Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Comunidades de arqueias metanogênicas em diferentes usos dos solos da
Amazônia

Kelly Jaqueline Alves

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2018

Kelly Jaqueline Alves
Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas

Comunidades de arqueias metanogênicas em diferentes usos dos solos da Amazônia
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **FERNANDO DINI ANDREOTE**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Alves, Kelly Jaqueline

Comunidades de arqueias metanogênicas em diferentes usos dos solos da Amazônia / Kelly Jaqueline Alves. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

56 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Enriquecimento 2. Metano 3. *mcrA* 4. 16S rRNA I. Título

AGRADECIMENTOS

À toda minha família em especial aos meus pais Evanir e Janete e a minha irmã Natália, por serem a minha base, pelo apoio e amor incondicionais e por compreenderem minhas ausências. Ao meu namorado Deived por todo amor dedicado, pelo companheirismo diário mesmo que a distância.

À Universidade de São Paulo-USP em especial a “Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz” -ESALQ/USP. Por oferecerem além de excelente infraestrutura e corpo docente, apoio social (INCLUSP) que foi fundamental para a realização do Curso de Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas. Agradeço também ao programa de Microbiologia Agrícola por fornecer suporte ao meu curso de mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPQ, pelo financiamento da minha bolsa, que foi essencial para minha manutenção durante o primeiro ano de mestrado.

À FAPESP e a CAPES, por concederem a bolsa do meu segundo ano de mestrado, fundamental para a minha manutenção durante esse período. Processo nº 2016/18745-0 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Ao meu orientador Prof^o Dr^o Fernando Dini Andreote, pela oportunidade em desenvolver minha iniciação científica e mestrado sob sua orientação. Pelos desafios lançados, pela confiança e por me orientar sempre visando a melhor formação possível, sobre tudo pelo exemplo de dedicação e competência.

À Prof^a Dr^a Tsai Siu Mui e a todos os integrantes do Projeto Temático financiado pela FAPESP “Dimensões US-BIOTA-São Paulo: Integrando as dimensões da biodiversidade microbiana ao longo de áreas de alteração do uso da terra em florestas tropicais” (processo 2014/50320-4), pelo suporte técnico e científico. Agradeço também a equipe que participou da coleta em especial ao Wagner.

À Prof^a Dr^a Cristina Rossi Nakayama, que considero minha co-orientadora e gentilmente aceitou me orientar no desenvolvimento do enriquecimento das arqueias metanogênicas, e por ter indicado o Vitor Vital para me auxiliar. Ele também tornou divertidas minhas idas à São Paulo.

À Profª Drª Vivian Pellizari por permitir que eu utilizasse a estrutura de seu laboratório para o estabelecimento, manutenção e monitoramento dos cultivos enriquecidos. Agradeço ao LECOM-IO/USP em especial à Rosa, Luana, Franciele, Amanda, Camila e Diego pela recepção e companhia durante minhas idas ao laboratório.

Aos meus queridos primos Silene, Reginaldo, Pedro, Gabi e Estelinha, por terem me recebido com carinho quando precisei me hospedar em São Paulo para desenvolver as atividades referente ao meu mestrado.

Ao Drº Victor Satler Pylro pela orientação e auxílio no processo de sequenciamento das amostras e análises. À FIOCRUZ/MG por fornecer estrutura para a montagem da biblioteca e ao Profº Drº Luiz Lehmann Coutinho e ao técnico Ricardo Brassaloti pelo sequenciamento da biblioteca.

À Danielle Santos pela parceria no projeto e também pela amizade, sua companhia foi fundamental para essa etapa, dividimos conhecimento, alegrias e doces. Também agradeço ao Alexandre Pedrinho, Luis F. Merloti, Leandro Lemos, Mariley Fonseca e Elisa Nadalini pelos momentos de alegria e bom humor, inicialmente colegas de projeto e hoje meus amigos.

Às amigas que a ESALQ me deu e que apesar da distância também fizeram parte dessa etapa: Mariana, Crislaine, Luciana, Camila Martins, Jana, Jean, Lucas, Gian e Danilo. Agradeço o convívio das meninas da casa 4: Camila, Bruna, Isaneli, Césia e Susan. E a Mayra pelo apoio constante nessa etapa.

À Sônia, Denise e Fernandinho, pelo excelente suporte técnico, amizade e momentos de descontração e por compartilharem comigo os sofrimentos e alegrias de torcer para o Corinthians. Agradeço a Mylenne pela orientação durante a iniciação científica, por ter me apresentado a microbiologia e biologia molecular com muita alegria. Também a todos do laboratório de Microbiologia do Solo, pelo apoio, auxílio nas dúvidas e por tornarem alegre o cotidiano no laboratório: Alessandra, Júlia, Thiago, Lucas, Diogo, Polé, Juliana, Michele, Armando, Simone, Dorotéia, Bruna, Cátia, Ana Luísa, Caio, Yasmin, Carol, Maiele e Arthur.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. IMPACTOS ANTRÓPICOS NA AMAZÔNIA	11
2.2. CICLO DO CARBONO E PRODUÇÃO DO METANO	12
2.3. ARQUEÍAS METANOGÊNICAS.....	12
2.4. ARQUEÍAS METANOGÊNICAS CULTIVADAS DE SOLO DA AMAZÔNIA.....	13
3. OBJETIVO	15
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4. HIPÓTESES	17
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
5.1. COLETA DAS AMOSTRAS	19
5.2. FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES	20
5.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DAS AMOSTRAS DE SOLO	20
5.4. ENRIQUECIMENTO.....	21
5.5. MONITORAMENTO DA PRODUÇÃO DE METANO POR CROMATOGRAFIA GASOSA (GC).....	22
5.6. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO CULTIVO ENRIQUECIDO	23
5.7. EXTRAÇÃO DE DNA DO CULTIVO ENRIQUECIDO.....	23
5.8. QUANTIFICAÇÃO DAS COMUNIDADES METANOGÊNICAS PRESENTE NO ENRIQUECIMENTO POR PCR EM TEMPO REAL (QPCR)	23
5.9. SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO V4-V5 DO GENE 16S rRNA.....	24
6. RESULTADOS	25
6.1. CARACTERIZAÇÃO DO SOLO.....	25
6.2. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS CULTIVOS ENRIQUECIDOS	25
6.3. MONITORAMENTO POR CROMATOGRAFIA GASOSA (GC)	27
6.4. QUANTIFICAÇÃO DO GENE MCRA	30
6.1. SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO V4-V5 DO GENE 16S rRNA.....	34
7. DISCUSSÃO	41
7.1. CARACTERIZAÇÃO DO SOLO.....	41
7.2. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS CULTIVOS ENRIQUECIDOS	41
7.3. MONITORAMENTO POR CROMATOGRAFIA GASOSA (GC)	41
7.4. QUANTIFICAÇÃO DO GENE MCRA	43
7.5. SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO V4-V5 DO GENE 16S rRNA.....	44
8. CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS	50

RESUMO

Comunidades de arqueias metanogênicas em diferentes usos dos solos da Amazônia

A conversão de áreas de florestas da Amazônia em áreas agrícolas e pastoris desregula processos relacionados ao estoque de carbono, sendo considerada depois da queima de combustíveis fósseis a atividade que mais contribui com a emissão de gases do efeito estufa, dentre os quais se encontra o metano. A produção de metano é intermediada pelas arqueias metanogênicas, que atuam na decomposição anaeróbia da matéria orgânica. Portanto, para compreender as alterações do fluxo desse gás no ecossistema amazônico, é necessário que as comunidades microbianas envolvidas nesse processo sejam estudadas. Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo monitorar e caracterizar comunidades de arqueias metanogênicas, por análises de enriquecimento destas comunidades, em amostras de solo provenientes de floresta primária, floresta secundária e pastagem da região amazônica. As amostras de solo foram colocadas em meio enriquecido com a adição de acetato, metanol ou H_2CO_2 , separadamente, para estimular os metabolismos acetilclástico, metilotrófico e hidrogenotrófico. O monitoramento desses cultivos foi realizado por análises de emissão de metano por cromatografia gasosa, quantificação do gene *mcrA* pela técnica de PCR quantitativo (*qPCR*) e caracterização da comunidade metanogênica por meio de microscopia e sequenciamento da região V4-V5 do gene 16S rRNA. Analisando a emissão de metano entre os três tipos de fontes de carbono para as três amostras de solo, os enriquecimentos com metanol apresentaram uma produção maior de metano em relação as amostras com o acetato e muito superior aos cultivos com atmosfera de H_2CO_2 . A maior média de produção de metano ocorreu nos enriquecimentos com metanol, indicando que a via metilotrófica embora considerada alternativa, pode ser importante na produção de metano no solo amazônico. Por meio da técnica de *qPCR* foi possível quantificar o gene *mcrA* das amostras de pastagens logo no tempo inicial da incubação, o que não foi possível para as amostras florestais. No tempo final, o número de cópias desse gene foi similar para os três perfis de solo. Foi possível observar pela caracterização fenotípica dos enriquecimentos agregados de células característicos do gênero *Methanosarcina*, gênero que foi identificado posteriormente pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, além de células em formatos de bastonetes e cocos. Os resultados do sequenciamento permitiram identificar 7 grupos distintos de arqueias metanogênicas, afiliados aos filos Euryarchaeota e Bathyarchaeota. Nas amostras iniciais de pastagens foram identificadas sequências que se afiliaram a todos esses grupos, enquanto as amostras florestais apresentaram sequências afiliadas apenas ao gênero *Methanosarcina*. A composição final da comunidade das amostras de pastagens foi similar a inicial, porém mais abundante. Os enriquecimentos de amostras de solo de floresta primária e secundária apresentaram uma composição distinta, devido ao enriquecimento de grupos que não foram identificados no início da incubação. Os resultados obtidos mostraram que embora as arqueias metanogênicas estejam em baixa abundância nos solos florestais, podem ser enriquecidos quando submetidos a condições favoráveis, atingindo produção de metano e alcançando composição similar as amostras de pastagens.

Palavras-chave: Enriquecimento; Metano; *mcrA*; 16S rRNA

ABSTRACT

Communities of methanogenic archaeas in different uses of Amazonian soils

Amazonian forest conversion into agricultural and livestock areas disrupts processes related to carbon stock, being considered, after the fossil fuels burning, the activity contributes most to greenhouse gases emission, of which is methane. Methane production is mediated by methanogenic archaea, acting in organic matter anaerobic decomposition. Therefore, to understand the changes in the flow of this gas in the Amazonian ecosystem, it is necessary to study microbial communities involved in this process. This study aims to monitor and characterize methanogenic archaeal communities by population enrichment from soil samples collected in primary, secondary and pasture of the Amazon region. Soil samples were placed into an enriched medium and received separately acetate, methanol, and $H_2:CO_2$ to stimulate the three metabolism types: acetoclastic, methylotrophic and hydrogenotrophic. Monitoring was performed by methane emission analysis by gas chromatography, *mcrA* quantification by the quantitative PCR and the community characterization was performed by microscopy and sequencing of the V4-V5 region of the 16S rRNA gene. Analyzing the methane emission by the three types of carbon sources in the three soil samples, methanol enrichments presented a higher methane yield than the acetate samples and much larger than cultures with $H_2:CO_2$. These results indicate that methylotrophic pathway, although considered as an alternative, may be important in methane production in the Amazonian soil. Was possible to quantify the *mcrA* gene by *qPCR* from pasture samples at the initial incubation time, which was not possible for forest samples. In incubation final time, copies number of this gene was similar for the three soil profiles. The phenotypic characterization of enrichments revealed aggregated cells, characteristic of the genus *Methanosarcina*, later identified by 16S rRNA sequencing. The cells in rod-shaped and cocci formats were also observed. Was identify by sequencing 7 different methanogenic archaeas groups affiliated with Euryarchaeota and Bathyarchaeota phylum. In the initial pasture samples, were identified sequences affiliated with all these groups, while forest samples presented sequences affiliated with only a *Methanosarcina* genus. Pasture samples showed a final community composition similar to initial, however more abundant. Soil samples enrichment from primary and secondary forest presented a distinct composition due to groups enrichment that was not identified at incubation beginning. These results showed that although methanogenic archaeas are in low abundance in forest soils, they can be enriched when submitted to favorable conditions, archive methane production and reaching similar composition pasture samples.

Keywords: Enrichment; Methane; *mcrA*; 16S rRNA

1. INTRODUÇÃO

A Floresta Amazônica, além de abrigar uma biodiversidade estimada em 25% de todas as espécies de plantas e animais terrestres do planeta (VERCHOT, 2010), também apresenta grande influência no clima global, regulando a temperatura, precipitação e a troca de gases atmosféricos (MALHI et al., 2008). Porém, dado o crescimento populacional, a expansão da agricultura e da exploração madeireira, as áreas florestais da Amazônia vêm sendo convertidas em pastos e lavouras (DAVIDSON et al., 2012). Essa mudança de uso do solo além de resultar na redução da biodiversidade, interfere negativamente na manutenção dos serviços ecossistêmicos (LIMA et al., 2013), alterando os ciclos biogeoquímicos e aumentando a emissão de gases de efeito estufa, como o dióxido de carbono (CO_2) e metano (CH_4) (GRACE; MITCHARD; GLOOR, 2014). O aumento na emissão desses gases pode ocorrer não só em resposta à queima da biomassa, mas também como consequência da diminuição do potencial de consumo de metano nas áreas manejadas para pastagem e agricultura (DÖRR; GLASER; KOLB, 2010).

O CH_4 está presente na atmosfera em concentrações menores que o CO_2 , porém apresenta potencial de retenção de radiação infravermelha 25 vezes maior que este (CIAIS et al., 2013). Esse gás é majoritariamente emitido por fontes biogênicas, mais especificamente, por microrganismos do domínio *Archaea*, denominadas arqueias metanogênicas, que atuam na etapa final da decomposição anaeróbia da matéria orgânica (HOFMANN et al., 2016).

A conversão de florestas em áreas de pastagem pode levar a uma homogeneização das comunidades microbianas (RODRIGUES et al., 2013). PAULA e colaboradores, 2014 verificaram que genes relacionados à oxidação do metano têm abundância reduzida em áreas que foram convertidas em pastagens, mas não determinaram esta correlação para genes envolvidos no processo da metanogênese. MEYER e colaboradores (2017) observaram que a abundância de microrganismos metanogênicos não difere em amostras de floresta primária, secundária e pastagem, no entanto verificaram diferenças na composição das comunidades.

Acredita-se que, em áreas de pastagem, diversos processos são diferenciados em relação à floresta, o que pode influenciar diretamente nas comunidades microbianas que participam da ciclagem do metano. Por exemplo, áreas de pastagem podem apresentar solos mais compactados, com menor difusão de oxigênio e consequente favorecimento da formação de microssítios anaeróbicos. Essa condição pode favorecer o aumento da atividade das comunidades metanogênicas (LAMMEL et al., 2015; PAULA et al., 2014; STEUDLER et al., 1996). Em condições de saturação de água, solos aerados de diferentes biomas apresentam potencial para produção de metano

(ANGEL; CLAUS; CONRAD, 2012; HOFMANN et al., 2016; NICOL; GLOVER; PROSSER, 2003; TEH; SILVER; CONRAD, 2005)

Apesar da importância, pouco se sabe sobre o papel ecológico dos microrganismos no fluxo de metano nos solos da Amazônia, principalmente em áreas sob mudança de uso do solo. Neste contexto, o cultivo microbiano permite que a ecologia e fisiologia de táxons individuais sejam estudados. Apenas dois trabalhos foram publicados utilizando o cultivo de arqueias metanogênicas provenientes de amostras ambientais da Amazônia: PAZINATO e colaboradores (2014) e GRAÇAS e colaboradores (2013). Os dois estudos estabeleceram cultivos com amostras de áreas alagadas, portanto não há trabalhos publicados que tenham cultivado microrganismos metanogênicos a partir de áreas florestais ou pastagens desse ecossistema.

Uma das limitações ao estudo destas comunidades em solos aerados é a baixa abundância destes organismos. Para superar esta dificuldade, uma das estratégias é o enriquecimento destas comunidades, promovido por incubação de amostras sob condições favoráveis ao processo de metanogênese. A partir de cultivos enriquecidos é possível monitorar alterações nas comunidades microbianas, estimar a produção de metano em enriquecimentos de diferentes origens, e até mesmo por metagenômica, recuperar genomas (GRAÇAS et al., 2013).

Dessa forma, o estudo das comunidades metanogênicas cultiváveis no contexto de mudança de uso do solo é importante para compreender como a pressão seletiva resultante deste processo, modula as comunidades das arqueias que produzem metano.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Impactos antrópicos na Amazônia

A floresta Amazônica é considerada a maior floresta tropical do planeta com extensão de aproximadamente 5,3 milhões de km², o que corresponde a 40% de área mundial de florestas tropicais (ARAGÃO et al., 2014; FUJISAKI et al., 2015; SOARES-FILHO et al., 2006). Esse ecossistema abriga a maior biodiversidade do planeta, estimada em 25% de todas as espécies de plantas e animais terrestres (MENDES et al., 2015; NEPSTAD et al., 2008). A Floresta Amazônica, além de abrigar uma enorme biodiversidade, também apresenta grande influência no clima global, regulando a temperatura, precipitação e a troca de gases atmosféricos. Cerca de oito trilhões de toneladas de vapor de água são lançados na atmosfera a cada ano, resultante da evapotranspiração das plantas. Ademais, a Bacia Amazônica é responsável pelo despejo de 15-20% de toda a água continental nos oceanos (DAVIDSON et al., 2012; NEPSTAD et al., 2008).

Apesar dessa reconhecida importância, o aumento populacional e a expansão das atividades agropastoris constituem ameaça constante à Amazônia, onde o desmatamento, ou seja, a conversão de regiões da floresta em pastagens e lavouras fragilizam a manutenção dos serviços ecossistêmicos por ela providos (DAVIDSON et al., 2012; LIMA et al., 2013). Localmente, o avanço do desmatamento gera fragmentação de habitat e perda da biodiversidade. Em escala global, esse processo causa um desequilíbrio hídrico em decorrência da redução da evapotranspiração, induzindo à diminuição do regime fluvial (FUJISAKI et al., 2015) e consequente degradação, alteração da umidade e do potencial hidrogeniônico (pH) do solo, impactando a microbiota edáfica.

Essa comunidade microbiana participa dos ciclos biogeoquímicos, produzindo metabólitos fundamentais para a ciclagem de nutrientes. Assim, qualquer alteração no uso do solo influencia diretamente na homeostase desses processos (MENDES et al., 2015; RODRIGUES et al., 2013). Em resumo, essa mudança de uso do solo além de resultar na redução da biodiversidade, interfere negativamente na manutenção dos serviços ecossistêmicos (LIMA et al., 2013), alterando os ciclos biogeoquímicos e aumentando a emissão de gases de efeito estufa, como o dióxido de carbono (CO₂) e metano (CH₄) (GRACE; MITCHARD; GLOOR, 2014). O aumento na emissão desses gases pode ocorrer não só em resposta à queima da biomassa, mas também como consequência do maior potencial de emissão de metano nas áreas manejadas para pastagem e agricultura (NAZARIES et al., 2013).

2.2. Ciclo do carbono e produção do metano

O carbono orgânico do solo representa 30 a 60% do estoque de carbono das florestas tropicais (NAVARRETE et al., 2016). Nesses ecossistemas, o carbono é depositado no solo via decomposição e exsudação de compostos orgânicos e retorna para a atmosfera pela respiração de organismos heterotróficos (MALHI; GRACE, 2000). Parte desse carbono estocado é liberada para atmosfera quando ocorrem mudanças no uso do solo, como por exemplo, pela conversão de áreas naturais em pastagens e áreas de cultivo. Essa atividade é a segunda que mais contribui para o desequilíbrio desse ciclo, ficando atrás apenas da queima de combustíveis fósseis (GRACE; MITCHARD; GLOOR, 2014).

Embora o metano esteja presente na atmosfera em menores concentrações que o dióxido de carbono, este tem potencial de retenção de radiação infravermelha 25 vezes maior (CIAIS et al., 2013). Esse gás é emitido majoritariamente de fontes biogênicas, produzido pelos microrganismos do domínio *Archaea*. As arqueias metanogênicas atuam na etapa final da decomposição anaeróbia da matéria orgânica (HOFMANN et al., 2016).

2.3. Arqueias metanogênicas

As arqueias metanogênicas são microrganismos anaeróbios estritos que utilizam compostos simples de carbono resultantes da degradação anaeróbica da matéria orgânica, produzindo metano como um resíduo da respiração (NARIHIRO; SEKIGUCHI, 2011). Por metabolizarem uma gama restrita de compostos, esse processo é dependente de microrganismos sintróficos, que degradam compostos complexos em substratos simples de carbono, como o CO₂, acetato e compostos que contêm grupos metil, permitindo que sejam utilizados pelos microrganismos metanogênicos (NAKAYAMA et al., 2011).

As arqueias metanogênicas estão distribuídas em sete ordens do filo Euryarcheota: Methanosarcinales, Methanobacteriales, Methanomicrobiales, Methanococcales, Methanopyrales, Methanocellales e Methanomassiliicoccales (LANG et al., 2015), no filo Bathyarchaeota (EVANS et al., 2015) e no filo Verstraetearchaeota (VANWONTERGHEM et al., 2016). São conhecidas diferentes vias de produção de metano dentre os microrganismos metanogênicos.

A via hidrogenotrófica é desempenhada pelos microrganismos que reduzem o CO₂ a CH₄ utilizando principalmente o hidrogênio (H₂) como doador de elétrons, podendo também ser utilizado o formato e álcoois secundários para essa finalidade (LIU; WHITMAN, 2008). Essa via metabólica é desempenhada pela maioria dos gêneros de arqueias metanogênicas, com exceção de Methanomassiliicoccales (LANG et al., 2015).

A via acetoclástica é a responsável pela produção de dois terços do metano emitido anualmente (FOURNIER; GOGARTEN, 2008). Essa via é realizada pelas arqueias da ordem Methanosarcinales, em que o acetato é clivado em um grupo carboxílico que é oxidado a CO_2 e em um grupo metil que é reduzido a CH_4 , em duas reações enzimáticas homólogas as duas últimas etapas da via hidrogenotrófica (BAPTESTE; BROCHIER; BOUCHER, 2005; CONRAD, 2007).

Compostos contendo grupos metil, como metilaminas e metanol também são utilizados como substratos pelas arqueias metanogênicas (LIU; WHITMAN, 2008). Os microrganismos que possuem essa via metabólica são denominados metilotróficos e pertencem as ordens Methanosarcinales, Methanobacteriales e Methanomassiliicoccales, sendo que os genomas pertencentes ao filo Verstraetearchaeota apresentam genes associado a essa via metanogênica (VANWONTERGHEM et al., 2016).

No processo de geração de metano, a partir de todos estes precursores, a enzima metilcoenzima M redutase (MRT) possui papel essencial, participando da última etapa da metanogênese. O gene *mcrA* codifica a subunidade alfa da MRT e está presente exclusivamente nas arqueias metanogênicas (ARONSON; ALLISON; HELLIKER, 2013). Por ser um gene conservado dentre os organismos metanogênicos, este é utilizado como base para os métodos independentes de cultivo, sendo importante como marcador funcional, possibilitando detecção, quantificação e classificação desses organismos metanogênicos em diferentes ambientes (LUTON et al., 2002).

Embora o processo de metanogênese seja anaeróbico com predomínio em ambientes anóxicos, solos aerados quando incubados em condições anóxicas passam a emitir metano. Essa capacidade foi demonstrada em solos florestais de coníferas, pradarias, desertos, florestas tropicais e pastagens (ANGEL; CLAUS; CONRAD, 2012; HOFMANN et al., 2016). TEH e colaboradores (2005) verificaram em experimentos de incubação que houve produção de metano em solo de floresta tropical em Puerto Rico, em frascos que tinham até 19% de oxigênio (O_2) na atmosfera. Em pastagens também foi verificado a produção de metano por solos incubados em condições anóxicas, o que confirma a presença de arqueias metanogênicas nesses ambientes e o potencial de produção de metano por esses dois tipos de solos (NICOL; GLOVER; PROSSER, 2003).

2.4. Arquéias metanogênicas cultivadas de solo da Amazônia

O conhecimento sobre as arqueias metanogênicas é gerado em grande parte pelas técnicas independentes de cultivo, principalmente devido à dificuldade em manter condições anaeróbias para o cultivo desses microrganismos em laboratório (STEINBERG; REGAN, 2008). No

entanto, o cultivo é importante para explorar informações sobre fisiologia e ecologia dos diferentes grupos de arqueias com esta habilidade.

Há poucos trabalhos que estudaram a comunidade cultivável de arqueias metanogênicas no ambiente amazônico. PAZINATO e colaboradores (2010) fizeram enriquecimento, e posterior isolamento de organismos metanogênicos de áreas de várzea da Amazônia oriental. Esse trabalho isolou arqueias dos gêneros *Methanosarcina* e *Methanobacterium* e foi o primeiro a obter isolados metanogênicos em amostras de sedimento da Amazônia.

GRAÇAS e colaboradores (2013) isolaram e sequenciaram o genoma completo da espécie *Methanosarcina mazei*, estirpe que foi isolada de amostras do reservatório da hidrelétrica de Tucuruí, no estado Pará. Esse trabalho foi o primeiro a obter o genoma completo de um microrganismo do domínio *Archaea* proveniente de amostras ambientais do Brasil. Ambos os trabalhos obtiveram comunidades cultiváveis de áreas alagadas da Amazônia, no entanto não foram encontrados estudos que exploraram arqueias metanogênicas em solos aerados desse ecossistema.

Embora estudos prévios apontem que a abundância de genes relacionado com metanogênese não seja modificada pela mudança de uso do solo, a baixa difusão de oxigênio no solo de pastagens pode favorecer a atividade dos microrganismos que produzem metano (PAULA et al., 2014). No entanto, não há estudos que exploraram a ecologia e fisiologia desses microrganismos, no contexto de mudança do uso do solo.

3. OBJETIVO

Compreender como as características das comunidades de arqueias metanogênicas enriquecidas de solo provenientes da Floresta Amazônica são moldadas pelos processos de desmatamento (pastagem) e processo de recuperação dessas áreas (floresta secundária).

3.1. Objetivos específicos

- (i) Avaliar se as amostras enriquecidas dos solos de floresta primária, floresta secundária e pastagem apresentam diferenças quanto a produção de metano e abundância de cópias do gene *mcrA*;
- (ii) Analisar se a estrutura e a composição da comunidade das amostras enriquecidas são alteradas pelos processos de desmatamento e recuperação das áreas de florestas;
- (iii) Analisar se a estrutura e a composição da comunidade de arqueias metanogênicas são moldados pelo composto de carbono utilizado no enriquecimento.

4. HIPÓTESES

- (i) As amostras provenientes da pastagem apresentarão produção maior de metano durante o monitoramento do enriquecimento; possuirão maior número de cópias do gene *mcrA*; e composição distinta da comunidade de arqueias metanogênicas quando comparados com amostras provenientes de floresta primária;
- (ii) As comunidades de arqueias metanogênicas terão a estrutura e composição diferentes para cada um dos três substratos de carbono utilizado no enriquecimento.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Coleta das amostras

Este trabalho está ligado ao Projeto Temático financiado pela FAPESP “Dimensões US-BIOTA-São Paulo: Integrando as dimensões da biodiversidade microbiana ao longo de áreas de alteração do uso da terra em florestas tropicais” (processo 2014/50320-4). Dessa forma, as amostras que foram utilizadas são as mesmas usadas nas demais análises que estão sendo desenvolvidas no referente projeto.

As amostras foram coletadas no município de Santarém no estado do Pará, onde a Floresta Nacional dos Tapajós (TNF) (km 67, 54° 58'W, 2° 51'S) é um núcleo de floresta primária. A região em torno da TNF apresenta áreas onde ocorreram mudanças de uso no solo, constituindo um mosaico de áreas de cultivos agrícolas, pastagens e florestas secundárias. (RICE et al., 2004; WICK et al., 2005).

As coletas foram realizadas em uma área de cada um desses perfis, Floresta Primária (km 67), Pastagem (km 92) e Floresta Secundária (km 108) (Figura 1). Em cada área de coleta foi traçado uma reta com 5 pontos equidistantes (50 m). Desses, 3 pontos foram escolhidos em cada perfil, onde cilindros de PVC com 3 cm de diâmetro e 10 cm de comprimento foram inseridos verticalmente no solo, portanto o solo foi coletado em 10 cm de profundidade. Os cilindros foram retirados e fechados com tampas nas duas extremidades para manter a estrutura da amostra durante o transporte (PAZINATO et al., 2010) (Figura 2).

Figura 1. Fotos das áreas de coleta. (a) Floresta Primária. (b) Floresta Secundária. (c) Pastagem

Figura 2. Amostragem. (a) Diagrama que representa a escolha dos pontos coletados (b) Tubo de PVC fechado nas extremidades contendo amostras de solo.

5.2. Fluxograma das atividades

Para melhor a visualização das etapas do trabalho, foi elaborado um fluxograma com a sequência das atividades realizadas.

Figura 3. Fluxograma de atividades.

5.3. Caracterização física das amostras de solo

Para a análise de densidade total do solo as amostras foram coletadas utilizando um volumétrico (anel de Kopeck) de 50 cm³ com bordas cortantes. O anel foi enterrado no solo e o excesso de amostras nas superfícies do anel foi retirado com o auxílio de uma faca. As amostras

foram encaminhadas para o Departamento de Solo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”-Universidade de São Paulo, para a realização do cálculo de densidade.

5.4. Enriquecimento

Para o estudo da composição e da estrutura das comunidades metanogênicas presentes nas três áreas, as amostras foram submetidas ao enriquecimento, utilizando meios de cultivo específicos para estimular a multiplicação das populações de arqueias metanogênicas. Essa etapa, em conjunto com a incubação e monitoramento por cromatografia gasosa foram realizadas no Laboratório de Ecologia Microbiana (LECOM)-Instituto Oceanográfico-Universidade de São Paulo, coordenado pela Professora Dr^a Vivian H. Pellizari, sob supervisão da Professora Dr^a Cristina Rossi Nakayama.

As amostras de solo foram colocadas em Meio Basal Zinder (NH_4Cl : 0,5g; KH_2PO_4 : 0,4g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0,1g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,05g; 1000 ml de água deionizada) (ZINDER; KOCH, 1984). A água primeiramente foi fervida por 5 minutos para eliminar parte do oxigênio (O_2) e colocado sobre fluxo de nitrogênio (N_2) 100% por 20 minutos. Os reagentes prescritos anteriormente foram adicionados juntamente com 1 ml de resazurina, que é o indicador de óxido-redução. Uma quantidade de 47 ml de meio foi distribuída em frascos de antibióticos com capacidade para 100 ml sob atmosfera de $\text{N}_2:\text{CO}_2$ na proporção 70:20 e posteriormente foram fechados com tampas de butila e vedados com lacre de alumínio. Os frascos foram autoclavados a 121°C e posteriormente foi adicionado ao meio 0,5 ml de solução de vitaminas; 0,5 ml de solução traço metais; 0,5 ml solução de bicarbonato de sódio 10% para tamponar o meio e 1 ml de solução redutora cisteína $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$. Como fontes de carbono foi utilizado 0,5 ml de acetato 2 mol.L^{-1} , 0,5 ml de metanol 2 mol.L^{-1} e atmosfera de hidrogênio (H_2) e dióxido de carbono (CO_2) na proporção 80:20.

As amostras de solo foram pesadas e 5 g foram adicionadas nos frascos contendo meio previamente autoclavado e reduzido pela adição de cisteína (Figura 4). Todas as amostras receberam separadamente uma fonte de carbono, para estimular os três tipos de metabolismo (acetoclástico, metilotrófico e hidrogenotrófico). A atmosfera dos recipientes foi formada utilizando o Sistema de Distribuição Simultânea de Gases, os frascos que tiveram como fonte de carbono o dióxido de carbono receberam atmosfera gasosa de $\text{H}_2:\text{CO}_2$ na proporção de 80:20, e aos outros que receberam acetato e metanol como fonte de carbono, foi adicionado $\text{N}_2:\text{CO}_2$. Os frascos com as amostras inoculadas foram mantidos em Câmara de Crescimento a 30°C sem agitação.

Figura 4. Preparo do enriquecimento das amostras. (a) Meio autoclavado e reduzido pela adição de cisteína. (b) Pesagem do solo para adição no meio de enriquecimento sob fluxo de N_2 . (c) Amostras de solo adicionada nos frascos e fechadas com tampas de butila e lacres de alumínio.

Figura 5. Sistema de distribuição de gases, pertencente ao Laboratório de Ecologia Microbiana (LECOM)-Instituto Oceanográfico-Universidade de São Paulo

5.5. Monitoramento da produção de metano por cromatografia gasosa (GC)

O monitoramento dos cultivos enriquecidos foi realizado por meio de cromatografia gasosa, que permite mensurar o potencial de produção de metano por amostras de solos incubados em condições anóxicas (ANGEL; CLAUS; CONRAD, 2012; HOFMANN et al., 2016). Também é um método indireto para verificar as fases de crescimento das comunidades enriquecidas, auxiliando na escolha dos períodos para o repique e/ou a realimentação dos cultivos. Os enriquecimentos tiveram a emissão de metano mensurada inicialmente a cada 7 dias. Para isso, uma alíquota de 100 μ L da atmosfera dos frascos foi retirada com o auxílio de seringa descartável de insulina e injetada imediatamente no cromatógrafo a gás modelo Agilent® HP6890N. A concentração de metano emitido foi obtida por meio da equação: $y = \frac{4,44196x}{z}$ onde x= área do pico cromatográfico da amostra; z= área padrão que foi determinada pela média de 5 injeções consecutivas de metano com desvio padrão inferior a 1% e y= a concentração de metano expresso em mmol.

(NAKAYAMA et al., 2011). Com os resultados das concentrações, em mmol, de metano emitido foram construídos gráficos de emissão de metano dos cultivos enriquecidos.

5.6. Caracterização morfológica do cultivo enriquecido

As arqueias metanogênicas possuem a coenzima F_{420} , específica desse grupo de microrganismos e que está diretamente envolvida com a produção de metano (BERK; THAUER, 1997). Essa coenzima exibe fluorescência sob a luz UV (ultravioleta). Devido a esta característica, foi utilizada Microscopia de Fluorescência e também Microscopia de Contraste de Fase para caracterizar morfológicamente as células de arqueias presentes nos cultivos que foram enriquecidos (PAZINATO et al., 2010).

5.7. Extração de DNA do cultivo enriquecido

Durante o período de monitoramento do cultivo enriquecido, as alíquotas para extração de DNA foram coletadas nos tempos 0,15, 28 e 63 dias de enriquecimento. A extração de DNA das amostras foi feita com auxílio do kit comercial de isolamento de DNA *DNA PowerSoil* (Mo-BioLabs, Inc. Solana Beach, USA) acrescido de uma etapa de centrifugação de 4 min a 13.000 rpm para que amostra fosse sedimentada no fundo do microtubo e também da adição de *beads* de vidro ao tudo de *beads* para que as células fossem mais eficientemente rompidas. O *pellet* formado com a centrifugação foi resuspenso com o tampão contido nos tubos de *beads*. As demais etapas da extração seguiram o protocolo estabelecido pelo fabricante. O DNA obtido foi utilizado para quantificação das amostras de enriquecimentos por PCR em tempo real (*qPCR*) e posterior amplificação e sequenciamento da região V4-5 do gene 16SrRNA. O produto extraído foi verificado por meio de eletroforese em gel de agarose 1,0 % (p/v) com tampão TAE 1X (400 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1 mM EDTA) juntamente com o peso molecular *GeneRuler DNA Ladder 1kb* (Invitrogen) e 4µl do padrão molecular *Lowmass DNA Ladder* (Invitrogen Technology).

5.8. Quantificação das comunidades metanogênicas presente no enriquecimento por PCR em tempo real (*qPCR*)

Para a quantificação das comunidades de arqueias metanogênicas foi realizada a técnica de *qPCR*, utilizando como sistema de detecção o Sybr Green I. As reações foram realizadas no equipamento Real-Time PCR System StepOne (Applied Biosystems), com um volume de 10µL

contendo 6 μ L do kit SYBR® Green PCR MasterMix (Life Technologies™), 0,5 mM de $MgCl_2$, 400 μ g/ml Bovine Serum Albumin (Roche®), 1 μ L de DNA da amostra e 2,5 pmol dos oligonucleotídeos mlas-F (GGT GGT GTM GGD TTC ACM CAR TA) e mcrA-R (CGT TCA TBG CGT AGT TVG GRT AGT) para amplificação do gene funcional *mcrA*. As condições de amplificação seguiram o protocolo: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C a 30 segundos. Para a quantificação, foi realizada uma curva padrão utilizando o produto purificado de 9 clones contendo o gene *mcrA* proveniente de uma amostra de enriquecimento. Com isto, espera-se determinar a eficiência da quantificação, bem como o valor de regressão logarítmica das diluições utilizadas (R^2). Com os sistemas válidos, os valores obtidos para cada amostra em cada uma das reações foram utilizados para a quantificação absoluta do gene de interesse nos enriquecimentos.

5.9. Sequenciamento da região V4-V5 do gene 16S rRNA

Para a caracterização das comunidades presentes no enriquecimento foi realizado amplificação e posterior sequenciamento do gene ribossomal 16S. As amostras foram amplificadas em triplicatas, utilizando os oligonucleotídeos 515F (5'-GTG YCA GCM GCC GCG GTAA-3') e 926R (5'-CCG YCA ATT YMT TTR AG TTT-3') (WALTERS et al., 2016). A reação e as condições de amplificação foram realizadas seguindo o protocolo de amplificação 16S rRNA proposto pelo Earth Microbiome (<http://www.earthmicrobiome.org/emp-standard-protocols/16s/>). Os produtos das amplificações foram purificados utilizando o kit MoBio Ultra Clean PCR Clean Up®, agrupadas em concentrações equimolares e posteriormente enviadas para a FIOCRUZ-MINAS onde foram sequenciados em Illumina MiSeq (Illumina, USA). A análise dos dados foi realizada seguindo as recomendações do Brazilian Microbiome Project (PYLRO et al., 2014) utilizando-se o sistema BMPOS (PYLRO et al., 2016).

6. RESULTADOS

6.1. Caracterização do solo

Dentre os atributos químicos e físicos avaliados a densidade apresentou a maior diferença entre as amostras. Os valores de densidade e porosidade total do solo (%) mostraram que as amostras de pastagens são as mais compactadas, as amostras de floresta primária apresentaram valores intermediários de densidade e porosidade, sendo que os solos de floresta primária apresentaram os menores valores.

Tabela 1. Média de densidade g.cm-3 e Porosidade total (%) dos três perfis de solo (0-10 cm).

Amostra	Média $\pm$ desvio padrão	
	Densidade (g.cm ⁻³)	Porosidade total (%)
Floresta Primária	0,83 $\pm$ 0,03 c*	65,83 $\pm$ 0,006 a
Floresta Secundária	1,04 $\pm$ 0,08 b	58,01 $\pm$ 0,03 b
Pastagem	1,40 $\pm$ 0,03 a	47,33 $\pm$ 0,01 c

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula não demonstram diferenças significativa pelo teste de Tukey (p<0.05)

6.2. Caracterização morfológica dos cultivos enriquecidos

Dentre as imagens das lâminas observadas, foram escolhidas duas com boa qualidade e que representam as estruturas celulares que foram observadas na maioria dos cultivos enriquecidos. Foi encontrado nos enriquecimentos de solos das florestas e da pastagem a presença de agregados de células, que exibiram em coloração azul-esverdeada na microscopia de fluorescência (Figura 6).

Figura 6. Agregado de células. Imagem obtida do enriquecimento de amostra de solo de floresta primária com acetato como fonte de carbono. a) microscopia de contraste de fase. b) microscopia de fluorescência a 420nm. Aumento 1000x

Também foram encontrados nos enriquecimentos células em forma de bacilos e cocos, que também exibiram fluorescência no comprimento de 420nm (Figura 7).

Figura 7. Presença de estruturas celulares em forma de bastonetes e cocos. Imagem do enriquecimento de amostra de solo de floresta secundária com acetato como fonte de carbono. a) microscopia de contraste de fase. b) microscopia de fluorescência a 420nm. Aumento 1000x.

6.3. Monitoramento por cromatografia gasosa (GC)

Observando as médias de produção de metano, em 63 dias de incubação, pelos enriquecimentos para as três áreas com acetato como substrato temos os valores de 0,5638 mmol de CH_4 para floresta primária; 0,8028 mmol de CH_4 para floresta secundária e 1,1321 mmol de CH_4 para pastagem. Analisando a produção pelos enriquecimentos com metanol como fonte de carbono os valores obtidos foram: 1,1006 mmol de CH_4 para amostras de floresta primária; 1,1748 mmol de CH_4 produzidos pelas amostras de floresta secundária e 1,35279241 mmol de CH_4 pelas amostras de pastagem. Para os enriquecimentos que receberam o H_2CO_2 foram obtidos os valores de emissão de 0,1043 mmol de CH_4 em floresta primária; 0,2960 mmol de CH_4 floresta secundária e 0,5870 mmol de CH_4 amostra de pastagem (Figura 8).

Figura 8. Produção média de CH_4 em 63 dias enriquecimento nos três perfis para cada fonte de carbono utilizada. a) Acetato b) Metanol e c) Atmosfera de H_2CO_2 . FP: Floresta Primária; FS: Floresta Secundária e P: Pastagem.

Analisando a emissão de metano ao longo das medições pelos três perfis de solo enriquecidos com acetato, foi observado uma produção maior de metano em pastagem que floresta

primária e secundária principalmente nas quatro primeiras mensurações (Figura 9).

Figura 9. Produção de metano (CH_4 mmol) pelos enriquecimentos de Floresta Primária, Floresta Secundária e Pastagem com adição de acetato como fonte de carbono.

Avaliando as emissões de metano pelos enriquecimentos que receberam metanol como fonte de carbono, foi observado um início mais rápido da emissão de metano, de maneira oposta ao observado para as diferentes das amostras que receberam acetato. As amostras de floresta primária enriquecidas com acetato apresentaram uma produção média de 0,05 mmol de CH_4 na primeira leitura aos 28 dias, as amostras de floresta secundária produziram 0,17 mmol de CH_4 e as amostras de pastagens produziram 0,78 mmol de CH_4 . Enquanto as amostras com metanol apresentam uma maior produção do gás, sendo de 0,64 mmol a emissão média de metano das amostras de floresta primária; 1,0 mmol de CH_4 para as amostras de floresta secundária e 1,50 mmol de CH_4 para as amostras de pastagens (Figura 10).

Figura 10. Produção de metano (CH_4 mmol) pelos enriquecimentos de Floresta Primária (FP), Floresta Secundária (FS) e Pastagem (P) com adição de metanol como fonte de carbono.

Os cultivos enriquecidos com $\text{H}_2\text{:CO}_2$ as amostras de pastagem apresentaram também uma maior produção de gás comparado às amostras de florestas. Essa diferença foi acentuada nas últimas mensurações de metano (Figura 11).

Figura 11. Produção de metano (CH_4 mmol) pelos enriquecimentos de Floresta Primária (FP), Floresta Secundária (FS) e Pastagem (P) com atmosfera de $\text{H}_2\text{:CO}_2$ como fonte de carbono

6.4. Quantificação do gene *mcrA*

No tempo 0 dos enriquecimentos com acetato como substrato foi possível quantificar cópias do gene *mcrA* em duas réplicas da amostra de pastagem (média= 4,59 log/ml, n=2), na terceira réplica e nas demais amostras de floresta primária e secundária não foi possível quantificar o número de cópias do gene (Figura 12 a). Aos 15 dias de enriquecimento foi detectado resposta para as três réplicas de pastagem (média= 4,78 log/ml; n=3) e também a primeira quantificação da amostra de floresta secundária com uma réplica apresentando 4,53 log/ml de enriquecimento (Figura 12 b).

No tempo de 28 dias a pastagem apresentou média=7,55 log/ml (n=3). As três réplicas de floresta secundária apresentaram resposta nesse período (média= 6,95; n=3) e também foi possível quantificar uma réplica de floresta primária 4,36 log/ml (Figura 12 c). Aos 63 dias as amostras de pastagem tiveram como número de cópias 7,34 log/ml; n=3. A floresta secundária apresentou a maior quantificação 7,76 log/ml; n=3 e a menor quantificação foi encontrada para as amostras de floresta primária 6,57 log/ml; n=3, período em que foi possível quantificar o número de cópias de *mcrA* para as três réplicas desse perfil (Figura 12 d). Aos 63 dias o número de cópias de *mcrA* acumulado pelos enriquecimentos dos três perfis não pode ser considerado diferente pelo teste F ($p = 0,28$)

Figura 12. Número de cópias do gene *mcrA* em 1ml de cultivo enriquecido de Floresta Primária (FP), Floresta Secundária (FS) e Pastagem (P) com acetato como substrato de carbono. a) tempo 0 b) tempo 15 c) tempo 28 d) tempo 63

No tempo inicial dos enriquecimentos com metanol como fonte de carbono foi possível quantificar o número de cópias do gene *mcrA* em duas réplicas da amostra de solo de pastagem (média 4,10 log/ml, n=2), o que não foi possível para as amostras provenientes das floresta primária e secundária (Figura 13 a). Aos 15 dias de enriquecimento foi possível identificar que as três réplicas de pastagem enriqueceram em número de cópias de *mcrA* (média=7,31 log/ml; n=3). As amostras provenientes da floresta secundária com esse mesmo período de enriquecimento apresentaram duas réplicas com respostas (5,81 log/ml; n=2). Enquanto uma réplica de floresta primária teve o número de cópias quantificado 5,76 log/ml (n=1) (Figura 13 b).

Aos 28 dias a resposta das amostras de pastagem foi de 6,57, n=3 e o número de cópias em floresta secundária foi de 7,69, n=3. O resultado obtido para floresta primária nesse período foi de 7,46, n=2; sendo possível obter o resultado de quantificação para duas réplicas (Figura 13

c). Aos 63 dias todas as réplicas dos três perfis apresentaram resposta. A quantificação do número de cópias em pastagem foi de 7,34, n=3; floresta secundária 7,13, n=3 e floresta primária foi de n=7,14, n=3 (Figura 13 d). Foi realizado o teste F de médias para o tempo 63 que indicou que as médias não podem ser consideradas diferentes ($p = 0,89$).

Figura 13. Número de cópias do gene *mcrA* em 1ml de cultivo enriquecido de Floresta Primária (FP), Floresta Secundária (FS) e Pastagem (P) com metanol como substrato de carbono. a) tempo 0 b) tempo 15 c) tempo 28 d) tempo 63

No tempo 0 dos enriquecimentos com atmosfera de H_2CO_2 foi possível quantificar o número de cópias do gene *mcrA* para duas réplicas da amostra de solo de pastagem (média= 4,31; n=2), não sendo possível quantificar o número de cópias para as amostras de floresta primária e secundária (Figura 14 a). No tempo 15 nas mesmas réplicas da pastagem foi possível quantificar

cópias do gene *mcrA* (média =4,67; n=2). A amostra de floresta secundária obteve a primeira resposta nesse período, com uma réplica apresentou quantificação 7,30 log/ml; n=1 (Figura 14b)

Aos 28 dias as triplicatas da amostra de pastagem apresentaram quantificação média de cópias do gene de 5,60 log/ml; n=3. Nesse período a mesma réplica de floresta secundária foi quantificada, porém com um valor inferior de 5,23 log/ml (n=1). Duas réplicas de floresta primária tiveram o número de cópias quantificados nesse período (média=3,88 log/ml; n=2) (Figura 14 c). No tempo de 63 dias a amostra de pastagem apresentou uma média de número de cópias do gene *mcrA* de 7,18 log/ml; n=3. A amostra de floresta secundária obteve média de 6,00 log/ml; n=3 e a amostra de floresta primária apresentou um número médio de cópias de 6,18 log/ml; n=3 (Figura 14 d). O teste F mostrou que a diferença entre as amostras nesse período não foi significativa ($p=0,48$).

Figura 14. Número de cópias do gene *mcrA* em 1ml de cultivo enriquecido de Floresta Primária (FP), Floresta Secundária (FS) e Pastagem (P) com atmosfera de H₂:CO₂ como substrato de carbono. a) tempo 0 b) tempo 15 c) tempo 28 d) tempo 63

6.1. Sequenciamento da região V4-V5 do gene 16S rRNA

As sequências de arqueias metanogênicas recuperadas dos enriquecimentos se afiliaram o filo Bathyarchaeota (uncultured archaeon e other)(EVANS et al., 2015) e ao filo Euryarchaeota sendo da família Methanocellaceae o gênero *Methanocella* e Rice Cluster I(CONRAD; ERKEL; LIESACK, 2006) , *Metanosarcina* sp. da família Metanosarcinaceae, *Methanobacterium* da família *Methanomicrobiaceae* (NARIHIRO; SEKIGUCHI, 2011)e *Methanomassiliicoccus* da família Methanomassiliicoccaceae (IINO et al., 2013).

O tempo 0 de todos os enriquecimentos foi obtido pela extração de DNA logo após a inoculação do solo em meio enriquecido, dessa forma foi realizada uma caracterização dos três tipos solo antes de serem submetidos a incubação. Analisando arqueias metanogênicas das amostras iniciais de floresta primária foi possível identificar a presença do gênero *Metanosarcina* (0,001%) e do filo Bathyarchaeota (0,0005%). As amostras de floresta secundária apresentaram sequências filiadas a Bathyarchaeota, other (0,001%), ao gênero *Metanosarcina* (0,001%) e *Methanomassiliicoccus* (0,0002%). Enquanto nas amostras de pastagens foram encontradas sequências afiliadas a todos os grupos de arqueias metanogênicas identificadas: Bathyarchaeota-uncultured archaeon (0,001%); *Methanocella* (0,005%); Metanocellaceae-Rice Cluster I (0,005%); *Methanomassiliicoccus* (0,005%); *Methanobacterium* (0,007%); *Metanosarcina* (0,03) e Bathyarchaeota-other (0,08%).

Analisando as amostras de floresta primária enriquecidas com acetato pode ser observado que a abundância relativa do gênero *Metanosarcina* apresentou aumento aos 28 dias de incubação (0,012%) atingindo a abundância de 2,82% aos 63 dias. Nesse mesmo período pode ser identificado arqueias do gênero *Methanomassiliicoccus* (0,15%), Methanocellaceae- Rice Cluster I (0,21%) e do filo Bathyarchaeota-other (0,19%) (Figura 15 a). As amostras de florestas secundária apresentaram variação aos 28 dias com o gênero *Metanosarcina* apresentando abundância relativa de 3,65% e 4,95% aos 63 dias. No tempo final de incubação também pode ser identificado sequências afiliadas a Bathyarchaeota-uncultured archaeon (0,043%); *Methanomassiliicoccus* (0,279%); *Methanocella* (0,386%) e Methanocellaceae-Rice Cluster I (1,10%) (Figura 15 b). Para as amostras de pastagens enriquecidas com acetato a abundância relativa dos grupos apresentou variação aos 28 dias, principalmente para o gênero *Metanosarcina* (2,99%). Aos 63 dias o menor valor foi observado para Bathyarchaeota-uncultured archaeon (0,007%) e o maior valor para *Methanobacterium* (1,294%) (Figura 15 c). Foi realizada uma Análise de Coordenada principais (PCoA) para a comunidade total enriquecida com acetato, em que pode ser observado que as amostras de floresta primária e secundária se sobrepõem final da incubação e continuam diferentes das amostras provenientes das pastagens (Figura 16).

Figura 15. Arquêias metanogênicas presentes nos enriquecimentos e estruturação da comunidade total nos tempos 0,15,28 e 63 com acetato como fonte de carbono a) Floresta Primária b) Floresta Secundária c) Pastagem.

Figura 16. Análise de coordenadas principais (PCoA). Análise de coordenadas principais (PCoA) dos enriquecimentos de amostras de floresta primária, floresta secundária e pastagem com acetato como fonte de carbono. Os pontos circulos são as amostras pertencentes ao tempo 0.

No tempo 15 do enriquecimento de floresta primária com metanol como fonte de carbono, o gênero *Methanosarcina* apresentou um aumento da abundância relativa (0,18%) comparado o tempo inicial que apresentou abundância de 0,001%. No tempo 28 esse gênero obteve a maior abundância relativa (4,14%) decaindo no tempo 63 (1,39%). As arqueias metanogênicas que enriqueceram no tempo final foi Bathyarchaeota-other; (0,08%) *Methanocella* (0,001%); Methanocellaceae-Rice cluster I (0,87%) e *Methanomassiliicoccus* (0,17%) (Figura 17 a). Aos 15 dias os enriquecimentos de floresta secundária apresentaram abundância relativa de 3,39% para *Methanosarcina*; 7,55% aos 28 dias e 1,87% aos 63 dias. No tempo final da incubação houve aumento na abundância de outros gêneros: 0,10% de *Methanocella* e Methanocellaceae-Rice cluster I e 0,320% de *Methanomassiliicoccus*. (Figura 17 b). As amostras de pastagens apresentaram aos 15 dias enriquecimento expressivo do gênero *Methanosarcina*: 7,08% seguindo por um decréscimo na abundância relativa aos 28 dias 0,35% e aos 63 dias 0,29%. Os demais grupos apresentaram aumento no tempo final do enriquecimento que variou de 0,045% (Bathyarchaeota-uncultured archaeon) à 0,46% Bathyarchaeota- other). (Figura 17 c). Pelo gráfico da Análise de Coordenada principais (PCoA), pode ser observado que o metanol nos tempos finais do enriquecimento levou a uma sobreposição dos três perfis de solo, o que não ocorreu com os enriquecimentos em que foi utilizado o acetato como fonte de carbono (Figura 18).

Figura 17. Arquéias metanogênicas presentes nos enriquecimentos e estruturação da comunidade total nos tempos 0,15,28 e 63 com metanol como substrato de carbono a) Floresta Primária b) Floresta Secundária c) Pastagem

Figura 18. Análise de coordenadas principais (PCoA) dos enriquecimentos de amostras de floresta primária, floresta secundária e pastagem com metanol como fonte de carbono. Os pontos circulado são as amostras pertencentes ao tempo 0.

Os enriquecimentos de amostra de solo de floresta primária com atmosfera de $H_2:CO_2$ apresentaram aumento da abundância relativa dos microrganismos metanogênicos aos 63 dias, sendo os gêneros *Methanosarcina* (1,39%); Methanocellaceae Rice cluster I (0,87%) e *Methanomassiliicoccus* (0,17%) (Figura 19 a). Aos 15 dias os enriquecimentos de floresta secundária apresentaram a média de 3,23% de abundância relativa para o gênero *Methanosarcina*, aos 28 dias 0,27% e aos 63 dias essa abundância foi de 0,488%. Os demais grupos enriquecidos aos 63 dias de incubação foram: Methanocella Rice Cluster I (0,1%) Bathyarchaeota- other (0,06%), *Methanomassiliicoccus* (0,05%) e *Methanocella* (0,02%) (Figura 19 b). As amostras de pastagens apresentaram aos 15 dias um enriquecimento inferior do gênero *Methanosarcina* (0,019%) comparado as amostras de floresta secundária do mesmo período, aumentando para 0,32% aos 28 dias e alcançando a abundância de 1,72% aos 63 dias. Os grupos que apresentaram enriquecimento nesse período foram: Bathyarchaeota-unculture archaeon (0,02%); Bathyarchaeota-other (0,50%); *Methanobacterium* (0,10%); Methanocellaceae-Rice Cluster I (0,04%) e *Methanomassiliicoccus* (0,90%) (Figura 19 c). Por meio do gráfico de Análise de coordenadas principais (PCoA), é possível observar que houve sobreposição de algumas amostras de pastagem com floresta secundária ao longo do período de enrique-

cimento, no entanto as amostras de floresta primária continuaram distantes das amostras de pastagens, como no início da incubação (Figura 20).

c)

Figura 19. Arquéias metanogênicas presentes nos enriquecimentos e estruturação da comunidade total nos tempos 0,15,28 e 63 com atmosfera de $H_2:CO_2$ como fonte de carbono a) Floresta Primária b) Floresta Secundária c) Pastagem d).

Figura 20. Análise de coordenadas principais (PCoA) dos enriquecimentos de amostras de floresta primária, floresta secundária e pastagem com atmosfera de H_2CO_2 como fonte de carbono. Os pontos circulos são as amostras pertencentes ao tempo 0.

7. DISCUSSÃO

7.1. Caracterização do solo

A densidade da pastagem do presente estudo é superior ao encontrado em pastagens manejadas de 20 anos com alta intensidade de pastoreio ($1,05 \text{ g.cm}^{-3}$) e com baixa intensidade de pastoreio ($0,96 \text{ g.cm}^{-3}$) (NAVARRETE et al., 2016), evidenciando os efeitos da mudança de uso do solo somados a ausência de manejo dessa área. A correlação entre as medidas de densidade com a emissão de metano e número de cópias do gene *mcrA* já foram reportados em trabalhos no mesmo ecossistema (LAMMEL et al., 2015). A redução da porosidade total do solo de pastagem devido a compactação limita a difusão de oxigênio levando a um aumento de microssítios anaeróbios, o que favorece o metabolismo das arqueias metanogênicas e por consequência a emissão de metano (LAMMEL et al., 2015; STEUDLER et al., 1996).

7.2. Caracterização morfológica dos cultivos enriquecidos

Os agregados celulares observados da análise dos cultivos em microscópio de contraste e fluorescência são característicos do gênero *Methanosarcina* (BOONE; MAH, 1987). Essas estruturas são formadas por células agrupadas e envoltas por um polímero espesso (MA et al., 2013). Esse gênero também foi identificado por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA, em todas as amostras enriquecidas. Foram observadas além dos agregados células em formatos de cocos, fenótipo que também é encontrado, em microrganismos desse gênero e associado a outros gêneros como o *Methanomassiliicoccus* (DRIDI et al., 2012), identificado também pelo sequenciamento dos cultivos. Células em formatos de bastonetes também foram observadas, fenótipo que ocorrem, por exemplo, no gênero *Methanobacterium* e *Methanocella* que tiveram sequências identificadas por meio do sequenciamento das amostras (DEMIREL; SCHERER, 2008).

7.3. Monitoramento por cromatografia gasosa (GC)

Pelo teste de análise de médias as comparações entre as três áreas não foram estatisticamente diferentes. No entanto pode ser observado que os enriquecimentos de amostras provenientes de pastagem apresentaram média final superior que floresta primária e secundária, para as três fontes de carbono. O maior valor médio pode ser atribuído a emissão de metano mais rápida que os outros perfis de solo, em virtude de uma comunidade previamente enriquecida. Comuni-

dades desse solo puderam ser detectadas pelo método de *qPCR* no tempo inicial do enriquecimento. A floresta secundária apresentou valores intermediários para as três fontes de carbono, sendo que a floresta primária apresentou os menores valores.

Comparando a emissão de metano pelos substratos de carbono foi possível observar uma produção maior de metano nos tratamentos com metanol, que pode ser explicada pelo fato do desse substrato ser pouco competitivo, bactérias redutoras de sulfato, por exemplo, não utilizam eficientemente compostos metilados. Portanto, em ambientes com abundância de íons sulfato (SO_4^{2-}) essa via pode ser vantajosa. A produção metilotrófica é considerada pouco comum em solos submersos, provavelmente pela ausência de compostos metilados nesses ambientes (LIU; WHITMAN, 2008). No entanto em solos aerados do ecossistema Amazônico foram identificados genes envolvidos na produção de metano por essa via biossintética. Foram encontrados em amostras de floresta primária, secundária e em uma abundância significativamente maior no solo de pastagem na Amazônia genes relacionados com a metilotrofia (MEYER et al., 2017). Essas observações indicam que a via metilotrófica embora considerada alternativa, pode ser importante na produção de metano no solo amazônico.

Os enriquecimentos que tiveram o acetato como fonte de carbono também apresentaram produção expressiva nos três tipos de uso do solo (Figura 9). MEYER e colaboradores (2017) identificaram maior abundância de genes de produção de acetato em solos de pastagens, assim como uma comunidade acetoclástica mais abundante nessas amostras. Também verificaram que essa via apresenta maior riqueza de espécies quando comparado com a hidrogenotrofia, o que indica que a via acetoclástica é favorecida nos solos da Amazônia. Essa diferença pode ser explicada pelo fato do acetato ser a principal fonte de carbono utilizada para a redução do sulfato (PARKERS et al., 1989), portanto no início do enriquecimento as arqueias metanogênicas competem por esse substrato. O mesmo não ocorre com o metanol, por ser considerado um substrato utilizado por um grupo restrito de microrganismos (LIU; WHITMAN, 2008).

A comunidade metanogênica das amostras de pastagem produziram metano mais rapidamente que as amostras de floresta secundária e primária, indicando uma comunidade mais responsiva e possivelmente naturalmente enriquecida. No entanto todas as amostras, especialmente as que receberam acetato e metanol como fonte de carbono, alcançaram aos 63 dias uma produção expressiva do gás, indicando que as comunidades provenientes de amostras de floresta primária e secundária podem emitir uma quantidade de metano considerável quando submetidas a condições favoráveis.

7.4. Quantificação do gene *mcrA*

As amostras de pastagens puderam ser quantificadas logo no tempo inicial do enriquecimento, duas das três réplicas apresentaram quantificação indicando que as amostras possuem uma comunidade metanogênica passível de ser detectada, portanto mais abundante que as amostras de floresta primária e secundária. Esse resultado é diferente do obtido por estudos com amostras da região ocidental da Amazônia (MEYER et al., 2017; PAULA et al., 2014) em que abundância do gene *mcrA* não diferiu entre amostras de floresta primária e pastagem. Foram encontrados resultados opostos no trabalho de LAMMEL e colaboradores (2015) realizado na região sul da Amazônia, em que a quantificação do gene *mcrA* foi superior em áreas de floresta primária. Ainda são poucos os trabalhos que procuraram compreender a ocorrência das arqueias metanogênicas em diferentes usos dos solos nesse ecossistema. Isso torna difícil associar se os padrões diferentes de resultados são devido a diferenças regionais de clima (SOMBROEK, 2001), tipos de solo (LUIZAO et al., 2004) e vegetação que o ecossistema amazônico apresenta.

A abundância do gene *mcrA* nas amostras iniciais de solo de pastagem pode ser associado a produção mais rápida de metano pelos enriquecimentos desse tipo de solo. Apesar dessa correlação nem sempre ser clara em solos, principalmente pela ocorrência da oxidação do metano (LAMMEL et al., 2015), nos enriquecimentos a emissão de gás e a quantificação do número de cópias de *mcrA* se associaram e mostraram-se bons indicadores do aumento da abundância das arqueias metanogênicas. Ao longo do tempo os enriquecimentos foram igualando em número de cópias do gene, apontando para o mesmo resultado encontrado para a produção do gás. Indicando que a comunidade inicial de floresta primária e secundária podem ser enriquecidas alcançando o número similar de cópias do gene *mcrA* que a pastagem, mesmo que com uma comunidade inicial menos abundante.

As amostras de floresta secundária tiveram uma produção de cópias mais tardia que as pastagens, no entanto tiveram uma resposta mais rápida que as amostras de floresta primária. Embora tenham apresentado uma emissão intermediária de gás, em alguns tempos superou a média de cópias do gene *mcrA* quantificadas para as amostras de pastagens. Nosso estudo indica que embora sejam áreas florestais, a comunidade metanogênica se mostrou mais ativa que as florestas que não passaram por esse processo de conversão.

Comparando a quantificação do número de cópias entre os substratos de enriquecimento, pode ser observado um padrão semelhante a produção de gás. Aos 15 dias o substrato metanol estimulou a produção de cópias do gene *mcrA* de pelo menos uma réplica de todas os perfis, enquanto as comunidades apresentaram um enriquecimento mais lento em acetato e atmosfera de $H_2:CO_2$ como substratos de carbono. Essa produção de cópias, pode estar relacionado a multipli-

cação do gênero *Methanosarcina*, que pela análise dos dados de sequenciamento, foi responsivo ao metanol aos 15 dias de enriquecimento. Esse resultado foi encontrado por PAZINATO e colaboradores, 2010 em que o gênero *Methanosarcina* foi dominante em cultivos com adição de metanol. No entanto embora a multiplicação das arqueias metanogênicas tenha ocorrido mais rápido em cultivos com o metanol, o número de cópias gerado aos 63 dias foi similar para os outros dois substratos.

7.5. Sequenciamento da região V4-V5 do gene 16S rRNA

No sequenciamento do tempo inicial das amostras de pastagem foi identificado uma abundância relativa para todos os grupos anotados como metanogênicos, sendo esses valores superiores para as sequências classificadas como Bathyarchaeota- other e o gênero *Methanosarcina* sp. Esse resultado coincidiu com a quantificação do gene *mcrA* no tempo 0 nas amostras desse perfil, resultado que não foi obtido para as amostras de floresta primária e secundária nesse mesmo período. A compactação do solo de pastagem caracterizada pela alta densidade dessas amostras, pode ter favorecido a comunidade metanogênica inicial (PAULA et al., 2014), tornando possível sua detecção tanto pela quantificação do gene funcional quanto pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. Nessas amostras também pode ter ocorrido um incremento de matéria orgânica proveniente dos excrementos de animais ruminantes que pode ter favorecido o crescimento desses microrganismos, bem como a introdução de arqueias metanogênicas provenientes do rúmem que se multiplicaram ao encontrar condições favoráveis no solo (RADL et al., 2007).

Durante a incubação a principal diferença observada foi a abundância relativa mais baixa das amostras de floresta primária no período de 0 aos 15 dias, quando comparado com as amostras de floresta secundária e pastagem. As comunidades metanogênicas das amostras de floresta primária foram enriquecidas mais lentamente que as outras amostras, no entanto no tempo final a abundância entre os três perfis foi similar, para as três fontes de carbono. Também pode ser observado que as amostras de floresta secundária apresentaram em alguns tempos valores superiores de abundância relativa comparados as pastagens, da mesma forma que ocorreu para a quantificação do gene *mcrA*. No entanto a principal diferença encontrada entre os cultivos enriquecidos dos três perfis foi a composição inicial e final dos grupos, para as amostras de pastagens foi identificada uma comunidade mais rica em microrganismos metanogênicos. Esses resultados diferem, do trabalho de MEYER e colaboradores, 2017 que não encontram diferenças na abundância relativa total, mas se assemelha por terem encontrado diferenças na composição, embora referente a outros grupos.

No tempo inicial das amostras de pastagens a abundância relativa das sequências afiliadas ao filo Bathyarchaeota-other foi similar à encontrada para o gênero *Methanosarcina* e superior aos demais grupos identificados. Esse filo foi descrito em 2015 por EVANS e colaboradores abrigando espécies metanogênicas. Atualmente trabalhos associam esse filo a diferentes ambientes, no entanto sem um esclarecimento das condições que explica o seu padrão de distribuição (XIANG et al., 2017). Não há trabalhos publicados que tenha reportado sequências afiliadas a esse grupo no ecossistema Amazônico, indicando que os resultados obtidos nesse trabalho são novos e podem contribuir para o estudo das arqueias metanogênicas pertencentes a esse ecossistema e também a trabalhos que tenham por objetivo explicar os padrões biogeográficos do filo Bathyarchaeota. A análise dos genomas descritos como pertencentes a esse filo indica que essas arqueias são capazes de desempenhar as três vias biossintéticas de produção de metano (EVANS et al., 2015; LAZAR et al., 2016), o que explica o enriquecimento desse grupo nos três tipos de substratos.

Aos 63 dias foi observado nas amostras de pastagem um aumento do gênero *Methanobacterium*, principalmente no enriquecimento com acetato como fonte de carbono, que não foi observado para as amostras enriquecidas dos outros perfis (Figura 15 a). Esse gênero é descrito como hidrogenotrófico com base na análise de estirpes isoladas (ROTHER; LINGE; KERN, 2015), no entanto recentemente foi identificado em genomas da espécie *Methanobacterium bryantii* recuperados por GILMORE e colaboradores (2017) *sets* gênicos completos que indicam que essa espécie possa utilizar outros compostos, como metanol e formato para o seu crescimento. Essa informação dá subsidio ao fato desse gênero ter sido enriquecido em substratos que não são os mais comumente descritos na literatura.

Foi observado que os enriquecimentos com acetato promoveram uma multiplicação mais lenta dos microrganismos metanogênicos principalmente do gênero *Methanosarcina* comparado aos cultivos que tiveram adição de metanol. Isso refletiu no padrão de emissão de metano e na quantificação do gene *mcrA* dos enriquecimentos, dando suporte as respostas encontradas previamente por meio dessas metodologias. O único genoma de arqueia metanogênica descrito como pertencente ao ecossistema amazônico brasileiro é da espécie *Methanosarcina mazei*, recuperada de amostras de sedimentos (GRAÇAS et al., 2013) e um dos isolados obtido por PAZINATO e colaboradores (2010), provenientes de amostras de várzea também é pertencente a esse gênero. Os resultados do presente trabalho mostram que gênero *Methanosarcina* também está presente em solos aerados do ecossistema amazônico, como identificado por MEYER e colaboradores (2017), sendo facilmente enriquecido a partir dessas amostras.

Foram identificadas nas amostras iniciais de pastagens e também no enriquecimento das amostras de floresta primária e secundária sequências pertencentes à família *Metanocellaceae*, principalmente afiliadas ao grupo Rice Cluster I. A família *Methanocellaceae* foi descoberta em amostras de solo de cultivo de arroz e descrita abrigando apenas o grupo Rice Cluster I de microrganismos não cultiváveis (CONRAD; ERKEL; LIESACK, 2006). Porém posteriormente foram isolados estirpes associadas a essa família que foram classificadas no gênero *Methanocella* (LYU; LU, 2015). Atualmente trabalhos descrevem a presença de microrganismos metanogênicos associados a esse gênero em diferentes ambientes, incluindo solos aerados (HOFMANN et al., 2016). MEYER e colaboradores, 2017 encontraram sequências associadas a esse gênero em maior abundância nas amostras de pastagens em comparação as amostras de floresta primárias na Amazônia, coincidindo com o padrão encontrado nas amostras iniciais do nosso trabalho. O enriquecimento desse grupo em amostras de solo florestais indica que esses microrganismos, associados como importantes produtores de metano em ambientes anóxicos, são passíveis de serem enriquecidos quando submetidos a condições favoráveis.

Também foram encontradas sequências que se afiliaram ao gênero *Methanomassiliicoccus* nas amostras iniciais de pastagem e nos enriquecimentos das amostras de floresta primária e secundária. Esse gênero que é comumente encontrado em amostras de trato digestivo humano (DRIDI et al., 2012), de cupins (PAUL et al., 2012) e em digestores anaeróbios (IINO et al., 2013), também estão sendo descritos em solos aerados na China (XIE et al., 2017). A identificação de sequências em solos amazônicos sugere a ampla distribuição desse gênero de arqueias metanogênicas.

O enriquecimento das amostras de floresta primária e secundária permitiu a identificação de sequências associadas as arqueias metanogênicas, que não haviam sido identificadas nas amostras iniciais, bem como a quantificação do gene *mcrA* que foi nulo nessas amostras. Os resultados obtidos mostraram que a composição da comunidade entre as amostras de florestas primárias e secundárias foram similares principalmente no início do enriquecimento. No entanto as arqueias metanogênicas presentes nos cultivos com solo de floresta secundária se mostraram mais responsivas que os cultivos de floresta primária, apresentando por vezes abundância maior que as amostras de pastagens. NAVARRETE e colaboradores, 2011 reportaram que comunidades de arqueias oxidadoras de amônia presentes em amostras de floresta secundária diferem das comunidades presentes nas florestas primárias em composição e índices de diversidade. No entanto trabalhos com o foco em arqueias metanogênicas são escassos.

Os resultados obtidos com os cultivos enriquecidos revelaram grupos que embora estejam em baixa abundância nesses solos, podem ser enriquecidos quando submetidos a condições

favoráveis. Essas condições são encontradas em solo de pastagens consideradas degradadas e típicas da região (LAMMEL et al., 2015; PAULA et al., 2014; STEUDLER et al., 1996) e no nosso trabalho foram evidenciadas, uma vez que foi possível identificar diferentes grupos de arqueias metanogênicas no tempo inicial e final das amostras de pastagens, maior quantificação do gene *mcrA* no tempo 0, enriquecimento e emissão de metano mais rápidos nessas amostras que nas amostras de floresta primária.

8. CONCLUSÃO

A composição das amostras iniciais de pastagens foi distinta das amostras florestais, apresentando sequências que se afiliaram a um maior número de gêneros. A estrutura final também diferiu, sendo que as amostras de pastagens apresentaram abundância maior do gênero *Methanobacterium*, principalmente nos cultivos com acetato como fonte de carbono. A maior abundância de arqueias metanogênicas nas amostras iniciais de pastagem, pôde ser detectada pela quantificação do gene *mcrA*, que não foi possível para as amostras florestais. A comunidade mais abundante em pastagens refletiu em um início mais rápido e expressivo da emissão de metano e em uma média maior de produção desse gás, para os três substratos. O gênero *Methanosarcina* foi dominante nas amostras iniciais e nos enriquecimentos, podendo ter um papel central na produção de metano pelos solos do ecossistema amazônico. O filo Bathyarchaeota recém descrito, foi identificado nos três perfis e possivelmente é ubíquo nesse ecossistema. Os substratos metanol e acetato estimularam uma produção maior que a atmosfera de $H_2:CO_2$, indicando que via acetilclástica e metilotrófica podem ser responsáveis pela produção majoritária de metano nos solos da Amazônia. Também podemos concluir que as arqueias metanogênicas presentes em baixa abundância no solo das florestas primárias podem ter sua comunidade aumentada e produção expressiva de metano quando submetidas a condições favoráveis. Condições essas encontradas, por exemplo em pastagens mal manejadas que foram encontradas na região em que as coletas foram realizadas.

REFERÊNCIAS

- ANGEL, R.; CLAUS, P.; CONRAD, R. Methanogenic archaea are globally ubiquitous in aerated soils and become active under wet anoxic conditions. **The ISME journal**, v. 6, n. 4, p. 847–62, abr. 2012.
- ARAGÃO, L. E. O. C. et al. Environmental change and the carbon balance of Amazonian forests. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 89, n. 4, p. 913–31, nov. 2014.
- ARONSON, E. L.; ALLISON, S. D.; HELLIKER, B. R. Environmental impacts on the diversity of methane-cycling microbes and their resultant function. **Frontiers in microbiology**, v. 4, n. August, p. 225, jan. 2013.
- BAPTESTE, E.; BROCHIER, C.; BOUCHER, Y. Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens. **Archaea (Vancouver, B.C.)**, v. 1, n. 5, p. 353–63, 2005.
- BERK, H.; THAUER, R. K. Function of coenzyme F₄₂₀-dependent NADP reductase in methanogenic archaea containing an NADP-dependent alcohol dehydrogenase. **arch microbiol**, v. 168, p. 396–402, 1997.
- BOONE, D. R.; MAH, R. A. Effects of Calcium, Magnesium, pH, and Extent of Growth Morphology of *Methanosarcina mazei* S-6. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 1699–1700, 1987.
- CIAIS, P. et al. **Carbon and Other Biogeochemical Cycles. In: Climate Change 2013: The Physical Science Basis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2013.
- CONRAD, R. Microbial Ecology of Methanogens and Methanotrophs. **Advances in Agronomy**, v. 96, n. 7, p. 1–63, 2007.
- CONRAD, R.; ERKEL, C.; LIESACK, W. Rice Cluster I methanogens, an important group of Archaea producing greenhouse gas in soil. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 262–267, 2006.
- DAVIDSON, E. A et al. The Amazon basin in transition. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 321–8, 19 jan. 2012.
- DEMIREL, B.; SCHERER, P. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 7, n. 2, p. 173–190, jun. 2008.

- DÖRR, N.; GLASER, B.; KOLB, S. Methanotrophic communities in brazilian ferralsols from naturally forested, afforested, and agricultural Sites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 4, p. 1307–1310, 2010.
- DRIDI, B. et al. Methanomassiliicoccus luminyensis gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 8, p. 1902–1907, 2012.
- EVANS, P. N. et al. Methane metabolism in the archaeal phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics. **Science**, v. 350, n. 6259, p. 434–437, 2015.
- FOURNIER, G. P.; GOGARTEN, J. P. Evolution of Acetoclastic Methanogenesis in Methanosarcina via Horizontal Gene Transfer from Cellulolytic Clostridia. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 3, p. 1124–1127, 1 fev. 2008.
- FUJISAKI, K. et al. From forest to cropland and pasture systems: a critical review of soil organic carbon stocks changes in Amazonia. **Global change biology**, v. 21, n. 7, p. 272773–2786, 26 fev. 2015.
- GILMORE, S. P. et al. Genomic analysis of methanogenic archaea reveals a shift towards energy conservation. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 639, 21 dez. 2017.
- GRAÇAS, D. A. D et al. Complete Genome of a Methanosarcina mazei Strain Isolated from Sediment Samples from an Amazonian Flooded Area. **Genome Announcements**, v. 1, n. 3, p. 1–2, 2013.
- GRACE, J.; MITCHARD, E.; GLOOR, E. Perturbations in the carbon budget of the tropics. **Global change biology**, v. 20, n. 10, p. 3238–55, out. 2014.
- HOFMANN, K. et al. Abundance and potential metabolic activity of methanogens in well-aerated forest and grassland soils of an alpine region. **FEMS microbiology ecology**, v. 92, n. 2, p. 1–11, 2016.
- IINO, T. et al. Candidatus Methanogranum caenicola: a Novel Methanogen from the Anaerobic Digested Sludge, and Proposal of Methanomassiliicoccaceae fam. nov. and Methanomassiliicoccales ord. nov., for a Methanogenic Lineage of the Class Thermoplasmata. **Microbes and Environments**, v. 28, n. 2, p. 244–250, 2013.
- LAMMEL, D. R. et al. Specific microbial gene abundances and soil parameters contribute to C, N, and greenhouse gas process rates after land use change in Southern Amazonian Soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. October, p. 1–14, 6 out. 2015.
- LANG, K. et al. New mode of energy metabolism in the seventh order of methanogens as revealed by comparative genome analysis of “Candidatus Methanoplasma termitum”. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 4, p. 1338–1352, 2015.

- LAZAR, C. S. et al. Genomic evidence for distinct carbon substrate preferences and ecological niches of Bathyarchaeota in estuarine sediments. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 1200–1211, 2016.
- LIMA, L. S. et al. Feedbacks between deforestation, climate, and hydrology in the Southwestern Amazon: implications for the provision of ecosystem services. **Landscape Ecology**, v. 29, n. 2, p. 261–274, 6 dez. 2013.
- LIU, Y.; WHITMAN, W. B. Diversity of the Methanogenic Archaea. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, p. 171–189, 2008.
- LUIZAO, R. C. C. et al. Variation of carbon and nitrogen cycling processes along a topographic gradient in a central Amazonian forest. **Global Change Biology**, v. 10, n. 5, p. 592–600, maio 2004.
- LUTON, P. E. et al. The mcrA gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. **Microbiology**, v. 148, n. 11, p. 3521–3530, 2002.
- LYU, Z.; LU, Y. Comparative genomics of three Methanocellales strains reveal novel taxonomic and metabolic features. **Environmental Microbiology Reports**, v. 7, n. 3, p. 526–537, 2015.
- MA, J. et al. Methanosarcina domination in anaerobic sequencing batch reactor at short hydraulic retention time. **Bioresource Technology**, v. 137, p. 41–50, jun. 2013.
- MALHI, Y. et al. Climate Change, Deforestation, and the Fate of the Amazon. **Science**, v. 319, n. jan, p. 169–172, 2008.
- MALHI, Y.; GRACE, J. Tropical forests and atmospheric carbon dioxide. **Tree**, v. 15, p. 332–337, 2000.
- MENDES, L. W. et al. Land-use system shapes soil bacterial communities in Southeastern Amazon region. **Applied Soil Ecology**, v. 95, p. 151–160, nov. 2015.
- MEYER, K. M. et al. Conversion of Amazon rainforest to agriculture alters community traits of methane-cycling organisms. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 6, p. 1547–1556, mar. 2017.
- NAKAYAMA, C. R. et al. Revealing archaeal diversity patterns and methane fluxes in Admiralty Bay, King George Island, and their association to Brazilian Antarctic Station activities. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 58, n. 1–2, p. 128–138, jan. 2011.
- NARIHIRO, T.; SEKIGUCHI, Y. Oligonucleotide primers, probes and molecular methods for the environmental monitoring of methanogenic archaea. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 5, p. 585–602, set. 2011.
- NAVARRETE, A. A. et al. LAND-USE SYSTEMS AFFECT ARCHAEOAL COMMUNITY STRUCTURE AND FUNCTIONAL DIVERSITY IN WESTERN AMAZON SOILS (1). n. 1, p. 1527–1540, 2011.

- NAVARRETE, D. et al. Conversion from forests to pastures in the Colombian Amazon leads to contrasting soil carbon dynamics depending on land management practices. **Global Change Biology**, v. 22, n. 10, p. 3503–3517, out. 2016.
- NAZARIES, L. et al. Methane, microbes and models: fundamental understanding of the soil methane cycle for future predictions. **Environmental microbiology**, v. 15, n. 9, p. 2395–417, set. 2013.
- NEPSTAD, D. C. et al. Interactions among Amazon land use , forests and climate□ : prospects for a near-term forest tipping point. **Philosophical Transactions of The Royal Society**, v. 363, n. February, p. 1737–1746, 2008.
- NICOL, G. W.; GLOVER, L. A.; PROSSER, J. I. Molecular analysis of methanogenic archaeal communities in managed and natural upland pasture soils. **Global Change Biology**, v. 9, n. 10, p. 1451–1457, 2003.
- PARKERS, R. et al. Determination of the Substrates for Sulphate-reducing Bacteria within Marine and Estuarine Sediments with Different Rates of Sulphate Reduction. **Journal of General Microbiology**, v. 135, p. 175–187, 1989.
- PAUL, K. et al. “Methanoplasmatales,” thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 23, p. 8245–8253, 2012.
- PAULA, F. S. et al. Land use change alters functional gene diversity, composition and abundance in Amazon forest soil microbial communities. **Molecular ecology**, v. 23, n. 12, p. 2988–99, jun. 2014.
- PAZINATO, J. M. et al. Molecular Characterization of the Archaeal Community in an Amazonian Wetland Soil and Culture-Dependent Isolation of Methanogenic Archaea. **Diversity**, v. 2, n. 7, p. 1026–1047, 22 jul. 2010.
- PYLRO, V. S. et al. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 107, p. 30–37, 2014.
- PYLRO, V. S. et al. BMPOS: a Flexible and User-Friendly Tool Sets for Microbiome Studies. **Microbial Ecology**, v. 72, n. 2, p. 443–447, 2016.
- RADL, V. et al. Effects of cattle husbandry on abundance and activity of methanogenic archaea in upland soils. **The ISME Journal**, v. 1, n. 5, p. 443–452, 19 set. 2007.
- RICE, A. H. et al. Carbon Balance and Vegetation Amazonian Forest. **Ecological Applications**, v. 14, n. 4, p. 55–71, 2004.

- RODRIGUES, J. L. M. et al. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 3, p. 988–93, 15 jan. 2013.
- ROTHER, M.; LINGE, M.; KERN, T. *Methanobacterium aggregans* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogenic archaeon isolated from an anaerobic digester. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 1975–1980, 1 jun. 2015.
- SOARES-FILHO, B. S. et al. Modelling conservation in the Amazon basin. **Nature**, v. 440, n. 7083, p. 520–3, 23 mar. 2006.
- SOMBROEK, W. Spatial and temporal patterns of Amazon rainfall. Consequences for the planning of agricultural occupation and the protection of primary forests. **Ambio**, v. 30, n. 7, p. 388–96, nov. 2001.
- STEINBERG, L. M.; REGAN, J. M. Phylogenetic comparison of the methanogenic communities from an acidic, oligotrophic fen and an anaerobic digester treating municipal wastewater sludge. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6663–71, nov. 2008.
- STEUDLER, P. A. et al. Consequence of forest-to-pasture conversion on CH₄ fluxes in the Brazilian Amazon Basin. **Journal of Geophysical Research: Atmospheres**, v. 101, n. D13, p. 18547–18554, 20 ago. 1996.
- TEH, Y. A.; SILVER, W. L.; CONRAD, M. E. Oxygen effects on methane production and oxidation in humid tropical forest soils. **Global Change Biology**, v. 11, n. 8, p. 1283–1297, 2005.
- VANWONTERGHEM, I. et al. Methylophilic methanogenesis discovered in the archaeal phylum Verstraetearchaeota. **Nature Microbiology**, v. 1, n. October, p. 16170, 3 out. 2016.
- WALTERS, W. et al. Improved Bacterial 16S rRNA Gene (V4 and V4-5) and Fungal Internal Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys. **mSystems**, v. 1, n. 1, p. e00009-15, 23 fev. 2016.
- WICK, B. et al. Nitrous oxide fluxes and nitrogen cycling along a pasture chronosequence in Central Amazonia, Brazil Nitrous oxide fluxes and nitrogen cycling along a pasture chronosequence in Central Amazonia, Brazil. **Biogeosciences Discussions**, v. 2, p. 499–535, 2005.
- XIANG, X. et al. Distribution of Bathyarchaeota Communities Across Different Terrestrial Settings and Their Potential Ecological Functions. **Scientific Reports**, v. 7, n. February, p. 45028, 2017.

XIE, W. et al. The response of archaeal species to seasonal variables in a subtropical aerated soil: insight into the low abundant methanogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 16, p. 6505–6515, 30 ago. 2017.

ZINDER, S. H.; KOCH, M. Non-aceticlastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. **Archives of Microbiology**, v. 138, p. 263–272, 1984.