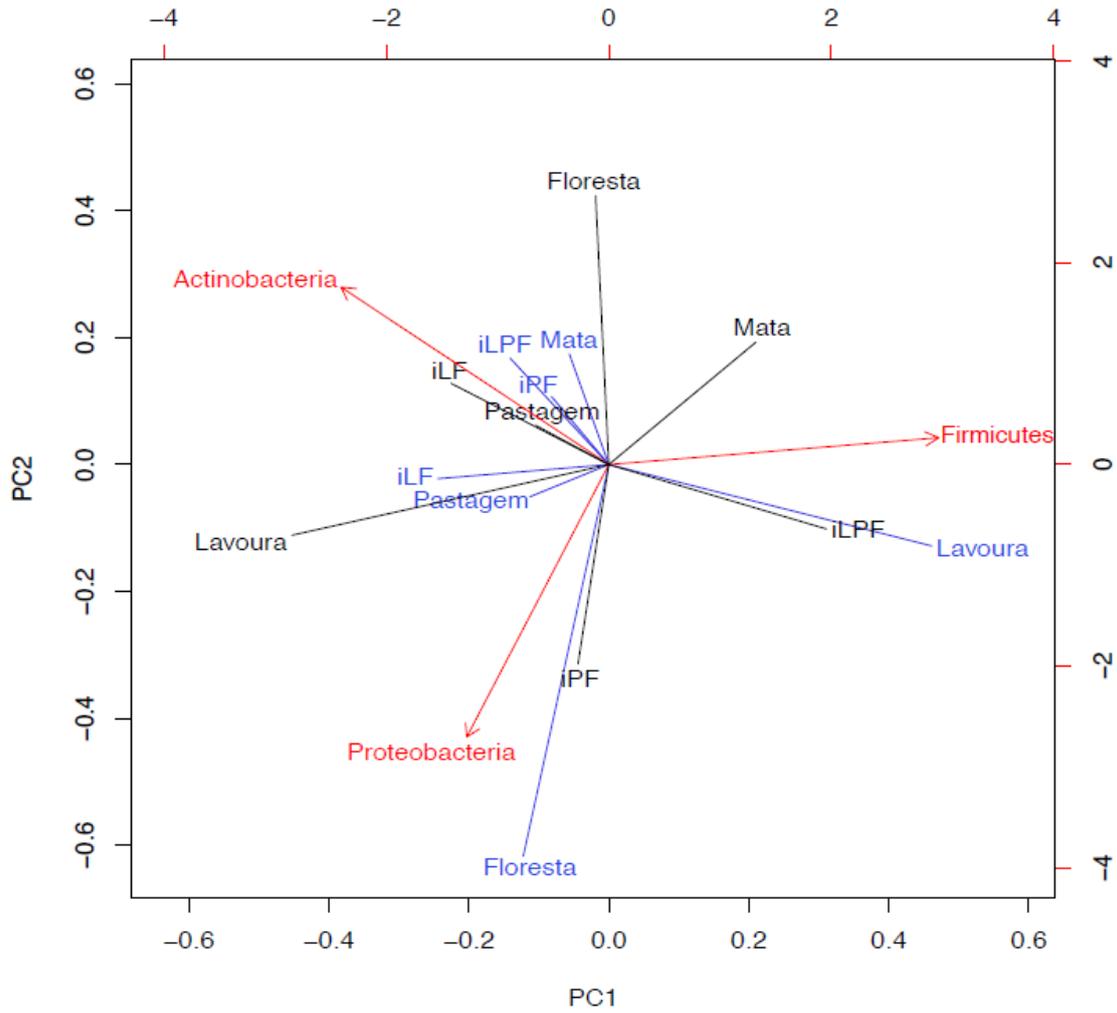
Ao comparar as abundâncias relativas dentre os 33 filios, não se observou diferença entre os tratamentos nas respectivas épocas. No entanto, independente do tratamento e época, os filios Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria foram sempre predominantes com as maiores médias de abundância relativa, seguido por cinco filios, com abundâncias acima de 1 %, Bacteroidetes, Acidobacteria, Gemmatimonadetes, Verrucomicrobia e Chloroflexi. Ao final, esses filios compuseram abundância de 98,99 % na chuva e 99,04 % na seca (Figura 21.).



**Figure 21.** Abundância relativa média à nível de filo acima de 1 %. Estações **a)** chuvosa e **b)** seca. Tratamentos: Floresta monoespecífico de eucalipto (F), Lavoura (L), Pastagem (P), integração Lavoura Floresta (ILF); integração Pastagem Floresta (IPF); integração Lavoura Pastagem Floresta (ILPF). Área de referência de Mata Nativa (M).

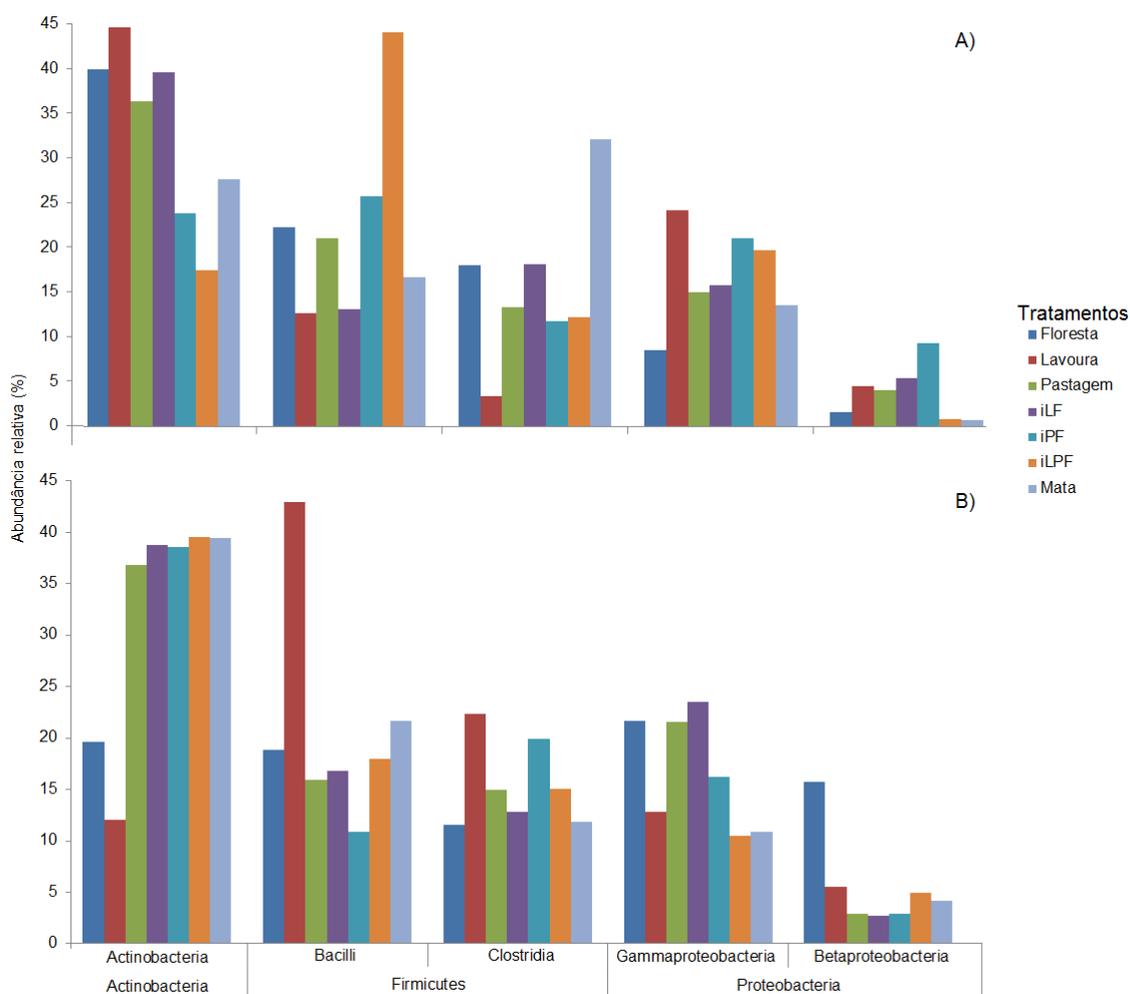
Os 25 filos restante, que representam menos de 1 %, foram observados com médias  $\leq 0,99$  % em ordem decrescente foram os filos Planctomycetes, Nitrospirae, Cyanobacteria, Euryarchaeota, Synergistetes, Deinococcus-Thermus, Thermotogae, Chlorobi, Chlamydiae, Spirochaetes, Armatimonadetes, Tenericutes, Thermodesulfobacteria, Elusimicrobia, Deferribacteres, Hydrogenedentes, Parcubacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Candidatus Saccharibacteria, Dictyoglomi, Gracilibacteria, Omnitrophica, Nitrospinae e Microgenomates (Figura 21.).

Correlacionando os três filos dominantes com os tratamentos em ambos os períodos, nota-se que a maioria dos tratamentos se correlacionaram com o Actinobacteria (Figura 22.). Para o filo Firmicutes a correlação prevaleceu para a Mata em ambos os períodos, para a época da seca correlacionou com Floresta e ILPF e na chuva com a Lavoura. O filo Proteobacteria correlacionou com a Pastagem e Floresta na chuva e com o IPF na seca.



**FIGURA 22.** Análise de componentes principais (ACP) entre os três filos mais abundantes (Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria) correlacionados com os seis tratamentos e área de referência. Tratamentos: Floresta: cultivo monoespecífico, integração Lavoura Floresta (iLF); integração Pastagem Floresta (iRF); integração Lavoura Pastagem Floresta (iLPF); área de referência de mata nativa (Mata). Linha com a coloração azul representa o período de chuva e na cor preta o período de seca.

Ao analisar a distribuição da comunidade bacteriana do solo ao nível das classes correspondentes aos três filios Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria, as classes com maior abundância relativa foram *Actinobacteria* (média 32,47 %), seguido de *Bacilli* (21,50 %), *Gammaproteobacteria* (16,82 %), *Clostridia* (15,56 %) e *Betaproteobacteria* (4,70 %) independente da época (Figura 23.).



**FIGURA 23.** Distribuição das classes mais abundantes com seu respectivo filo (Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria) em cada tratamento na época da chuva (A) e seca (B). Tratamentos: Floresta: cultivo monoespecífico, integração Lavoura Floresta (iLF); integração Pastagem Floresta (iPF); integração Lavoura Pastagem Floresta (iLPF); área de referência de mata nativa (Mata). Estações a) chuvosa e b) seca.

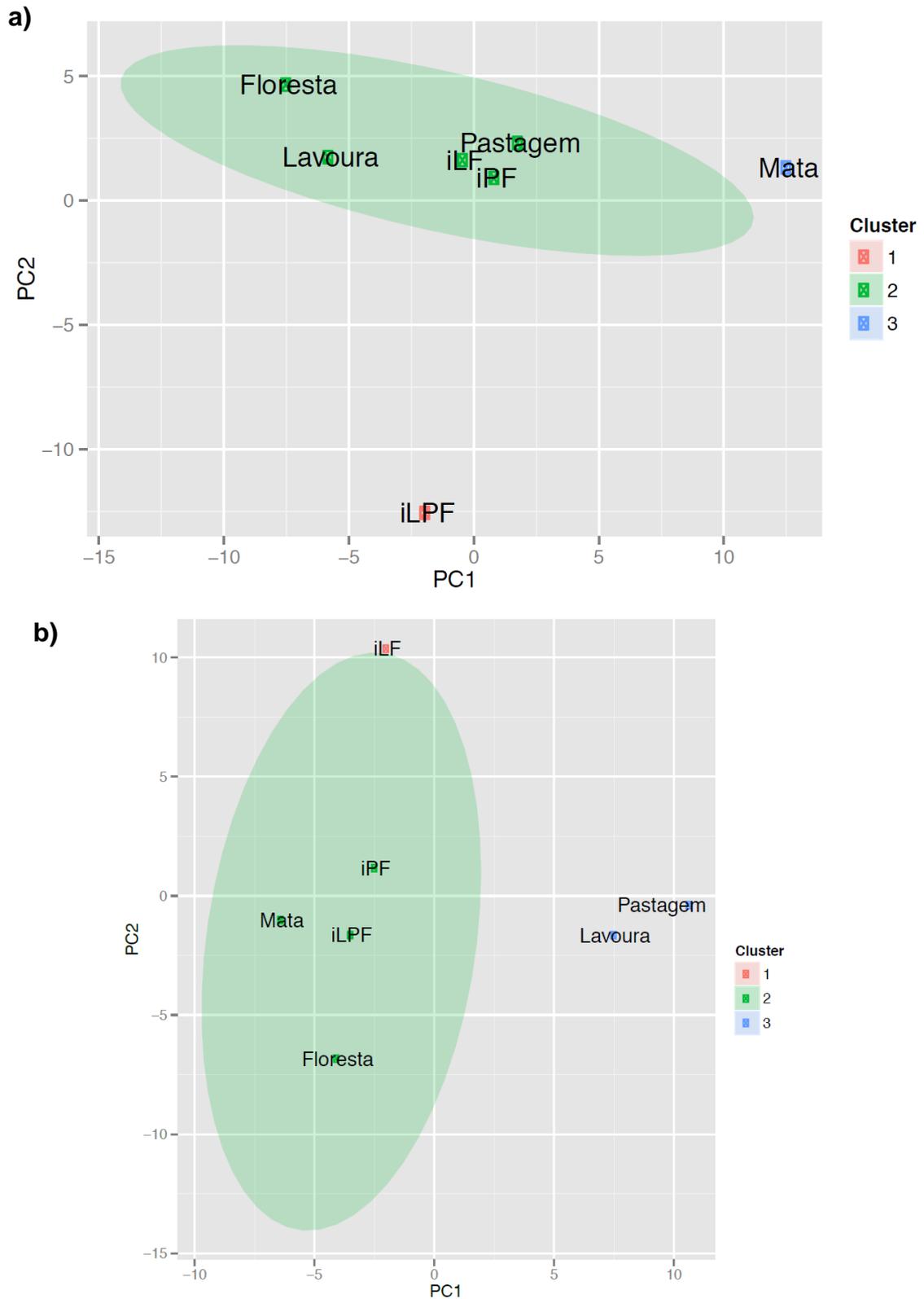
Na classe de *Actinobacteria* a maioria dos tratamentos apresentaram médias similares variando entre 35 a 40 %, exceto para Floresta (20 %) e Lavoura (12 %) na época da chuva. Contrariamente, na época da seca ocorreu o aumento da abundância especificamente para esses dois tratamentos e diminuição sob IPF, ILPF e Mata (Figura 23.).

Na classe *Bacilli*, o tratamento Lavoura se destacou com a maior abundância (44 %) na época da chuva, entretanto, na seca apresentou menor abundância com 12 %, menor valor da abundância quando comparado aos demais tratamentos, os quais aumentaram o valor da abundância durante a época da chuva (Figura 23.).

Na classe *Clostridia*, as abundâncias permaneceram semelhantes entre os tratamentos na época da chuva, tendo maior valor para Lavoura (22 %), porém diminuído bruscamente para 3 % sob a seca, e nesta mesma época notavelmente o comportamento da distribuição foi contrária para o tratamento Mata, alcançando a maior abundância (32 %) (Figura 23.).

Na classe *Gammaproteobacteria* a maioria dos tratamentos tiveram valores médios de abundância relativa na época da chuva, tendo a Lavoura apresentado a maior média (25 %) e Floresta menor (8 %) (Figura 23.). Na época da seca quando comparado com a chuva, a Lavoura apresentou menor valor da abundância (12 %) e Floresta, ILF e Pastagem aumentaram de modo semelhante os seus valores e a Mata e ILPF diminuíram a abundância equivalentemente iguais. A classe *Betaproteobacteria* sob Floresta teve maior média (15 %) no período de chuva, e menor para ILPF e Mata no período de seca. Os tratamentos Pastagem, IPF e ILPF aumentaram as suas abundâncias no período de seca (Figura 23.).

A similaridade da composição bacteriana quanto ao gênero, os tratamentos foram agrupados nos respectivos períodos com o mínimo de 95 % de similaridade (Figura 24.). Na chuva, cinco tratamentos foram agrupados, Floresta, Lavoura, ILF, Pastagem e IPF, permanecendo separado os tratamentos Mata e ILPF (Figura 24. A). Na seca, o agrupamento dos tratamentos similares entre gêneros passou a ser composto pela Mata, ILPF, IPF e Floresta, permanecendo isoladamente o ILF, Lavoura e Pastagem (Figura 24. B).



**FIGURA 24.** Agrupamento dos tratamentos conforme valor mínimo de 95 % de similaridade entre gêneros  $\geq 0.05$  % de abundância relativa na época da chuva **(a)** e seca **(b)**. Tratamentos: Floresta: cultivo monoespecífico, integração Lavoura Floresta (ILF); integração Pastagem Floresta (IPF); integração Lavoura Pastagem Floresta (ILPF); área de referência de mata nativa (Mata). Estações a) chuvosa e b) seca.

## **5. DISCUSSÃO**

### **5.1 Bactérias cultiváveis e não-cultiváveis em sistemas agrícolas**

A densidade total das bactérias cultivadas no presente estudo, teve médias de UFC na ordem de  $10^8$  e  $10^9$  por grama de solo seco, resultado também constatado por Borges Filho e Machado (2013).

O maior valor de UFC na chuva em relação à época de seca era um comportamento a ser esperado em razão da variação sazonal que associada ao teor de umidade no solo, favorece o aumento da população microbiana (VORONEY, 2007). A diferença na precipitação do período de chuva para a seca foi cinco vezes menor em volume (mm), no entanto, tendo apresentado uma umidade relativa do ar de 53 %, sendo necessário considerar que essa condição climática possa ter favorecido a atividade microbiana do solo.

As diferenças de UFCs entre os tratamentos independente da época, tiveram maior abundância para o tratamento IP-L e menores para Floresta, IPF e ILPF. A menor abundância de UFC desses três tratamentos foram semelhantes aos valores encontrados nas áreas de referências, Pousio e Mata, demonstrando que maior população de microrganismos pode não estar relacionada com a sustentabilidade do ecossistema, já que a diversidade genética é fator chave na funcionalidade do solo (CALEGARI et al. 2008; SELLE, 2007).

O componente florestal associado a sistemas agrícolas pode proporcionar melhor condição física e química do solo, relacionado com o maior estoque de carbono e nitrogênio alocado na matéria orgânica pelas árvores de eucaliptos, estruturando assim, a diversidade das comunidades

bacterianas e não favorecendo somente a abundância de grupos dominantes (ZILLI et al., 2003; LIMA et al., 2006). Essa mesma condição pode ser observada no contraste quatro (C4), o qual a diferença entre os grupos avaliados foi exclusivamente devido a presença do tratamento ILPF, fato atribuído a esse tratamento conter uma composição vegetal mais diversa e estável influenciando assim diretamente na atividade microbiana (BROUGHTON & GROSS 2000; TIPAYNO, KIM & SA, 2012).

Na comparação dos valores de UFC na área de Pousio com a dos tratamentos, foi observado diferença entre os seis tratamentos. O valor de UFC foi menor no Pousio em relação aos tratamentos, conforme Altieri (2012), espera-se que a área sem a intervenção antrópica conserve a diversidade biológica do local, e logo seja maior em relação a sistemas de monocultivos e não apenas com maior abundância.

As diferenças observadas nos valores de UFCs das bactérias cultivadas foram complementadas por meio da metodologia de DGGE, englobando as bactérias que não são cultivadas *in vitro*. Essa abordagem possibilitou o acesso aos valores absolutos do número de espécies dentro das comunidades bacterianas em determinado ambiente.

Os tratamentos foram agrupados com base na similaridade entre a composição da comunidade bacteriana do solo, sendo possível notar que independente das épocas, a maior semelhança do ILPF sempre foi com as áreas de referências, Mata e Pousio. Isso demonstra que as comunidades bacterianas do solo no sistema ILPF foram influenciadas por propriedades semelhantes as características de áreas de não antropizadas, indicando que esses tratamentos mesmo diante de perturbações antrópicas se destacaram dos demais sistemas devido à combinação de componentes agrícolas, pecuário e florestal em uma mesma área. Componentes o qual favorecem a composição e da cobertura vegetal e melhoria na qualidade físico-química do solo e assim conseqüentemente na estrutura da comunidade bacteriana (GARBEVA et al., 2004; FIERER et al., 2009).

Na chuva, o tratamento IPF-ILF foi o único a apresentar similaridade com o ramo contendo as áreas de referência e ILPF. Na seca, o ILF, IL-P e IP-L se mantiveram distantes do grupo de Mata, Pousio e ILPF, indicando que a estruturação da diversidade microbiana na chuva pode ser atribuída ao

componente de Pastagem que pode ter ocasionado a estrutura das comunidades bacterianas e na seca ficando mais evidente o efeito quando associado as árvores de eucaliptos. Esses dois componentes quando associados a outro cultivo ou entre si, são reconhecidos por melhorarem as condições físico-químicas e microbiológicas do solo (FRANZLUEBBERS, 2008).

Na seca, a similaridade entre os dois ramos formados foi 7,6 vezes menor quando comparado com a época da chuva, evidenciando que a comunidade bacteriana sob condições de estresse, seja hídrico e/ou de manejo, como no caso da época da seca, podem influenciar a estrutura das comunidades microbianas do solo e assim ressaltando as comunidades que atuam diretamente na sustentabilidade desses sistemas sob essas condições (MCHUGH, KOCH & SCHWARTZ, 2014).

Apesar do pouco tempo de implantação do experimento, a metodologia baseada em técnicas moleculares conseguiu detectar diferenças entre os tratamentos diante as estruturas das comunidades bacterianas do solo. Outros autores, avaliando a mesma área experimental no mesmo período de implantação não conseguiram detectar diferenças nas características químicas do solo em profundidades de 0-10 cm (DIEL et al., 2014). Portanto, essa metodologia do DGGE permitiu avaliar e comparar o efeito de atividades agrícolas e ambientais na dinâmica espaço-temporal das comunidades microbianas do solo em curto período de tempo (MUYZER, 1999).

## **5.2 Bactérias com potencial biotecnológico**

Por meio do estudo de bioprospecção de bactérias do solo na região de transição entre Cerrado e Amazônia, foi possível bioprospectar 16,45 % com a capacidade de controlar três gêneros de fungos fitopatogênicos, *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. e *Sclerotium rolfsii*, isoladas em área do ecótono Cerrado Amazônia. O potencial de bactérias em solubilizar fosfato foi 3,14 vezes maior do que as com potencial antagônico. Essas porcentagens demonstram que a região de estudo possui um reservatório de microrganismos com diversidade funcional ativa, indicando que a conservação e o acesso da

biodiversidade microbiana neste local são promissoras no aspecto de potencial biotecnológico.

Pouco se sabe sobre o efeito de sistemas integrados na diversidade de bactérias com potencial antagônico à *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., *Sclerotium rolfsii* e na capacidade de solubilizar fósforo.

Pelos resultados observados não se pode afirmar estatisticamente que as diferenças no número de isolados encontradas nos tratamentos pode ser atribuída exclusivamente ao efeito de manejo. Como o local de estudo é definido por duas estações bem distintas, período de chuva e seca, espera-se que a variação da comunidade bacteriana isolada não seja somente a aleatoriedade embutido ao método de isolamento, mas também podendo estar relacionada ao teor de água no solo (MCHUGH, KOCH & SCHWARTZ, 2014), uma vez que as atividades dos microrganismos são muito suscetíveis às variações sazonais, principalmente temperatura e umidade (ZILLI et al. 2003).

Quando se avalia áreas em estágio de sucessão vegetal avançado e sem interferência antrópica, elas possuem maior diversidade funcional quando comparadas a áreas agrícolas, ainda que os microrganismos se apresentem em menor abundância. Essas áreas são consideradas sustentáveis pela capacidade de resiliência dos microrganismos ali presentes independente dos fatores abióticos e bióticos (TORSVIK & ØVREÅS, 2002). Corroborando com essa realidade, a porcentagem de isolados com ambos potenciais biotecnológicos encontrados na Mata nativa se mantiveram constante independente do período climático, demonstrando a capacidade do ambiente em se autossustentar devido a presença de microrganismos resilientes no solo.

Esse resultado foi igualmente encontrado na área de floresta plantada com eucalipto, sendo esse o único tratamento que manteve comportamento semelhante ao da Mata, tendo valor constante para bactérias com potencial solubilizador nas estações. Esse fato pode também ser atribuído à baixa interferência de manejo neste tratamento, pela estrutura física do solo favorecida pelas raízes das árvores, além da cobertura do solo conter sombreamento, ocasionando condições microclimáticas favoráveis a retenção de umidade do solo (ARAUJO et al., 2013; VOGEL et al., 2013).

A associação de árvores, culturas agrícolas e o pastejo animal em um sistema único, porém multifuncional, contribui para a sobrevivência e

manutenção da microbiota advindo da conservação da biodiversidade local, aumento do sequestro de carbono no sistema, melhoria da fertilidade do solo e redução do processo de erosão, assim como também na qualidade do ar e da água (JOSE, 2009).

Em relação as épocas avaliadas, a porcentagem de isolados antagonistas foi maior no período de seca quando comparado com a chuva. Porém, dez tratamentos apresentaram menores porcentagens independente das estações ao serem comparados com a porcentagem obtida da mata nativa.

O maior número de cepas positivas para o antagonismo no período de seca pode estar relacionado ao componente florestal, já que os tratamentos ILF-IPF e Floresta apresentaram porcentagens maiores quando comparados a área de Mata nativa. Esse resultado sugere que as condições do solo nestes tratamentos foram favoráveis para o estabelecimento e proliferação de bactérias com potencial antagônico. Sabe-se que sistemas de monocultivo com constante manejo inadequado podem ocasionar perdas irreversíveis na diversidade funcional destes organismos antagonistas (YANES et al., 2012).

Outra possibilidade desse resultado, é que no período de seca ocorre a redução da abundância de grupos dominantes em decorrência do menor aporte de matéria orgânica no solo, o que ocasiona o aumento da competição por nutrientes nos nichos microbianos. Dessa forma, os microrganismos que ora eram mais abundantes podem se tornar menos abundantes tornando assim possível a detecção de espécies antes em menor riqueza, mas que se destacam por participarem de atividades importantes no processo funcional do solo, entre elas, o biocontrole (FAORO et al., 2010).

Aparentemente, não houve interferência da adubação fosfatada no número de bactérias SF, visto que a Lavoura manteve em ambas as épocas uma alta porcentagem de SF e semelhante à área de Mata nativa. Esses resultados condizem com o trabalho de Yanes et al. (2012), onde adubações constantes de fosfato não influenciaram no número de isolados solubilizadores. Entretanto, Mander et al. (2012) concluíram que mudanças do P no solo afetam diretamente a abundância e taxonomia das comunidades bacterianas do solo. No entanto, conforme dados da literatura, conseguiram perceber que a avaliação desta comunidade é influenciada pela metodologia o qual é adotada. Como foi observado por Patel, Archana e kumar (2008) em que a fonte de

carbono e sua concentração induzem a capacidade solubilizadora do microrganismo avaliada *in vitro*. Em razão disso, a semelhança entre as porcentagens encontrada neste trabalho pode estar relacionada a esses fatores.

Em geral, a estrutura das comunidades bacterianas cultiváveis do solo são pertencentes a nove principais filos: Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi, Bacteroidetes, Firmicutes, Planctomycetes, Verrucomicrobia e Gemmatimonadetes (JANSSEN, 2006).

Neste trabalho foram encontrados três filos para ambas as épocas, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria. Esses filos são descritos na literatura por apresentarem grande número de gêneros com diferentes usos e elevado potencial biotecnológico (LI et al., 2014), associados também com a capacidade fixadora de nitrogênio (YOUSUF et al., 2014).

Entretanto, na época da seca um quarto filo foi identificado, o Nitrospira, exclusivo da área de Mata nativa e representado por um isolado bacteriano, o qual apresenta os dois potenciais biotecnológicos aqui testados. O filo Nitrospira é representado por bactérias aeróbicas gram-negativas, atuantes exclusivamente no ciclo do nitrogênio e presentes em menor abundância no solo (COSTA et al., 2014). Daebeler et al. (2014) sugerem que a composição do gênero *Nitrospira* é selecionada pela elevada concentração de nitrito no solo.

Diante da identificação taxonômica dos isolados exclusivos, observamos que o filo Firmicutes é o grupo dominante, composto por oito isolados, seguido pelo Actinobacteria com cinco isolados, Proteobacteria com dois e Nitrospira com apenas um isolado. Das espécies do filo Firmicutes, temos que na literatura o *Brevibacillus brevis* é agente no biocontrole de bactérias como *Ralstonia solanacearum* (CHEN et al., 2012) e biodegradadores de queratina (JAOUADI et al., 2013). Prieto et al. (2014) avaliando *in vitro* a atividade de *Bacillus pumillus* como produtor de moléculas antimicrobiana contra *E. coli* e *Salmonella*, identificaram que não é possível distinguir essa espécie dentre as espécie deste grupo: *Bacillus altitudinis*, *Bacillus aerophilus*, *Bacillus safensis* e *Bacillus stratosphericus*.

Sato et al. (2014) buscando efeito supressivo de *Bacillus* e *Paenibacillus* isolados da fitosfera de tomate contra *Fusarium oxysporum* não

apresentaram respostas antifúngicas *in vitro*, porém notaram que duas cepas de *Paenibacillus* induziram a resistência em plantas de tomate, ocasionando a supressão da doença. Esses gêneros são visados para a bioprospecção, visto que são esporulantes e termotolerantes facilitando no processo de fabricação de produtos biológicos (FRAVEL, 2005), além disso estão associados ao favorecimento de maior produtividade agrícola (MCSPADDEN-GARDENER, 2004).

O gênero *Streptomyces* é o mais comum dentre Actinobacteria, compondo mais de 90 % de isolados cultiváveis, e são famosos por produzirem diversas substâncias antibacterianas, atualmente mais de 400 novos compostos bioativos já foram descobertos (ZUCCHI et al., 2011). O *Streptomyces sporoverrucosus* produz metabólitos secundários com potencial de antibiose (KOMAKI et al., 2009). Silva et al. (2013) isolaram 2.152 cepas de Actinobacteria de solo sob Cerrado localizado no estado de Minas Gerais, e conseguiram atribuir as cepas a nove gêneros e noventa e duas espécies. A maior população dessas bactérias foi isolada durante a época da chuva quando comparada a seca.

“*Burkholderia cepacia* complex” (Bcc) é o Complexo *Burkholderia cepacia* e atualmente contém nove espécies que são conhecidas por serem promotoras de crescimento vegetal, biorremediadoras, eficientes controladores biológicos, porém podendo ser encontradas também como patogênicas aos seres humanos (GHEQUIRE et al. 2013). *Burkholderia metallica* recentemente foi descrita como uma espécie nova, como relatado por Vanlaere et al. (2008), identificando mais quatro novas espécies também pertencentes ao Bcc como *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov. e *Burkholderia seminalis* sp. nov. através da análise do gene da proteína *recA*.

Pliego et al. (2011), enfatizam a importância de isolar microrganismos com potencial biotecnológico em áreas cultivadas por diferentes arranjos de agroecossistemas, proporcionando a seleção de microrganismos adaptados com as práticas agrícolas, como uso de pesticidas e fertilizantes, e facilitando posteriormente a produção comercial de bioformulados.

### **5.3 Composição e flutuação da comunidade bacteriana**

Os resultados obtidos por meio do sequenciamento utilizando a plataforma MiSeq (Illumina™) demonstraram alta porcentagem de sequências válidas (94,41 %) e com alto valor de cobertura no processo de classificação taxonômica (0.99). Dessa forma, a informação da composição da comunidade bacteriana encontrada neste trabalho é precisa, sendo possível realizar com confiabilidade inferências comparativas entre os sistemas avaliados.

Contudo, poucas diferenças foram constatadas na composição e distribuição da comunidade bacteriana em relação ao manejo de sistemas agrícolas durante as estações de chuva e seca comparado com uma área de referência de Mata nativa do ecótono entre Cerrado e Amazônia. Uma explicação para isso pode ter sido pelo pouco tempo de implantação dos experimentos, avaliados no segundo ano agrícola e/ou devido a proximidade dos sistemas entre si e com o remanescente florestal (LEMOS et al., 2011; DIEHL et al., 2014).

A comunidade bacteriana identificada sob todos os sistemas avaliados inclusive sob área de Mata Nativa apresentou Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria como os mais abundantes, seguido pelos filos menos abundantes Bacteroidetes, Acidobacteria, Verrucomicrobia e Chloroflexi abrangendo no total 98 %, sendo que os três primeiros filos representaram 85 % de toda abundância relativa. Esses resultados, estão de acordo com outros estudos que também empregaram técnicas semelhantes de sequenciamento, porém o filo Acidobacteria tem sido relatado como o mais abundante dentre os solos Tropicais (RACHID et al., 2013; ARAUJO, GUABERT & SILA, 2012; RAMPELOTTO et al., 2013).

A presença desses grupos bacterianos em solo é imprescindível para avaliar a sustentabilidade de ecossistemas, pois estão relacionados com processos de biodegradação da matéria orgânica, ocasionando a ciclagem e disponibilidade de nutrientes nos sistemas, assim como a estruturação das propriedades físicas do solo (KANOKRATANA et al., 2011) .

Constantemente pesquisas tem relatado que o uso de fertilizantes nitrogenados pode induzir mudanças na composição da comunidade bacteriana do solo (LUPWAYI et al., 2010; QUADROS et al., 2012; ZHALNINA et al., 2013) . Fierer et al. (2012) estudando diferentes doses de N em amostras

de solo proveniente de áreas sob longo uso de fertilizante nitrogenado, observaram que a maior dose diminuiu a abundância relativa de Acidobacteria.

De modo semelhante, Ramirez, Craine e Fierer (2012) ao avaliarem fonte inorgânica de N em solo incubado por um ano, constataram a diminuição da abundância relativa dos filos Acidobacteria e Verrucomicrobia e o aumento do Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria e Bacteroidetes. Além disso, os autores confirmam a hipótese de que a adição de N no solo pode favorecer a seleção de comunidades bacterianas capazes de decompor formas de carbono menos recalcitrante, elevando o potencial desses solos no sequestro de carbono.

Na análise de componentes principais, o sistema de monocultivo de Lavoura apresentou forte correlação com o Firmicutes na época da chuva e a área de Mata em ambas as épocas e levementemente com Actinobacteria exclusivamente na chuva. O filo Firmicutes possui gêneros que estão envolvidos na ciclagem do nitrogênio, são os *Clostridium*, *Bacillus*, *Paenibacillus*. Quadros et al. (2012) observaram que esses gêneros, assim como as *Brukholderia* e *Bradhrizobium* do filo Proteobacteria, foram correlacionadas com área experimental agrícola em que não houve adição de adubo nitrogenado (QUADROS et al., 2012). Isso evidencia que a Lavoura na época da seca pode ter sido favorecida pelo restos da cobertura vegetal. E, a área de Mata nativa e os sistemas ILPF, Floresta e IPF foram correlacionados tanto na época da chuva quanto na seca, podendo ter sido estruturados por uma comunidade estável de bactérias relacionadas com o ciclo do nitrogênio (CIBICHAKRAVARTHY et al., 2012).

Apesar da comunidade bacteriana do solo da área de Mata nativa não ter diferido dos sistemas agrícolas em nível de filo, é possível notar que dentre os três filos Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria a nível de classe, a flutuação da abundância relativa sob a mata nativa diante da sazonalidade das estações, não apresentou mudanças bruscas, enquanto que o sistema de monocultivo sob lavoura foi o que mais sofreu alterações na flutuação de sua abundância. Os sistemas integrados foram os que apresentaram as flutuações das suas comunidades próximas com o comportamento do remanescente florestal, indicando possibilidade de melhoria nas propriedades sustentável deste sistema (HERNÁNDEZ & HERNÁNDEZ, 2002).

Avaliando a similaridade a nível de gênero, podemos observar que a composição das comunidades bacterianas foi semelhante entre os sistemas integrados e a área de Mata nativa. Esses resultados demonstraram o mesmo padrão de comportamento para filo e classe discutidos anteriormente. Na análise de componentes principais na época de chuva, somente a Mata e o ILPF não se agruparam por similaridade dentre os demais sistemas. Sendo interessante ressaltar que o ambiente mesmo sob condições favoráveis para a proliferação microbiana em diversos nichos do solo e menor competição na busca de fontes de energia, essas duas áreas se mantiveram distintas devido as melhores características do sistema (BEZDICEK; BEAVER & GRANATSTEIN, 2003). Contudo, na seca onde a atividade microbiana e a mobilidade bacteriana são reduzidas em prol do menor aporte de matéria orgânica e água no solo, os sistemas ILPF, IPF e Floresta mantiveram-se agrupados com a Mata, indicando que fatores abióticos advindo do tipo de manejo devem ter regido e estruturado a comunidade bacteriana do solo (PLASSART et al., 2008).

Essa similaridade dos sistemas integrados com a comunidade de uma área considerada sustentável pode ser um indicativo que esses sistemas são uma alternativa para reestruturação da comunidade bacteriana do solo (BENNETZEN et al., 2012). Assim como neste trabalho, Rachid et al. (2013) observaram que sistemas agrícolas com manejo de baixo impacto apresentaram maior similaridade da comunidade bacteriana do solo com área de vegetação nativa de Cerrado.

Embora, a presença de água no solo seja vista como um fator que ocasiona mudanças na comunidade microbiana, outras pesquisas contradizem o quanto essa variável realmente é capaz de modificar a estrutura das comunidades bacterianas do solo (MCHUGH, KOCH & SCHWARTZ, 2014). Sendo necessário realizar a análise desta variável no local avaliado, a fim de garantir o quanto a comunidade avaliada neste trabalho foi influenciada pelo teor de água no solo. Fato a ser mencionado novamente, é que durante a coleta na época da seca houve precipitação de 41 mm com umidade relativa em torno de 50 %, levando a acreditar que essas condições climáticas podem ter contribuído para a ausência de percepções significativas entre as épocas avaliadas neste trabalho. Ademais, a Mata nativa por conter um córrego é

esperado que a umidade no solo seja mantida por mais tempo durante a seca, favorecendo assim a estabilidade da dinâmica populacional e diversidade bacteriana do solo.

Em trabalho realizado por Diel et al. (2014) avaliando a mesma área experimental deste trabalho com o mesmo tempo de implantação, mostraram que a área referência de Mata nativa (mesmo fragmento avaliado neste trabalho) apresentou maior teor de matéria orgânica do solo ( $8,6 \text{ dag kg}^{-1}$ ) e menor valor pH de 4,8 em relação aos demais sistemas. Além disso, obtiveram diferenças significativas contrastando sistema ILPF *versus* sistemas exclusivos para pH, P, P-remanescente, V e matéria orgânica na camada de 20-30 cm de profundidade. Adicionalmente, pesquisas apontam que os microrganismos possuem potencial de resiliência e resistência sob áreas degradadas sendo capazes de restabelecer sua condição inicial em alguns meses (ANDREOTE et al., 2010; QUADROS et al., 2012).

Assim, a integração de culturas agrícolas em uma mesma área, no caso do ILPF, espera-se que proporcione condições favoráveis com maior aporte de matéria orgânica na época da seca comparada aos sistemas de monocultivo, podendo ser essa a justificativa dos sistemas terem apresentado resultados semelhantes com o da área de Mata nativa (RUSSELL, LAIRD & MALLARINO, 2006; INGRAM et al., 2008).

Todavia, se faz necessário ressaltar que a área de estudo é considerada uma região de transição entre dois biomas, Cerrado e Amazônia, caracterizado por conter uma biodiversidade maior que a de biomas exclusivos, pois apresenta flora e fauna únicas do ecótono, além das próprias características de cada bioma (ARAUJO et al., 2009). Por isso, é esperado que a comunidade bacteriana avaliada sob esse solo seja diferente da literatura citada, onde eram estudados biomas Cerrado e Amazônia isoladamente (LAMBAIS, LUCHETA, & CROWLEY, 2014). Entretanto, é necessário obter maiores informações sobre o histórico e condição ecológica atual da Mata nativa definido como área sustentável neste trabalho, visto que esses fatores e outros podem influenciar a biodiversidade no fragmento (PERFECTO & VANDERMEER, 2008).

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O efeito do manejo nos sistemas agrícolas ocasionou mudanças na comunidade bacteriana do solo mesmo sendo experimento com curto tempo de implantação. Isso evidencia que avaliar bactérias do solo é um método sensível para monitorar o impacto de atividades antrópicas, além de que as metodologias empregadas não se contrapuseram.

Dentre os sistemas avaliados, os componentes eucalipto e pastagem demonstraram ter a capacidade de estruturar de forma benéfica a comunidade bacteriana do solo quando associados entre si ou com lavoura, pois apresentaram maior similaridade com a mata nativa e pousio do que com os sistemas de monocultivo. O sistema de lavoura, demonstrou ter a comunidade bacteriana mais sensível e sujeita as interferências externas, como advinda do próprio manejo e de umidade, oscilando a abundância e composição bacteriana de modo contrário ao comportamento da comunidade bacteriana da Mata nativa. Assim, o sistema ILPF como era esperado demonstrou ser o tratamento com a comunidade bacteriana mais estável e próximo ao quesito ambientalmente sustentável, visto que mesmo frente as estações sazonais e manejo manteve a sua composição bacteriana similiar ao da mata nativa.

Diante disso, acompanhar pesquisas que relacionem a sustentabilidade de sistemas integrados na região norte do estado de Mato Grosso através de estudos microbianos do solo é uma alternativa promissora para implantação e consolidação de agroecossistema sustentável.

Além disso, essa região se destacou em bioprospectar bactérias com potencial em controlar três gêneros de fitopatógenos agrícolas e solubilizar fósforo. Sendo que a porcentagem (51,66 %) de solubilizadores de fosfato foi

três vezes maior do que o controle de *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. e *Sclerotium rolfsii*. Dos setenta e nove isolados bacterianos identificados taxonomicamente, quatro bactérias foram encontradas unicamente na época da chuva e doze na seca. Essas merecendo particular atenção na devida funcionalidade exclusiva para a sustentabilidade dos ecossistemas em posteriores estudos de bioprospecção.

## **7. CONCLUSÕES**

Os sistemas integrados de produção demonstraram influenciar de modo benéfico as comunidades bacterianas do solo quando comparado com ao dos sistemas exclusivos e principalmente por terem semelhanças com ao da área de referência sustentável, mata nativa.

A área de transição entre Cerrado e Floresta Amazônica demonstrou ser promissora em bioprospectar bactérias do solo com potencial em solubilizar fosfato e atividade antagonistas à fitopatógenos. O acesso a esses isolados bacterianos são fundamentais para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos particularmente para uso local, pois são adaptados as condições climáticas e ao tipo de solo desta região.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A.C; ZAUZA, E.A.V; MAFIA, R.G; et al. Clonagem e doenças do eucalipto. Editora Universitária. Viçosa – UFV. 645p, 2004.

ALTIERI, M. Agroecologia: bases científicas para uma agricultura sustentável. 3 (ed.) Rev. ampl. São Paulo: Expressão Popular; Rio de Janeiro: AS-PTA, 2012.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; et al. A basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, Amsterdam, v.215, n.3, p.403-410, 1990.

ALVARENGA, R.C.; PORFÍRIO, V.S.; GONTIJO, M.M.N.; et al. Sistema integração lavoura-pecuária-floresta: condicionamento do solo e intensificação da produção de lavouras. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, n.31, p.59-67, 2010.

ANDEF, Associação Nacional de Defesa Vegetal. Tecnologia em primeiro lugar: o Brasil a caminho de se tornar o maior produtor mundial de grãos. *Revista Defesa Vegetal*, abril de 2009.

ANDREOTE, F.D.; CARNEIRO, R.T.; SALLES, J.F.; et al. Culture-independent assessment of Rhizobiales-related alphaproteobacteria and the diversity of *Methylobacterium* in the rhizosphere and rhizoplane of transgenic eucalyptus. *Microbial Ecology*, n.57, v.1, p.82–93, 2009.

ANDREOTE, F.D.; UN, R.; ARAÚJO, W.L.; et al. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). *Antonie Van Leeuwenhoek*, n.97, p.389–399, 2010.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Relatório ANVISA - UFPR sobre Mercado e Regulação de Agrotóxicos 2012. Brasília, abril de 2012.

AOKI, T.; O'DONNELL, K. & SCANDIANI, M.M. Semina: Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae* and *F. virguliforme*. *Mycoscience*, Tokyo, v.46, n.3, p.162- 183, 2005.

ARAUJO, F.F.; GUABERT, L.M. & SILVA, I.F. Bioprospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em *Brachiaria brizantha*. Revista Brasileira de Zootecnia, v.41, n.3, p.521-527, 2012.

ARAUJO, A.S.F.; CESARZ, S.; LEITE, L.F.C.; et al. Soil microbial properties and temporal stability in degraded and restored lands of Northeast Brazil. Soil Biology Biochemistry, v.66, p.175–181, 2013.

ARAUJO, F.F.; HENNING, A.A. & HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v.21, p.1639–1645, 2005.

ARAUJO, J.F.; CASTRO, A.P.; COSTA, M.M.C.; et al. Characterization of soil bacterial assemblies in Brazilian savanna-like vegetation reveals acidobacteria dominance. Microbial Ecology, v.64, n.3, p.760–70, 2012.

ARVOR, D.; MEIRELLES, M.; DUBREUIL, V.; et al. Analyzing the agricultural transition in Mato Grosso, Brazil, using satellite-derived indices. Applied Geography, v.32, n.2, p.702–713, 2012.

ASANTE, P.; ARMSTRONG, G.W. & ADAMOWICZ, W.L. Carbon sequestration and the optimal forest harvest decision: A dynamic programming approach considering biomass and dead organic matter. Journal of Forest Economics, v.17, n.1, p.3–17, 2011.

ASSUMPÇÃO, L.D.C.; LACAVA, P.T.; DIAS, A.C.F.; et al. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.44, n.5, p.503–510, 2009.

AULER, A.C.V.; CARVALHO, D.D.C. & MELLO, S.C.M. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* a *Sclerotium rolfsii* nas culturas do feijoeiro e soja. Revista Agro@mbiente On-Line, v.7, p.359–365, 2013.

BALBINO, L.C.; BARCELLOS, A. & STONE, L.F. (Ed. tec.). Marco referencial: Integração Lavoura-Pecuária-Floresta. Reference document: crop-livestock-forestry integration. Brasília, DF, Embrapa, 2011.

BARTRAM, A.K.; LYNCH, M.D.J.; STEARNS, J.C.; et al. Generation of multimillion-sequence 16S rRNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end illumina reads. Applied and Environmental Microbiology, v.77, p.3846–52, 2011.

BAVIN, T.K.; GRIFFIS, T.J. & BAKER, J.M. Impact of reduced tillage and cover cropping on the greenhouse gas budget of a maize/soybean rotation ecosystem. Agriculture Ecosystems Environment, v.134, p.234–242, 2009.

BENEDUZI, A.; MOREIRA, F.; COSTA, P.B. et al. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Applied Soil Ecology*, v.63, p.94–104, 2013.

BENNETZEN, E.H.; SMITH, P.; SOUSSANA, J.F.; et al. Identity-based estimation of greenhouse gas emissions from crop production: case study from denmark. *European Journal Agronomy*, v.41, p.66– 72, 2012.

BERENDSEN, R.L.; KALKHOVE, S.I.C.; LUGONES, L.G. et al. Effects of fluorescent *Pseudomonas* spp. isolated from mushroom cultures on *Lecanicillium fungicola*. *Biological Control*, v.63, n.2, p.210–221, 2012.

BERG, G.; ZACHOW, C.; LOTTMANN, J.; et al. Impact of soil type and plant species on rhizosphere associated fungi antagonistic to *Verticillium dahliae* Kleb. *Applied Environmental Microbiology*, v.71, p.4203–4213, 2005.

BETTIOL, W. & MORANDI, M.A.B. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 341 p., 2009.

BEZDICEK, D.F.; BEAVER, T. & GRANATSTEIN, D. Subsoil ridge tillage and lime effects on soil microbial activity, soil ph, erosion, and wheat and pea yield in the pacific northwest. *Soil Tillage Research*, v.74, p.55–63, 2003.

BILOTTA, G.S.; BRAZIER, R.E. & HAYGARTH, P.M. The impacts of grazing animals on the quality of soils, vegetation, and surface waters in intensively managed grasslands. *Advances in Agronomy*, v.94, p.237–280, 2007.

BLAIR, N.; FAULKNER, R.D. & TILL, A.R. Long-term management impacts on soil C, N and physical fertility. *Soil Tillage Research*, v.91, p.30–38, 2006.

BOCCOLINI, P.M.M.; ASMUS, C.I.R.F.; CHRISMAN, J.R.; et al. Stomach cancer mortality among agricultural workers: results from a death certificate-based case control study. *Cad. Saúde Colet.*, Rio de Janeiro, 22, p.86-92, 2014.

BORGES FILHO, E.L. & MACHADO, E.C. Avaliação microbiana do solo e dos aspectos morfológicos de hortaliças após a adição de adubos orgânicos em hortas. *E-Scientia*, v.6, n.1, p.8-15, 2013.

BRADER, G.; COMPANT, S.; MITTER, B. et al. Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, v.27, p.30–37, 2014.

BROUGHTON, L.C. & GROSS, K.L. Patterns of diversity in plant and soil microbial communities along a productivity gradient in a Michigan old-field. *Oecologia*, v.125, p.420–427, 2000.

BROWNE, P.; RICE, O.; MILLER, S.H. et al. Superior inorganic phosphate solubilization is linked to phylogeny within the *Pseudomonas fluorescens* complex. *Applied Soil Ecology*, v.43, n.1, p.131–138, 2009.

CALBRIX, R.; BARRAY, S.; CHABRERIE, O.; et al. Impact of organic amendments on the dynamics of soil microbial biomass and bacterial communities in cultivated land. *Applied Soil Ecology*, v.35, p.511–522, 2007.

CALEGARI, A.; HARGROVE, W.L.; RHEINHEIMER, D.S. et al. Impact of long-term no-tillage and cropping system management on soil organic carbon in an Oxisol: a model for sustainability. *Agronomy Journal*, v.100, p.1013-1019, 2008.

CAPORASO, J.G; LAUBER, C.L.; WALTERS, W.A. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*, v.6, p.1621–1624. 2012.

CARTER, M.R. Organic matter and sustainability. In: REES, B.C.; BALL, B.C.; CAMPBELL, C.D. et al. (eds). *Sustainable management of soil organic*. Wallingford, CAB International, p.9-22, 2001.

CARVALHO, M.C.DA C.G. & SILVA, D.C.G. Next generation DNA sequencing and its applications in plant genomics. *Ciência Rural*, v.40, p.735–744, 2010.

CHÁVEZ, L.F.; ESCOBAR, L.F.; ANGHINONI, I. et al. Diversidade metabólica e atividade microbiana no solo em sistema de integração lavoura-pecuária sob intensidades de pastejo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.46, n.1, p.1254–1261, 2011.

CHELIUS, M. K. & TRIPLETT, E. W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microbial Ecology*, v.41, p.252-263, 2001.

CHEN, W.; YUNSHENG, W.; DINGJUN, L.; et al. Draft genome sequence of *Brevibacillus brevis* strain X23, a biocontrol agent against bacterial wilt. *Journal of Bacteriology*, v.194, n.23, p.6634–6635, 2012.

CHU, H.; FUJII, T.; MORIMOTO, S.; et al. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.73, p.485-491, 2007a.

CHU, H.; LIN, X.; FUJII, T. et al. Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. *Soil Biology and Biochemistry*, v.39, n.11, p.2971–2976, 2007b.

CIBICHAKRAVARTHY, B.; PREETHA, R.; SUNDARAM, S.P.; et al. Diazotrophic diversity in the rhizosphere of two exotic weed plants, *Prosopis juliflora* and *Parthenium hysterophorus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.28, n.2, p.605–13, 2012.

CLEGG, C.D; ATTARD, E. & DEGRANGE, V. Impact of cattle grazing and inorganic fertiliser additions to managed grasslands on the microbial community composition of soils. *Soil Biology Biochemistry*, v.31, p.73–82, 2006.

COMPANT, S.; BRADER, G.; MUZAMMIL, S.; et al. Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. *BioControl*, v.58, n.4, p.435–455, 2013.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Estudos de prospecção de mercado safra 2012/2013. Brasília (DF), setembro de 2012.

COOPER, J.; LOMBARDI, R.; BOARDMAN, D.; et al. The future distribution and production of global phosphate rock reserves. *Resources, Conservation and Recycling*, v.57, p.78–86, 2011.

CORDELL, D.; DRANGERT, J.O. & WHITE, S. The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Global Environmental Change*, v.19, p.292-305, 2009.

CORDELL, D.; NESET, T.S.S. & PRIOR, T. The phosphorus mass balance: identifying “hotspots” in the food system as a roadmap to phosphorus security. *Current Opinion in Biotechnology*, v.23, n.6, p.839–45, 2012.

COSTA, D.; DIAS, A.C.; DURRER, A.; et al. Composição diferencial das comunidades bacterianas na rizosfera de variedades de cana de açúcar. *Revista Brasileira de Ciência Do Solo*, v.38, p.1694–1702, 2014.

DAEBELER, A.; BODELIER, P.; YAN, Z.; et al. Interactions between Thaumarchaea, Nitrospira and methanotrophs modulate autotrophic nitrification in volcanic grassland soil. *The ISME Journal*, v.8, n.12, p.1–14, 2014.

DAS, A.C.; NAYEK, H. & CHAKRAVARTY, A. Soil application of dinitroaniline and arylphenoxy propionic herbicides influences the activities of phosphate solubilizing microorganisms in soil. *Environmental Monitoring and Assessment*, v.184, p.7453–7459, 2012.

DAWSON, C.J. & HILTON, J. Fertiliser availability in a resource-limited world: Production and recycling of nitrogen and phosphorus. *Food Policy*, v.36, p.S14–S22, 2011.

DEMAIN, A.L. & SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *Journal Antibiotics*, Tokyo, v.62, p.5–16, 2009.

DEMANOU, J.; SHARMA, S.; DÖRFLER, U. et al. Structural and functional diversity of soil microbial communities as a result of combined applications of copper and mefenoxam. *Soil Biology and Biochemistry*, v.38, n.8, p.2381–2389, 2006.

DIAS, R.; XAVIER, M.G.; ROSSI, F.D. et al. MPI-blastn and NCBI-TaxCollector: improving metagenomic analysis with high performance classification and wide taxonomic attachment. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, v.12, p.1-17, 2014.

DIEDHIU, S.; DOSSA, E.L.; BADIANE, A.N. et al. Decomposition and spatial microbial heterogeneity associated with native shrubs in soils of agroecosystems in semi-arid Senegal. *Pedobiologia*, v.52, n.4, p.273–286, 2009.

DIEL, D.; BEHLING, M.; NETO, A.L.F. et al. Distribuição horizontal e vertical de fósforo em sistemas de cultivos exclusivos de soja e de integração lavoura-pecuária-floresta. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v.49, n.8, p.639-647, 2014.

DIJKSTERHUIS, J.; SANDERS, M.; GORRIS, L.G.M.; et al. Antibiosis plays a role in the context of direct interaction during antagonism of *Paenibacillus polymyxa* towards *Fusarium oxysporum*. *Journal of Applied Microbiology*, v.86, p.13–21, 1999.

DORAN, J.W & ZEISS, M.R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, v.15, p.3–11, 2000.

DUBEY, S.K.; TRIPATHI, A.K. & UPADHYAY, S.N. Exploration of soil bacterial communities for their potential as bioresource. *Bioresources Technology*, v.97, p.2217–24, 2006.

EMMERLING, C.; UDELHOVEN, T. & SCHRÖDER, D. Response of soil microbial biomass and activity to agricultural de-intensi over a 10 year period. *Soil Biology and Biochemistry*, v.33, p.2105–2114, 2001.

EUGSTER, W.; MOFFAT, A.M. & CESCHIA, E. Management effects on European cropland respiration. *Agriculture Ecosystems Environmental*, v.139, p.346–362, 2010.

EWING, B.; HILLIER, L.D. & WENDL, M.C. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. accuracy assessment. *Genome Research*, v.8, n.3, p.175–185, 1998.

FAGEN, J.R.; GIONGO, A.; BROWN, C.T. et al. Characterization of the relative abundance of the citrus pathogen *Ca. Liberibacter Asiaticus* in the microbiome of its insect vector, *Diaphorina Citri*, using high throughput 16S rRNA sequencing. *The Open Microbiology Journal*, v.6, p.29–33, 2012.

FAO, Food and Agriculture Organization Of The United Nations. Current world fertilizer trends and outlook to 2014. Rome, 2010.

FAO, Food and Agriculture Organization Of The United Nations. FaoStat Database. 2006. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/home/index.html>. Acesso em: 12/08/2013.

FAO, Food and Agriculture Organization Of The United Nations. Land Quality Indicators and Their Use in Sustainable Agriculture and Rural Development. Rome, 1997.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. State of the World's Forests. Rome, 2011.

FAO, Food and Agriculture Organization Of The United Nations. World Agriculture: Towards 2015/2030. An Fao Perspective. Rome. 2003.

FAO, Food and Agriculture Organization Of The United Nations. The State Of Food And Agriculture: Livestock In The Balance. Rome, 2009.

FAORO, H.; ALVES, A.C.; SOUZA, E.M.; et al. Influence of soil characteristics on the diversity of bacteria in the southern Brazilian Atlantic forest. Applied and Environmental Microbiology, Baltimore, v.76, p.4744-4749, 2010.

Ferreira, A.; Quecine, M.C.; LACAVA, P.T. et al. Diversity of endophytic bacteria from Eucalyptus species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. FEMS Microbiology Letters, v.287, v.1, p.8–14, 2008.

FERRERO, M.A.; MENOYO, E. & LUGO, M.A. Molecular characterization and in situ detection of bacterial communities associated with rhizosphere soil of high altitude native Poaceae from the Andean Puna region. Journal Articles Environmental, v.74, p.1177–1185, 2010.

FIERER, N.; LAUBER, C.L.; RAMIREZ, K.S.; et al. Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. The ISME Journal, v.6, n.5, p.1007–1017, 2012.

FIERER, N.; STRICKLAND, M.S.; LIPTZIN, D.; et al. Global patterns in belowground communities. Ecology Letters, v.12, p.1238-1249, 2009.

FILHO, B.M. & MELO, M.N.T. Alimentação, Agrotóxicos e Saúde. Revista Brasileira Saúde Materna e Infantil, Recife, v.12, p.113-119, 2012.

FILHO, R.L.; FERRO, M.H. & PINHO, R.S.C. Biological control mediated by *Bacillus subtilis*. Revista Trópica, v.4, p.12–20, 2010.

FILIPOVIC, D.; HUSNJAK, S. & KOSUTIC, S. Effects of tillage systems on compaction and crop yield of Albic Luvisol in Croatia. Journal of Terramechanics, v.43, p.177–189, 2006.

FRANZLUEBBERS, A.J. & STUEDEMANN J. A. Soil physical responses to cattle grazing cover crops under conventional and no tillage in the southern Piedmont Usa. Soil & Tillage Research, v.100, p.141–153. 2008.

FRAVEL, D.R. Commercialization and implementation of biocontrol. Annual Review of Phytopathology, v.43, p.337–359, 2005.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.A. & VAN ELSAS, J.D. Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. FEMS Microbiology Ecology, v.47, p.51–64, 2004.

GHEQUIRE, M.G.K.; CANCK, E.; WATTIAU, P.; et al. Antibacterial activity of a lectin like *Burkholderia cenocepacia* protein. *Microbiology Open*, v.2, n.4, p.566–575, 2013.

GILBERT, N. The disappearing nutrient. *Nature*, v.461, p.716-718, 2009.

GIONGO, A.; CRABB, D.B.; DAVIS-RICHARDSON, A.G.; et al. PANGEA: pipeline for analysis of next generation amplicons. *The ISME Journal*, v.4, p.852–861, 2010.

GODEFROID, S. & KOEDAM, N. Using high resolution mapping of disturbance indicator species to assess the sustainability of silviculture activities. *Forest Ecology and Management*, v.255, n.8-9, p.3416–3423, 2008.

GOOGLE. Disponível em: <<https://www.google.com/maps/@-11.8744154,-55.6206527,6580m/data=!3m1!1e3>> . Acesso em 05/11/2014.

GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J. et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*, v.245, p.83–93, 2002.

H Aidar, R.F.; Fagg, J.M.F.; Pinto, J.R.R. et al. Florestas estacionais e áreas de ecótono no estado do Tocantins, Brasil: parâmetros estruturais, classificação das fitofisionomias florestais e subsídios para conservação. *Acta Amazonica*, v.43, n.3, p.261-290, 2013.

HALLORAN, J.M. & ARCHER, D.W. External economic drivers and US agricultural production systems. *Renewable Agriculture and Food Systems*, v.23, p.296–303, 2008.

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

HARVARD, Harvard University. Informatics and Scientific Applications. Disponível em: [http://informatics.fas.harvard.edu/?page\\_id=371](http://informatics.fas.harvard.edu/?page_id=371) Acesso em: 20/11/2014.

HERNÁNDEZ, R.M.H. & LÓPEZ, D.H. Microbial biomass, mineral nitrogen and carbon content in savanna soil aggregates under conventional and no-tillage. *Soil Biology and Biochemistry*, v.34, p.1563–1570, 2002.

HOULBROOKE, D.J.; PATON, R.J.; LITTLEJOHN, R.P.; et al. Land use Intensification In New Zealand: effects on soil properties and pasture production. *The Journal of Agricultural Science*, v.149, p.337-349, 2011.

IFDC, International Fertilizer Development Center. World phosphate rock reserves and resources. Alabama, USA, September, 2010.

ILLUMINA. Multiplex Sequencing Assay. Disponível em: <http://technology.illumina.com/technology/next-generation-sequencing/multiplexing-sequencing-assay.html>. Acesso em: 12/11/2014.

INGRAM, L.J.; STAHL, P.D.; SCHUMAN, G.E.; et al. Grazing impacts on soil carbon and microbial communities in a mixed grass ecosystem. *Soil Science Society America Journal*, v.72, p.939–948, 2008.

INMET, Instituto Nacional de Meteorologia. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2014. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home2/index>. Acesso em: 02/11/2014.

INNEREBNER, G.; KNAPP, B.; VASARA, T. et al. Traceability of ammonia-oxidizing bacteria in compost treated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(5), p. 1092–1100, 2006.

JANSSEN, P.H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied Environmental Microbiology*, v.72, p.1719–1728, 2006.

JAOUADI, N.Z.; REKIK, H.; BADIS, A.; et al. Biochemical and Molecular Characterization of a Serine Keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with Promising Keratin-Biodegradation and Hide-Dehairing Activities. *PLoS ONE*, v.8, n.10, p.e76722, 2013.

JOSE, S. Agroforestry for ecosystem services and environmental benefits: an overview. *Agroforestry System*, v.76, n.1, p.1–10, 2009.

KAMAA, M.; MBURU, H.; BLANCHART, E. et al. Effects of organic and inorganic fertilization on soil bacterial and fungal microbial diversity in the Kabete long term trial, Kenya. *Biology and Fertility of Soils*, v.47, n.3, p.315–321, 2011.

KANOKRATANA, P.; UENGWETWANIT, T.; RATTANACHOMSRI, U.; et al. Insights into the phylogeny and metabolic potential of a primary tropical peat swamp forest microbial community by metagenomic analysis. *Microbial Ecology*, v.61, p.518–528, 2011.

KAUR, B.; GUPTA, S.R. & SINGH, G. Bioamelioration of a sodic soil by silvopastoral systems in northwestern India, p.13–20, 2002.

KEBREAB, E.; HANSEN, A.V & STRATHE, A.B. Animal production for efficient phosphate utilization: from optimized feed to high efficiency livestock. *Current Opinion in Biotechnology*, v.23, n.6, p.872–7, 2012.

KENNEDY, J.; MARCHESI, J.R. & DOBSON, A.D.W. Metagenomic approaches to exploit the biotechnological potential of the microbial consortia of marine sponges. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.75, n.1, p.11–20, 2007.

KHAN, S.T.; KOMAKI, H.; MOTOHASHI, K.; et al. Streptomyces associated with a marine sponge Haliclona sp.; biosynthetic genes for secondary metabolites and products. *Environmental Microbiology*, v.13, n.2, p.391-403, 2011.

KIRSCHBAUM, M.U.F.; SAGGAR, S.; TATE, K.R. et al. Comprehensive evaluation of the climate change implications of shifting land use between forest and grassland: new zealand as a case study. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v.150, p.123–138, 2012.

KOPPELAAR, R.H.E.M. & WEIKARD, H.P. Assessing phosphate rock depletion and phosphorus recycling options. *Global Environmental Change*, v.23, n.6, p.1454–1466, 2013.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; et al. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. *Plant and Soil*, The Hague, v.273, p.91-99, 2005.

KUMAR, S.; SUBASH, N.; SHIVANI, S. et al. Evaluation of different components under Integrated Farming System (IFS) for small and marginal farmers under semi humid climatic environment. *Experimental Agriculture*, v.48, n.3, p.399–413, 2012.

LACAVALA, P.T.; ANDREOTE, F.D.; ARAÚJO, W.L. et al. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR específico e DGGE. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, n.4, p.637–642, 2006.

LAMBAIS, M.R.; LUCHETA, A.R. & CROWLEY, D.E. Bacterial community assemblages associated with the phyllosphere, dermosphere, and rhizosphere of tree species of the Atlantic forest are host taxon dependent. *Microbial Ecology*, 68(3), p. 567–74, 2014.

LANNA FILHO, R.; SOUZA, R.M.; FERREIRA, A.; et al. Biocontrol activity of *Bacillus* against a GFP-marked *Pseudomonas syringae* pv. tomato on tomato phylloplane. *Australasian Plant Pathology*, v.43, p.1000-1007, 2013.

LASLO, É.; GYÖRGY, É.; MARA, G. et al. Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potential microbial inoculants. *Crop Protection*, v.40, p.43–48, 2012.

LEMES, V.R.R. Ethylenethiourea in fruits: Optimization and in-house validation of a method by liquid chromatography tandem mass spectrometry, occurrence and dietary exposure assessment. *Food Control*, v.42, p.321-328, 2014.

LEMOS, L.N.; FULTHORPE, R.R.; TRIPLETT, E.W.; et al. Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. *Journal of Microbiological Methods*, v.86, p.42–51, 2011.

LENKA, N.K.; CHOUDHURY, P.R.; SUDHISHRI, S.; et al. Soil aggregation, carbon build up and root zone soil moisture in degraded sloping lands under selected agroforestry based rehabilitation systems in eastern India. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v.150, p.54– 62, 2012.

LEONI, C.; BRAAK, C.J.F.; GILSANZ, J.C. et al. *Sclerotium rolfsii* dynamics in soil as affected by crop sequences. *Applied Soil Ecology*, v.75, p.95–105, 2014.

LI, X.; RUI, J.; XIONG, J.; et al. Functional potential of soil microbial communities in the maize rhizosphere. *PLoS ONE*, v.9, n.11, p.e112609, 2014.

LIMA, A.M.N.; SILVA, I.R.; NEVES, J.C.L.; et al. Soil organic carbon dynamics following afforestation of degraded pastures with Eucalyptus in southeastern Brazil. *Forest Ecology and Management*, v.235, p.219–231, 2006.

LINDSAY, B.W.; KIRKEGAARD, J.A. & SWAN, A. Impacts of soil damage by grazing livestock on crop productivity. *Soil Tillage Research*, v.113, p.19–29, 2011.

LIU, X.M.; ZHAO, H.X. & CHEN, S.F. Colonization of maize and rice plants by strain *Bacillus megaterium* C4. *Current Microbiology*, v.52, p.186–190, 2006.

LOUWS, F.J.; RADEMAKER, J.L.W. & BRUIJN, F.J. The three of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: Diversity, detection and disease diagnosis. *Annual Reviews Phytopathology*, v.37, p.81-125, 1999.

LUPWAYI, N.Z.; GRANT, C.A.; SOON, Y.K.; et al. Soil microbial community response to controlled release urea fertilizer under zero tillage and conventional tillage. *Applied Soil Ecology*, v.45, p.254-261, 2010.

MA, L.; CAO, Y.H.; CHENG, M.H. et al. Phylogenetic diversity of bacterial endophytes of *Panax notoginseng* with antagonistic characteristics towards pathogens of root-rot disease complex. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.103, n.2, p.299–312, 2013.

MACDONALD, G.K.; BENNETT, E.M.; POTTER, P.A.; et al. Agronomic phosphorus imbalances across the world's croplands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.108, n.7, p.3086–91, 2011.

MACHADO, V.; BERLITZ, D.L.; MATSUMURA, A.T.S.; et al. Bactérias como agentes de controle biológico de fitonematoides. *Oecologia Australis*, v.16, p.165-182, 2012.

MANDER, C.; WAKELIN, S.; YOUNG, S.; et al. Incidence and diversity of phosphate solubilising bacteria are linked to phosphorus status in grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v.44, n.1, p.93–101, 2012.

MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. Revisão Anual de Patologia de Plantas. Passo Fundo, v.1, p.369-409, 1993.

MCHUGH, T.A.; KOCH, G.W. & SCHWARTZ, E. Minor changes in soil bacterial and fungal community composition occur in response to monsoon precipitation in a semiarid grassland. *Soil Microbiology*, v.68, p.370–378, 2014.

MCSPADDEN-GARDENER, B.B. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology*, v.94, p.1252–1258, 2004.

MELERO, S.; LÓPEZ-GARRIDO, R.; MURILLO, J. M. et al. Conservation tillage: Short- and long-term effects on soil carbon fractions and enzymatic activities under Mediterranean conditions. *Soil and Tillage Research*, v.104, n.2, p.292–298, 2009.

MONTECCHIA, M.S.; CORREA, O.S.; SORIA, M.A. et al. Multivariate approach to characterizing soil microbial communities in pristine and agricultural sites in Northwest Argentina. *Applied Soil Ecology*, v.47, n.3, p.176–183, 2011.

MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 625 p. 2002.

MURGUEITIO, E.; CALLE, Z.; URIBE, F.; et al. Native trees and shrubs for the productive rehabilitation of tropical cattle ranching lands. *Forest Ecology and Management*, v.10, p.1654–1663, 2011.

MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, v.2, p.317-322, 1999.

MUYZER, G., DEWAAL, E.C. & UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S ribosomal RNA. *Applied Environmental Microbiology*, v.59, p.695–700, 1993.

MYCOBANK. Fungal databases, nomenclature and species banks. <http://www.mycobank.org/>. Acesso em: 19/09/2014.

NCBI, National Center for Biotechnology Information. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 03/03/2014.

NETO, S.S.; SANTOS, A.; LEITE, R. et al. Análise espacial de parâmetros da fertilidade do solo em região de ecótono sob diferentes usos e manejos. *Semina: Ciências Agrárias*, v.32, n.2, p.541–552, 2011.

NOGUEIRA, M.A. et al. Promising indicators for assessment of agroecosystems alteration among natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v.115, p.237-247, 2006.

OENEMA, O.; WRAGE, N.; VELTHOF, G.L. Trends in global nitrous oxide emissions from animal production systems. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, v.72, p.51–65, 2005.

OLIVEIRA, C.A.; MARRIEL, I.E.; GOMES, E.A.; et al. Contrastantes na eficiência de uso de fósforo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.44, n.1, p.1473–1482, 2009.

OLLIVIER, J; TÖWE, S.; BANNERT, A.; et al. Nitrogen turnover in soil and global change. *FEMS Microbiology Ecology*, v.78, p.3–16, 2011.

OTINGA, A.N.; PYPERS, P.; OKALEBO, J.R. et al. Partial substitution of phosphorus fertiliser by farmyard manure and its localised application increases agronomic efficiency and profitability of maize production. *Field Crops Research*, v.140, p.32–43, 2013.

PAPATHEODOROU, E.M.; EFTHIMIADOU, E.; STAMOU, G.P. Functional diversity of soil bacteria as affected by management practices and phenological stage of *Phaseolus vulgaris*. *European Journal of Soil Biology*, v.44, p.429 – 436, 2008.

PAREKH, N.R. & BARDGETT, R.D. The characterisation of microbial communities in environmental samples. In: KEITH-ROACH, M.J. & LIVENS, F.R. (Ed.). *Interactions of microorganisms with radionuclides*. United Kingdom: Elsevier Science, p.37-60. 2002.

PARENT, L.E.; PARENT, S.-É. & ZIADI, N. Biogeochemistry of soil inorganic and organic phosphorus: A compositional analysis with balances. *Journal of Geochemical Exploration*, v.141, p.52–60, 2014.

PATEL, D.; ARCHANA, G. & KUMAR, G. Variation in the nature of organic acid secretion and mineral phosphate solubilization by *Citrobacter* sp. DHRSS in the presence of different sugars. *Current Microbiology*, v.56, p.168-174, 2008.

PAUDEL, B.R.; UDAWATTA, R.P. & ANDERSON, S.H. Agroforestry and grass buffer effects on soil quality parameters for grazed pasture and row crop systems. *Applied Soil Ecology*, v.48, n.2, p.125–132, 2011.

PEIXOTO, R.S.; COUTINHO, H.L.C.; MADARI, B.; et al. Soil aggregation and bacterial community structure as affected by tillage and cover cropping in the Brazilian Cerrados. *Soil and Tillage Research*, v.90, p.16-28, 2006.

PEIXOTO, R.S.; COUTINHO, H.L.D.; RUMJANEK, N.G.; et al. Use of *rpoB* and *16S rRNA* genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v.35, p.316-320, 2002.

PERFECTO, I. & VANDERMEER, J. Biodiversity conservation in tropical agroecosystems: a new conservation paradigm. *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, 1134, p.173–200, 2008.

PLASSART, P.; VINCESLAS, M.A.; GANGNEUX, C.; et al. Molecular and functional responses of soil microbial communities under grassland restoration. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v.127, p.286–293, 2008.

PLIEGO, C.; RAMOS, C.; VICENTE, A.; et al. Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. *Plant Soil*, v.340, p.505–520, 2011.

POWLSON, D.S.; GREGORY, P.J.; WHALLEY, W.R.; et al. Soil management in relation to sustainable agriculture and ecosystem services. *Food Policy*, p.572–587, 2011.

PRIETO, M.L.; O'SULLIVAN, L.; TAN, S.P.; et al. In vitro assessment of marine *Bacillus* for use as livestock probiotics. *Marine Drugs*, v.12, p.2422–2445, 2014.

QUADROS, P.D.; ZHALNINA, K.; DAVIS-RICHARDSON, A.; et al. The effect of tillage system and crop rotation on soil microbial diversity and composition in a subtropical Acrisol. *Diversity*, v.4, n.4, p.375–395, 2012.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, v.41, p.590–96, 2013.

QUECINE, M.C.; ARAÚJO, W.L.; ROSSETTO, P.B.; et al. Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. *Applied and Environmental Microbiology (Print)*, v.78, p.7511-7518, 2012.

QUINKENSTEIN, A.; WÖLLECKE, J.; BÖHM, C.; et al. Ecological benefits of the alley cropping agroforestry system in sensitive regions of Europe. *Environmental Science & Policy*, v.12, n.8, p.1112–1121, 2009.

RACHID, C.T.C.C.; SANTOS, A.L.; PICCOLO, M.C.; et al. Effect of sugarcane burning or green harvest methods on the Brazilian Cerrado soil bacterial community structure. *PloS One*, v.8, n.3, p.e59342, 2013.

RADDATZ, R.L. Evidence for the influence of agriculture on weather and climate through the transformation and management of vegetation: Illustrated by examples from the Canadian Prairies. *Agricultural and Forest Meteorology*, v.142, p.186–202, 2007.

RAMIREZ, K.S.; CRAINE, J.M. & FIERER, N. Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes. *Global Change Biology*, v.18, p.1918–1927, 2012.

RAMOS, M.E.; BENÍTEZ, E.; GARCÍA, P.A.; et al. Cover crops under different managements vs. frequent tillage in almond orchards in semiarid conditions: Effects on soil quality. *Applied Soil Ecology*, v.44, n.1, p.6–14, 2010.

RAMPELOTTO, P.H.; FERREIRA, A.S.; BARBOZA, A.D.M.; et al. Changes in diversity, abundance, and structure of soil bacterial communities in Brazilian

Savanna under different land use systems. *Microbial Ecology*, v.66, n.3, p.593–607, 2013.

RANA, A.; JOSHI, M.; PRASANNA, R.; et al. Biofortification of wheat through inoculation of plant growth promoting rhizobacteria and cyanobacteria. *European Journal of Soil Biology*, v.50, p.118–126, 2012.

RANJARD, L.; POLY, F. & NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology*, v.151, n.3, p.167–77, 2000.

RAPPÉ, M.S. & GIOVANONNI, S.J. The uncultured microbial majority. *Annual Reviews in Microbiology*, v.67, p.369-394, 2003.

REIS, G.; LANA, A.; MAURÍCIO, R.; et al. Influence of trees on soil nutrient pools in a silvopastoral system in the Brazilian Savannah. *Plant Soil*, v.329, p. 185–193. 2010.

RIVERO, S.; ALMEIDA, O.; ÁVILA, S.; et al. Pecuária e desmatamento: uma análise das principais causas diretas do desmatamento na Amazônia. *Nova Economia*, Belo Horizonte, v.19, n.1, p.41-66, 2009.

ROSSELÓ-MORA, R. & AMANN, R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Review*, v.25, n.1, p.39-67, 2001.

RUSSELL, A.E.; LAIRD, D.A. & MALLARINO, A.P. Nitrogen fertilization and cropping system impacts on soil quality in Midwestern Mollisols. *Soil Science Society America Journal*, v.70, p.249–255, 2006.

SAHA, S. K.; RAMACHANDRAN, N.P.K.; NAIR, V.D. et al. Carbon storage in relation to soil size fractions under tropical tree based land use systems. *Plant and Soil*, v.328, n1, p.433–446, 2009.

SANFUENTES, E.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A.; et al. Caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp. e identificação de novos grupos de anastomose em jardim clonal de eucalipto. *Fitopatologia Brasileira*, v.32, n.3, p.229–236, 2007.

SATO, I.; YOSHIDA, S.; IWAMOTO, Y.; et al. Suppressive potential of *Paenibacillus* strains isolated from the tomato phyllosphere against *Fusarium* crown and root rot of tomato. *Microbes and Environments*, v.29, n.2, p.168–177, 2014.

SATTARI, S.Z.; BOUWMAN, A.F.; GILLER, K.E.; et al. Residual soil phosphorus as the missing piece in the global phosphorus crisis puzzle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.109, n.16, p.6348–53, 2012.

SATYANARAYANA, T. Microbial diversity. *Current Science*, v.89, p.926–928, 2005.

SCHIPPER, W. Phosphorus: Too Big to Fail. *European Journal of Inorganic Chemistry*, p.1567–1571, 2014.

SCHLOTTER, M.; DILLY, O. & MUNCH, J.C. Indicators for evaluating soil quality. *Agric Ecos Env*, 98, p. 255-262, 2003.

SELLE, G.L. Ciclagem de nutrientes em ecossistemas florestais. *Bioscience Journal*, v.23, p.29-39, 2007.

SICOLNET, Sistema de Informação de Coleções de Interesse Biotecnológico. Microorganismos. 2014. Disponível em: <http://sicol.splink.org.br/>. Acesso em: 06/01/2014.

SILVA, S.M.; SALES, A.N.; MAGALHÃES, T.K.G; et al. Brazilian cerrado soil actinobacteria ecology. *BioMed Research International*, p.1–10, 2013.

SILVA. High quality ribosomal RNS databases. 2014. Disponível em: <http://www.arb-silva.de/>. Acesso em: 05/02/2014.

SINGH, B.K.; DAWSON, L.A.; MACDONALD, C.A. Impact of biotic and abiotic interaction on soil microbial communities and functions: A field study. *Applied Soil Ecology*, v.41, p.239–248, 2009.

SIX, J.; FREY, S.D. & THIET, R.K. Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems. *Soil Science Society America Journal*, v.70, p.555–569, 2006.

SIX, J.; OGLE, S.M.; BREIDT, F.; et al. The potential to mitigate global warming with no-tillage management is only realized when practised in the long term. *Global Change Biology*, v.10, p.155–160, 2004.

SMIL, V. Phosphorus in the environment: Natural flows and human interferences. *Annual Reviews Ecology Evolution Systematics*, v.25, p.53–88, 2000.

SMITH, P.; MARTINO, D.; CAI, Z. Policy and technological constraints to implementation of greenhouse gas mitigation options in agriculture. *Agriculture Ecosystems Environmental*, v.118, p.6–28, 2007.

SOWNDHARARAJAN, K.; MARIMUTHU, S. & MANIAN, S. Biocontrol potential of phylloplane bacterium *Ochrobactrum anthropi* BMO-111 against blister blight disease of tea. *Journal of Applied Microbiology*, v.114, n.1, p.209–18, 2012.

SPARLING, G.P. & SCHIPPER, L.A. Soil quality at a national scale in New Zealand. *Journal Environmental Quality*, v.31, p.1848–57, 2002.

SPECIESLINK. 2014. Disponível em: <http://splink.cria.org.br>. Acesso em: 06/01/2014.

SPOHN, M. & KUZYAKOV, Y. Phosphorus mineralization can be driven by microbial need for carbon. *Soil Biology and Biochemistry*, v.61, p.69–75, 2013.

STEWART, E.J. Growing unculturable bacteria. *Journal of Bacteriology*, v.194, n.16, p.4151–60, 2012.

TAO, G.; Tian, S.; CAI, M.; et al. Phosphate solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. *Pedosphere*, v.18, n.4, p.515–523, 2008.

THOMS, C.; GATTINGER, A.; JACOB, M. et al. Direct and indirect effects of tree diversity drive soil microbial diversity in temperate deciduous forest. *Soil Biology and Biochemistry*, v.42, n.9, p.1558–1565, 2010.

TILMAN, D.; CASSMAN, K.G.; MATSON, P.A et al. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, v.418, n.6898, p.671–7, 2002.

TIPAYNO, S.; KIM, C.G. & SA, T. T-RFLP analysis of structural changes in soil bacterial communities in response to metal and metalloid contamination and initial phytoremediation. *Applied Soil Ecology*, v.61, p.137–146, 2012.

TORSVIK, V. & OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, New York, v.5, p.240-245, 2002.

TRABELSI, D.; AMMAR, B.H.; MENGONI, A. et al. Appraisal of the crop-rotation effect of rhizobial inoculation on potato cropping systems in relation to soil bacterial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, v.54, p.1–6, 2012.

TRIFONOVA, R.; POSTMA, J. & VAN ELSAS, J.D. Interactions of plantbeneficial bacteria with the ascomycete *Coniochaeta ligniaria*. *Journal of Applied Microbiology*, v.106, n.6, p.1859–66, 2009.

USEPA, United State Environmental Protection Agency. Global anthropogenic non-CO<sub>2</sub> greenhouse gas emissions: 1990–2020. Washington, DC, June 2006.

USGS, United State Geological Survey. MINERALS YEARBOOK—2011: Phosphate Rock. 2013.

VAN DER VELDE, M.; FOLBERTH, C.; BALKOVIĆ, J.; et al. African crop yield reductions due to increasingly unbalanced Nitrogen and Phosphorus consumption. *Global Change Biology*, v.20, n.4, p.1278–88, 2014.

VAN KAUWENBERGH, S.; STEWART, M. & MIKKELSEN, R. World Reserves of Phosphate Rock: a Dynamic and Unfolding Story. *Better Crops*, v.97, p.18–20, 2013.

VAN VUUREN, D.P.; BOUWMAN, A.F. & BEUSEN, A.H.W. Phosphorus demand for the 1970–2100 period: A scenario analysis of resource depletion. *Global Environmental Change*, v.20, n.3, p.428–439, 2010.

- VANLAERA, E.; LIPUMA, J.J.; BALDWIN, A.; et al. *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov., and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the Burkholderia Cepacia Complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.58, p.1580–1590, 2008.
- VANLAUWE B, et al. Integrated soil fertility management: operational definition and consequences for implementation and dissemination. *Outlook on Agriculture*, v.39, p.17–24, 2010.
- VAYSSIÈRES, J.; VIGNE, M.; ALARY, V.; et al. Integrated participatory modelling of actual farms to support policy making on sustainable intensification. *Agricultural Systems*, v.104, p.146–161, 2011.
- VERGÉ, X.P.C.; KIMPE, C. & DESJARDINS, R.L. Agricultural production, greenhouse gas emissions and mitigation potential. *Agricultural and Forest Meteorology*, v.142, n.2, p.255–269, 2007.
- VOGEL, A.; EISENHAUER, N.; WEIGELT, A.; et al. Plant diversity does not buffer drought effects on early-stage litter mass loss rates and microbial properties. *Global Change Biology*, v.19, p.2795–2803, 2013.
- VORONEY, R.P. The soil habitat. In: *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*, edited by E. A. Paul, p.25-52, 2007.
- WAKELIN, S.A.; GREGG, A.L.; SIMPSON, R.J.; et al. Pasture management clearly affects soil microbial community structure and N-cycling bacteria. *Pedobiologia*, v.52, n.4, p.237–251, 2009.
- WANG, G.H.; JIN, J.; LIU, J.J.; et al. Bacterial community structure in a mollisol under long-term natural restoration, cropping, and bare fallow history estimated by PCR-DGGE. *Pedosphere*, v.19, n.2, p.156–165, 2009.
- YANES, M.L.; FUENTE, L.D.; ALTIER, N. et al. Characterization of native fluorescent *Pseudomonas* isolates associated with alfalfa roots in Uruguayan agroecosystems. *Biological Control*, p.1–9, 2012.
- YOUSUF, B.; KUMAR, R.; MISHRA, A. et al. Differential distribution and abundance of diazotrophic bacterial communities across different soil niches using a gene targeted clone library approach. *FEMS Microbiology Letters*, v.360, p.117–125, 2014.
- ZENGLER, K. Central role of the cell in microbial ecology. *Microbiology and Molecular Biology Review*, v.73, p.712–729, 2009.
- ZHANG, H.; GUAN, D. & SONG, M. Biomass and carbon storage of Eucalyptus and Acacia plantations in the Pearl River Delta, South China. *Forest Ecology and Management*, v.277, p.90–97, 2012.

ZHAO, W.Y.; LI, J.L. & QI, J.G. Changes in vegetation diversity and structure in response to heavy grazing pressure in the northern Tianshan Mountains, China. *Journal of Arid Environments*, v.68, n.3, p.465–479, 2007.

ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R. et al. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. *Cadernos de Ciência e Tecnologia*, v.20, n.3, p.391-411, 2003.

ZUCCHI, T.D.; GUIDOLIN, A.S. & CÔNSOLI, F.L. Isolation and characterization of actinobacteria ectosymbionts from *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera, Formicidae), *Microbiological Research*, London, v.166, n.1, p.68–76, 2011.