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

De genomas a comunidades: descrevendo alterações na comunidade bacteriana
envolvida na oxidação do metano em solos da Amazônia

Danielle Gonçalves dos Santos

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2019

Danielle Gonçalves dos Santos
Licenciada em Ciências Biológicas

**De genomas a comunidades: descrevendo alterações na comunidade bacteriana
envolvida na oxidação do metano em solos da Amazônia**
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2019

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

Santos, Danielle Gonçalves dos

De genomas a comunidades: descrevendo alterações na comunidade bacteriana envolvida na oxidação do metano em solos da Amazônia / Danielle Gonçalves dos Santos. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

107 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Enriquecimento 2. Diversidade 3. Metagenoma 4. *pmoA* I. Título

À minha família

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus pela vida e todas as conquistas.

Ao meu amado esposo, não há palavras para expressar todo o apoio, companheirismo, paciência e cumplicidade que me deu nesta fase de nossas vidas. À todos meus parentes e familiares, em especial aos meus pais Edna e Saulo e meus irmãos Daniel e Saulo, por serem minha base e compreenderem minhas muitas ausências.

Ao meu orientador, Prof^o Dr^o Fernando Dini Andreote, pela oportunidade de treinamento técnico, do mestrado e desenvolvimento desta tese, sob suas orientações. Meus sinceros agradecimentos, pela confiança, orientação e exemplo de dedicação e competência.

À Universidade de São Paulo-USP em especial a “Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz” - ESALQ/USP e ao programa de Microbiologia Agrícola, por oferecerem excelente infraestrutura, corpo docente e suporte. A CAPES pela concessão da bolsa de estudo, fundamental para a minha manutenção durante este período.

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 todas as equipes que participaram das coletas, em especial ao Wagner, foram vitais para o desenvolvimento desta tese.

Agradeço ao Dr^o Rodrigo G. Taketani, pela orientação e auxílio imprescindível na etapa final do desenvolvimento desta tese. Ao Dr^o Victor S. Pylro, pelo auxílio nos isolamentos e no sequenciamento massivo do gene 16S rRNA. À Dr^a Simone Cotta, pela paciência, todas as dicas e correções.

À Kelly Jaqueline Alves pela amizade, parceria no projeto e sua companhia. Compartilhamos conhecimentos, alegrias, desabafos e muitos doces, todos fundamentais para finalização desta etapa.

À aluna de iniciação científica Luana Bresciani pelo companheirismo nas atividades laboratoriais, parceria no projeto e poder acompanhar todo seu crescimento pessoal e intelectual nestes anos. À estagiária Marina Podadera Gouvea e técnica Elisa Nadalini pelo apoio e ajuda inicial.

À Sônia, Denise e Fernandinho, pelos excelentes suportes técnicos, amizade e momentos de descontração, e em especial a Denise que me apresentou ao laboratório de Microbiologia do Solo.

Agradeço a todos os membros do laboratório de Microbiologia do Solo pelo apoio, auxílio nas dúvidas, cafés e companheirismos, tornando o cotidiano no laboratório mais alegre.

Meus sinceros agradecimento a todos que de alguma forma contribuíram no meu crescimento pessoal e deram todo o apoio possível.

Obrigada!

“Enquanto o planeta girava de acordo com a lei fixa da gravidade, a partir de um início tão simples, um número infinito de formas, as mais belas e maravilhosas, evoluiu e continua a evoluir.”

Charles Darwin, A Origem das Espécies

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. A FLORESTA AMAZÔNICA	13
2.2. IMPACTOS DA MUDANÇA DO USO DA TERRA NA DIVERSIDADE MICROBIANA.....	14
2.3. CICLO DO CARBONO E TRANSFORMAÇÕES DO METANO	15
2.4. OXIDAÇÃO AERÓBICA DO METANO POR BACTÉRIAS METANOTRÓFICAS	17
2.5. A COMUNIDADE BACTERIANA METANOTRÓFICA.....	20
2.6. CULTIVO BACTERIANO E GENÔMICA DE BACTÉRIAS METANOTRÓFICAS.....	21
3. HIPÓTESES	25
4. OBJETIVOS	27
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5. MATERIAL E MÉTODOS	29
5.1. AMOSTRAGENS.....	29
5.2. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS AMOSTRAS DE SOLO.....	31
5.3. ENRIQUECIMENTO DA COMUNIDADE METANOTRÓFICA.....	32
5.4. EXTRAÇÕES DE DNA.....	32
5.5. QUANTIFICAÇÃO DAS COMUNIDADES MICROBIANAS POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qPCR)...	33
5.6. SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO V4-V5 DO GENE RIBOSSOMAL 16S rRNA	34
5.7. ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS	34
5.8. ANÁLISES DE <i>NETWORK</i>	35
5.9. METAGENOMA DOS CULTIVOS ENRIQUECIDOS.....	36
5.10. ISOLAMENTOS E SELEÇÕES DE BACTÉRIAS	37
5.11. AMPLIFICAÇÃO DO GENE RIBOSSOMAL 16S rRNA DOS ISOLADOS BACTERIANOS	38
6. RESULTADOS	41
6.1. CARACTERIZAÇÃO DOS SOLOS ESTUDADOS	41
6.2. ENRIQUECIMENTO DAS COMUNIDADES METANOTRÓFICAS	50
6.3. INTERAÇÕES MICROBIANAS	60
6.4. METAGENOMA E RECONSTRUÇÃO DOS GENOMAS A PARTIR DOS CULTIVOS ENRIQUECIDOS	64
7. DISCUSSÃO	73
7.1. CARACTERIZAÇÃO DOS SOLOS ESTUDADOS	73
7.2. ENRIQUECIMENTO DAS COMUNIDADES METANOTRÓFICAS	78
7.3. INTERAÇÕES MICROBIANAS	83
7.4. METAGENOMA DOS CULTIVOS ENRIQUECIDOS.....	86
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
REFERÊNCIAS	93
ANEXOS	105

RESUMO

De genomas a comunidades: descrevendo alterações na comunidade bacteriana envolvida na oxidação do metano em solos da Amazônia

A Amazônia hospeda a maior floresta tropical do planeta, considerada um “hotspot” de biodiversidade. O aumento das ações antropogênicas nas últimas décadas (desmatamento e queimadas) tem ocasionado perdas irreparáveis na diversidade biológica, contribuindo significativamente nas mudanças climáticas por meio de alterações dos fluxos hidrológicos e emissão excessiva de gases relacionados ao efeito estufa, dentre os quais o metano. Assim, na busca de uma melhor compreensão dessas alterações é de fundamental importância o estudo das comunidades microbianas associadas ao consumo do metano. Este trabalho teve como objetivo avaliar o impacto das alterações no uso da terra sobre a estrutura genômica e das comunidades bacterianas associadas à oxidação do metano presentes no solo, buscando a combinação de análises independentes (de comunidades) e dependentes de cultivo (enriquecimento e cultivo), juntamente com o acesso aos genomas montados de bactérias metanotróficas. Amostras provenientes de diferentes usos do solo e regiões da floresta amazônica foram coletadas, em sistemas de florestas primárias, florestas secundárias e pastagens na região de Santarém (PA), e floresta primárias e pastagens em Ariquemes (RO). Os solos coletados foram adicionados ao meio enriquecido com metano para estimular o metabolismo das bactérias metanotróficas. Tanto nas amostras originais como nas oriundas dos enriquecimentos, foram realizadas quantificações do gene *pmoA* pela técnica de PCR quantitativo (qPCR) e caracterização da comunidade total (bactérias e arqueias) e metanotróficas por meio do sequenciamento da região V4-V5 do gene 16S rRNA. Foram também realizadas análises de *network* e isolamentos de bactérias, na busca de uma maior compreensão sobre as correlações e associações microbianas das amostras. Por fim, o acesso ao metagenoma de amostras enriquecidas e montagens de genomas por metagenoma (MAG - *Metagenome Assembled Genome*), permitiu comparar a estrutura genômica do operon *pmoCAB* oriunda de diferentes solos. Os resultados mostraram que a estrutura da comunidade total e metanotrófica se alteram com a conversão do solo florestal em pastagem, de maneiras distintas nas áreas amostradas, e com comportamento diferenciado ao longo dos enriquecimentos. O filo Acidobacteria mostrou-se característico de solos florestais, enquanto Actinobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes de pastagens, ao passo que a abundância relativa e a riqueza de metanotróficos foi mais elevada em solos de pastagens. Também ocorrem alterações nas interações microbianas, mostrando que florestas possuem correlações mais estáveis que solos de pastagem, porém diferentes entre as áreas estudadas. Estas correlações também são notadas na associação de bactérias metanotróficas com outros grupos, como os gêneros *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Flavisobacter* e *Cupriavidus*. Em resumo, observa-se que há diferenciação no enriquecimento de bactérias metanotróficas nos diferentes solos e áreas, e os genomas montados indicam a possibilidade de metabolismos distintos. Estes dados contribuem para a compreensão das alterações, em diferentes níveis, da comunidade microbiana nos ambientes de conversão do uso do solo.

ABSTRACT

From genomes to communities: describing changes in the bacterial community involved in methane oxidation in Amazonian soils

The Amazon hosts the largest rainforest on the planet, considered a biodiversity “hotspot”. The increase in anthropogenic actions in the last decades (deforestation and burning) has caused irreparable losses in biological diversity, contributing significantly to climate change through changes in hydrological flows and excessive emissions of greenhouse gases, including methane. Thus, in the search for the best understanding of these changes, it is of fundamental importance to study the microbial communities associated with methane consumption. This work aimed to evaluate the impact of changes in land use on the genomic structure and bacterial communities associated with the oxidation of methane in the soil, seeking the combination of independent (community) and dependent analyzes (enrichment and growth), along with access to the genomes assembled from methanotrophic bacteria. Samples from different soil uses and regions of the Amazon rainforest were collected, such as primary forests, secondary forests and pastures in the Santarém region (PA) and primary forests and pastures in Ariquemes (RO). The collected soils were added to the methane-enriched medium to stimulate the metabolism of the methanotrophic bacteria. In both the original and the enriched samples, were performed quantifications of the *pmoA* gene by the quantitative PCR technique (qPCR) and characterization of the total community (bacteria and archaea) and methanotrophic by the sequencing of the V4-V5 region of the 16S rRNA gene. Network analyzes and bacterial isolations were also carried out in order to obtain a better understanding of the microbial correlations and associations of the samples. Finally, the access to the metagenome of enriched samples and genome assemblies by metagenome (MAG - *Metagenome Assembled Genome*) allowed comparing the genomic structure of the *pmoCAB* operon from different soils. The results showed that the structure of the total and methanotrophic community analyzed changes with the conversion of the forest soil to pasture, in different ways in the sampled areas and in enriched soils. The phyla Acidobacteria showed to be characteristic of forest soils, while Actinobacteria, Firmicutes, and Bacteroides of pastures and the relative abundance and richness of methanotrophic are higher in pastures soils. The changes were observed for microbial interactions, showing that forests have more stable correlations than pasture soils, but different between the areas studied. These correlations are also noted in the association of methanotrophic bacteria with other groups, such as the genera *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Flavisobacter* and *Cupriavidus*. In summary, it was observed differentiation in the enrichment of methanotrophic bacteria in the different soils and areas, and the assembled genomes indicate the possibility of different metabolisms. These data contribute to the understanding of the changes, at different levels, of the microbial community in the land use conversion environments.

Keywords: Enrichment; Diversity; Metagenome; *pmoA*

1. INTRODUÇÃO

A floresta tropical do Rio Amazonas é a maior do planeta, representando cerca de 40% das florestas tropicais remanescentes mundiais e 59% do território brasileiro distribuídos entre nove estados (FUJISAKI et al., 2015). Este ambiente é considerado um “hotspot” de biodiversidade, servindo de habitat a aproximadamente 25% de todas as espécies terrestres de plantas e animais (DAVIDSON et al., 2012; DIRZO; RAVEN, 2003; NEPSTAD et al., 2008). Porém, com o aumento da população humana e da demanda mundial por biocombustíveis e alimentos, tem ocorrido o aumento do desmatamento florestal, principalmente na busca por novas áreas de produção agropecuária (DAVIDSON et al., 2012).

As mudanças causadas pelo desmatamento são de extrema importância em ecossistemas tropicais, causando perdas da biodiversidade, além de causar diferenciações nos fluxos hidrológicos, na dinâmica de temperatura e na ciclagem de nutrientes no solo (WEARN; REUMAN; EWERS, 2012)

Dentro deste contexto, um ponto de grande importância é a emissão e o consumo de metano nestes solos. O metano (CH_4) é um importante gás de efeito estufa que contribui para acelerar as mudanças climáticas, absorvendo radiações infravermelhas de forma mais intensa do que o dióxido de carbono (IPCC, 2015). Este gás tem grande impacto relacionado à intensificação do efeito estufa, e tanto sua produção como seu consumo relacionados a atividade de frações específicas da comunidade microbiana dos solos (CONRAD, 2009; MENDES et al., 2015; SCHIMMEL; GULLEDGE, 1998).

Variações nas concentrações de metano sugerem que a oxidação deste gás é a chave importante na diminuição da concentração na atmosfera, e este equilíbrio entre produção e oxidação do metano pode ser determinado por microrganismos metanotróficos (AYDIN et al., 2011; CHOWDHURY; DICK, 2013; HEIMANN, 2011; ISLAM et al., 2015).

Sabe-se que estas comunidades microbianas presentes no solo são responsivas as alterações antrópicas, como as promovidas pelas mudanças do uso da terra, por meio da transformação de florestas em áreas de agricultura e pastagens, o que constitui uma das principais fontes de metano atmosférico (CIAIS et al., 2013; PAULA et al., 2014; RODRIGUES et al., 2013). Por exemplo, RODRIGUES e colaboradores (2013) descreveram a homogeneização das comunidades microbianas do solo quando áreas de floresta são convertidas em pastagem. PAULA e colaboradores (2014) sugerem, com base em dados metagenômicos, que o processo global de metanogênese pode ser idêntico em solos das florestas e pastagens, mas a metanotrofia pode variar entre os solos sob diferentes usos da terra. FERNANDES e colaboradores (2002)

também indicam que as taxas de consumo de metano em solos florestais são maiores do que as encontradas em solos cultivados com pastagens, o que torna fundamental um estudo detalhado das bactérias metanotróficas presentes em solos sob distintos usos nas áreas previamente ocupadas pela floresta amazônica.

Desta forma, este trabalho tem como objetivo avaliar as alterações ocorridas na estrutura das comunidades relacionadas a oxidação do metano ocasionadas pela conversão da floresta em pastagem, buscando-se a combinação de análises independentes (de comunidades) e dependentes de cultivo (enriquecimento), juntamente com o acesso aos genomas montados de bactérias metanotróficas, fornecendo uma visão geral as mudanças nas comunidades e no comportamento individual de seus componentes frente à diferentes usos do solo na Amazônia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A floresta amazônica

A floresta tropical do Rio Amazonas é considerada a maior floresta tropical do planeta, com aproximadamente 5,3 milhões de Km², representa cerca de 40% das florestas tropicais remanescentes mundiais e 59% do território brasileiro distribuídos entre nove estados (FUJISAKI et al., 2015).

Considerada um importante centro de biodiversidade mundial, possui em torno de 25% de todas as espécies de plantas e animais terrestres, além do fornecimento de cerca de oito trilhões de toneladas de vapor de água para atmosfera a cada ano, resultante da evapotranspiração das plantas (DAVIDSON et al., 2012; NEPSTAD et al., 2008). Dentro deste ecossistema, a bacia amazônica possui um papel importante na biosfera da Terra, fornecendo 1/5 do fluxo de água doce nos oceanos, o que a torna um grande controladora da temperatura e da precipitação, além de atuar na regulação da troca de gases atmosféricos (DAVIDSON et al., 2012; NEPSTAD et al., 2008).

Apesar de ser o maior reservatório de biodiversidade na Terra, tem ocorrido nas últimas décadas, juntamente com o aumento da população humana e da demanda mundial por biocombustíveis, grãos e alimentos, uma integração da Amazônia na economia global. Isto tem gerado uma grande ameaça de destruição da floresta, que já perdeu aproximadamente 16% de sua cobertura original (DAVIDSON et al., 2012; SOARES-FILHO; NEPSTAD, 2006).

Os dados de monitoramento da floresta amazônica indicam que se o desmatamento for mantido sob o atual ritmo, até 2050 as práticas de uso da terra reduzirão o habitat disponível para as espécies de plantas em 12-24%, resultando em 5-9% das espécies “comprometidas com a extinção”(FEELEY; SILMAN, 2009; WEARN; REUMAN; EWERS, 2012). Além destas perdas, existe também uma ameaça à diversidade biológica total deste bioma, podendo levar a extinção de 3/4 das espécies existentes nestas áreas (DIRZO; RAVEN, 2003; KELLER; MITRE; STALLARD, 1990; WEARN; REUMAN; EWERS, 2012).

Um dos pontos de impacto está na alteração dos ciclos anuais da Amazônia, composto de épocas bem definidas de seca (julho a outubro) e de chuva (novembro a junho), que se tornam intensas no verão (MARENGO et al., 2017). Correlacionando este tipo de alteração aos componentes do ecossistema, pode-se prever que a mudança no uso do solo tenha papel fundamental sobre a ciclagem de nutrientes do mesmo, interferindo por exemplo, nas transformações da matéria orgânica, e em alterações nas quantidades naturais de compostos a partir de sua degradação. No centro desta alteração geoquímica está a comunidade microbiana do

solo, fração viva e promotora de todos os ciclos biogeoquímicos nos solos, que tem se mostrado responsiva a atividade humana (MENDES et al., 2015; TATE, 2015).

2.2. Impactos da mudança do uso da terra na diversidade microbiana

As comunidades microbianas do solo são conhecidamente responsivas às alterações ambientais, ao mesmo passo em que são consideradas o centro promotor dos ciclos biogeoquímicos do solo. Dessa forma, a correlação entre a estruturação e o funcionamento destas comunidades com a alteração do uso da terra é direta.

Dentro do cenário da Amazônia, o maior processo promotor do desmatamento é a conversão da floresta para áreas de pastagem (MEYER et al., 2017). Nesta nova situação, é descrita uma maior ocorrência de incêndios, o que aumenta o estresse das plantas, reduzindo a fotossíntese, e aumentando a liberação de gases poluentes (DAVIDSON et al., 2012; IPCC, 2015). Como consequência, ocorre uma maior exposição do solo e um aumento na sua temperatura, fatores que levam a uma maior atividade microbiana transiente e consequente alteração na ciclagem de nutrientes no solo (DIAS-FILHO; DAVIDSON; CARVALHO, 2001; MENDES et al., 2015).

Outro efeito direto desta alteração está na diminuição da quantidade de matéria orgânica do solo, sendo esta processada pela microbiota, dando origem a novos compostos. Sabe-se que alterações na disponibilidade de nutrientes, alterações na temperatura, disponibilidade de água e outros fatores alteram de forma significativa a diversidade e a funcionalidade dos organismos presente no solo. RODRIGUES e colaboradores (2013) observaram que a diversidade taxonômica e filogenética de bactérias do solo foi alterada pelo desmatamento, levando a um aumento da similaridade filogenética e uma homogeneização das comunidades microbianas pela mudança no uso da terra na Amazônia. MIRZA e colaboradores (2014) observaram o mesmo efeito de homogeneização e a redução da diversidade dos grupos microbianos associados ao processo de fixação de nitrogênio, estudando a mudança do uso da terra da floresta para pastagem na Amazônia.

As mudanças do uso da terra através da transformação de floresta para uso não florestal, produção alimentícia e energética, e consequentemente a perda de matéria orgânica do solo, constituem uma das principais fontes atmosféricas de gases poluentes como o dióxido de carbono e o metano (PEDRO et al., 2017)

Esta evidência é confirmada em medições de metano atmosférico, no balanço entre oxidação e redução do metano, em que solos florestais sempre oxidam o metano atmosférico,

enquanto que solos de pastagem as taxas de consumo de metano são maiores principalmente nas estações chuvosas (FERNANDES et al., 2002).

PAULA e colaboradores (2014) avaliaram os genes associados à produção e à oxidação do metano em amostras de floresta e pastagem, e observaram que a frequência de genes relacionados à oxidação do metano foi significativamente mais abundante em amostras florestais, enquanto os genes associados à produção não foram significativamente diferentes entre as amostras de floresta e pastagem. Estes resultados sugerem que o processo de metanogênese poderia ser de mesma intensidade em ambos os solos, enquanto que a metanotrofia tem sua intensidade modulada pelo sistema de uso da terra.

Através da análises metagenômicas, MEYER e colaboradores (2017) avaliaram as diferenças dos microrganismos associados a oxidação do metano em solos florestais e pastagens e confirmaram que metanotrofia tem sua intensidade modulada pelo sistema de uso da terra. Neste trabalho, os autores relatam uma redução na abundância relativa de bactérias metanotróficas e mudanças na composição das comunidades metanotróficas e metanogênicas, bem como mudanças nas estratégias de vida das bactérias metanotróficas.

Desta forma, estas comunidades microbianas envolvidas no ciclo do metano constituem um campo de estudo ideal para a melhor compreensão desta dinâmica, pois a capacidade para produzir ou consumir o metano é filogeneticamente conservada (MARTINY; TRESEDER; PUSCH, 2013), sugerindo que suas funcionalidades podem ser estreitamente ligadas à alteração ambiental, alterando de forma significativa os processos biogeoquímicos (SCHIMEL; GULLEDGE, 1998).

2.3. Ciclo do carbono e transformações do metano

As transformações do carbono no solo encontram-se diretamente relacionados com as mudanças climáticas e ambientais. Esta fração do carbono representa 30 a 60% do estoque de carbono das florestas tropicais, sendo o desmatamento destas áreas responsável por emissões de 7 a 14% do dióxido ao nível global (ARONSON; ALLISON; HELLIKER, 2013; LEWIS et al., 2016).

Nas florestas tropicais, o carbono é depositado no solo pela decomposição de animais e folhas, caules, raízes e pela exsudação de compostos orgânicos, retornando para a atmosfera por meio da decomposição destes materiais, intermediada por microrganismos heterotróficos (ALEJANDRO, 2016). As concentrações de oxigênio, os valores de temperatura e umidade, e a disponibilidade de nutrientes no solo, determinam o fluxo de gases no ecossistema.

Mudanças drásticas no fluxo de gases para a atmosfera têm ocorrido durante toda a história do planeta, alterando a abundância dos gases de efeito estufa e consequentemente atuando no aquecimento do clima global (IPCC, 2015).

Os principais gases que potencializam o efeito estufa de origem principalmente antropogênica, são os dióxidos de carbono (CO_2), metano (CH_4), óxido nitroso (N_2O) e halocarbonos, os quais são liberados na atmosfera por meio de queima de combustíveis fósseis e biomassa, em atividades relacionadas a indústria e agricultura. Na natureza, o metano é o segundo gás mais importante na geração do efeito estufa, aparecendo na lista logo após o CO_2 . Em especial, as moléculas do metano absorvem aproximadamente 25 vezes mais radiações infravermelhas do que o CO_2 (CIAIS et al., 2013; IPCC, 2015; MAHMUD et al., 2014).

O metano é incolor e apresenta baixa solubilidade na água, suas principais fontes são: i) fontes biogênicas, provenientes da degradação da matéria orgânica em condições anaeróbicas, como ocorrem em zonas úmidas naturais, em aterros sanitários, arrozais, ou dentro do rúmen ou em cupins; ii) fontes termogênicas, oriundas da lenta transformação da matéria orgânica em combustíveis fósseis, como formação do gás natural, do carvão e do petróleo; iii) fontes pirogênicas, que dão origem ao metano por meio da combustão incompleta da matéria orgânica (biomassa e queima de biocombustível) (CIAIS et al., 2013).

É importante destacar que mesmo em sistemas naturais ocorre a liberação destes gases, por meio da atividade microbiana, as quais são acentuadas quando da intervenção humana de forma desordenada no sistema. Mais especificamente, existem evidências que as mudanças climáticas e ambientais com a alteração na diversidade de microrganismos estão relacionadas a geração e consumo de metano, e consequentemente interfere no fluxo deste gás na atmosfera e no solo (ARONSON; ALLISON; HELLIKER, 2013).

Alguns estudos indicam uma diminuição inesperada na concentração do metano atmosférico nas últimas décadas, indicando um aumento na atividade da oxidação de metano (AYDIN et al., 2011; CHOWDHURY; DICK, 2013; HEIMANN, 2011). A oxidação do metano nos ecossistemas é a chave importante na redução do metano emitido. A maior parte do metano é destruída na atmosfera da terra, porém o processo de oxidação é realizado por microrganismos e pode ser utilizado como um biofiltro para redução da concentração do gás na atmosfera (ISLAM et al., 2015). Além da menor absorção das radiações, a oxidação deste composto resulta em um maior sequestro de carbono no solo.

Embora o solo seja um filtro relativamente pequeno para o CH_4 , a ausência da oxidação deste composto pode resultar em um aumento na concentração atmosférica de aproximadamente 1,5 vezes. Assim, podemos concluir que o fluxo líquido de CH_4 a partir de um determinado

ambiente é um equilíbrio entre os dois processos opostos: a produção biológica (metanogênese) e a oxidação (metanotrofia) (CHOWDHURY; DICK, 2013; KALLISTOVA et al., 2017).

2.4. Oxidação aeróbica do metano por bactérias metanotróficas

Com papel chave nas transformações do ciclo do metano, a oxidação aeróbica do metano é realizada por organismos chamados de metanotróficas. Estas bactérias têm capacidade de utilizar o metano como fonte de carbono, proporcionando uma grande economia de energia em comparação com a assimilação de carbono por organismos autotróficos (COSTELLO; LIDSTROM, 1999; MADIGAN et al., 2015).

Os primeiros isolados de bactérias metanotróficas foram “*Bacillus methylicus*” e “*Bacillus methanicus*”, obtidos em 1892 por Loews e em 1906 por Kaserer. No entanto, o estudo destes organismos se iniciou em 1970 com Whittenbury e outros (KELLY; WOOD, 2010; WHITTENBURY; PHILLIPS; WILKINSON, 1970a). Em 1970, Whittenbury e outros realizaram o isolamento de bactérias e descreveram células com morfologia diferenciada, com estruturas de membranas internas diferenciadas em mais de cem isolados, formando os gêneros: *Methylococcus*, *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylomas*, *Methylocaldum*, *Methylophaera*, *Methylomicrobium* e *Methylobacter* (WHITTENBURY; PHILLIPS; WILKINSON, 1970a).

Aproximadamente em 1972, Kelly e Wood descreveram os gêneros *Methylosprovbrio*, *Methylothermus*, *Methylosoma* e *Methylobalobius*, os quais acreditavam ser capazes de se multiplicarem utilizando metano ou metanol como fonte de carbono. Porém, em 2005, o isolamento de um novo gênero *Methylocella* mostrou que a metanotrofia não é obrigatória a todos estes gêneros, mas alguns destes gêneros podem crescer em múltiplos substratos de carbonos, consideradas bactérias aeróbicas metanotróficas facultativas (KELLY; WOOD, 2010; THEISEN; MURRELL, 2005).

Hoje, as bactérias metanotróficas são divididas em três grupos taxonômicos, grupos I, II e III, os quais possuem características funcionais e morfológicas distintas, variando suas atividades de acordo com os níveis de oxigênio, metano e nitrogênio. Filogeneticamente, podemos afiliar os grupos da seguinte maneira: grupo I pertencente a classe Gammaproteobacteria; grupo II a Alphaproteobacteria; e grupo III afiliado a Verrucomicrobia (Figura 1a) (KALYUZHNYA; PURI; LIDSTROM, 2015a).

A oxidação do metano propriamente dita ocorre em extensos sistemas de membranas internas da célula bacteriana, onde estão localizadas as enzimas responsáveis pelo processo. As membranas presentes nas bactérias do grupo I e III (Gammaproteobacteria e Verrucomicrobia, respectivamente) são organizadas como feixes de vesículas em forma de disco distribuídos por

toda a célula (Figura 1c). No Grupo II, os gêneros possuem membranas que funcionam em pares ao longo da periferia da célula (Figura 1b) (MADIGAN et al., 2015; MURREIL; GILBERT; MCDONALD, 2000; MURRELL; DALTON, 1992).

Figura 1. Visão geral dos gêneros de metanotróficos, seus metabolismos e sistemas de membranas. (a) os ciclos metabólicos principais estão circulados, são: RuMP: Ribulose monofosfato; CBB: Calvin; Serine: serina. Abreviações encaixotadas são: H₄F: via tetrahydrofolate; H₄MPT: via tetrahydromethanopterin. As enzimas-chave são: pMMO: partículas de metano monooxigenase; sMMO: metano monooxigenase solúvel; MEDH: metanol desidrogenase; HPS: hexulose 6-fosfato-sintase; FDH: desidrogenase de formato; RuBisCO: Ribulose carboxilase 1,5-bifosfato; SHMT: serina hidroximetil. (b) micrografia eletrônica de uma célula de *Methylosinus*, que ilustra um sistema de membrana de tipo II. As células são de cerca de 0,6 µm de diâmetro. (c) micrografia eletrônica de uma célula de *Methylococcus capsulatus*, ilustrando uma membrana do tipo I sistema. As células são cerca de 1 µm de diâmetro. (KALYUZHNAIA; PURI; LIDSTROM, 2015b; MADIGAN et al., 2015).

A oxidação e propriedades da co-oxidação são divididas entre duas enzimas chamadas de monooxigenase do metano. A metano monooxigenase solúvel (sMMO) é encontrada no citoplasma bacteriano, e está presente somente em alguns gêneros. A metano monooxigenase particulada (pMMO) é encontrada em todos os grupos nas estruturas de membrana, utilizada como marcador funcional universal em metanotróficas, apesar de *Methylocella* e *Methyloferula* serem gêneros até agora descoberto que possuem somente a enzima sMMO (BOURNE; MCDONALD; MURRELL, 2001; COSTELLO; LIDSTROM, 1999; HOLMES et al., 1995; KALYUZHNAIA; PURI; LIDSTROM, 2015a; PANDIT et al., 2015).

Por meio da atividade destas enzimas o metano é convertido a metanol. O catabolismo ocorre através da introdução de um átomo de oxigênio no metano, gerando metanol, água e apenas uma molécula de ATP de energia. Após esta conversão, é necessário que o metanol gerado seja oxidado, através da enzima *metanol desidrogenase*, para obter o composto formaldeído e

NADH, que pode ser oxidado a CO₂ ou utilizado em outras vias de biossíntese do carbono orgânico como o ciclo da Serina, Ribulose e Calvin.

Nos isolados com ambos os processos *MMO*, acredita-se que a disponibilidade de íons de Cu²⁺ seja a chave para regular as expressões de *sMMO* ou *pMMO* enquanto que o acetileno inibi a ação desta enzima (HOLMES et al., 1995; KELLY; WOOD, 2010; MURREIL; GILBERT; MCDONALD, 2000). Assim, os métodos independentes de cultivo podem nos proporcionar um melhor resultado, utilizando como marcador o gene que codifica a subunidade alfa desta enzima *pMMO*, o gene *pmoA* (COSTELLO; LIDSTROM, 1999).

O gene *pmoA* codifica uma cadeia de polipeptídios de 27-kDa, a qual é produzida em condições de crescimento onde a atividade de *pMMO* é detectada (HOLMES et al., 1995). O operon *pmo* pode ser encontrado em várias cópias, dentro das quais ocorrem duas ou mais cópias do gene *pmoA*, como por exemplo os gêneros de *Methylocystis*, *Methylosinus* e *Methyloacidophilum* (KNIEF, 2015a).

Nas bactérias que oxidam metano afiliadas a classe Gammaproteobacteria tem-se detectado além do gene *pmoA* também o gene *pxmA*, sendo este mais difundido dentro de um grupo monofilético distinto do *pmoA*. Ainda não se conhece como se molda a expressão destes genes, apesar de sua frequente expressão nos diversos sistemas avaliados (KNIEF, 2015).

Outra questão molecular a ser discutida é a ação das enzimas similares estruturalmente as metano monooxigenase, como por exemplo as amônio monooxigenase (*AMO*), as quais apesar de guardarem distinções, podem por vezes serem detectadas erroneamente e co-amplificadas com conjuntos de primers para a amplificação do gene *pmoA* (KOLB et al., 2003; LÜKE; FRENZEL, 2011; PANDIT et al., 2015). As sequências de aminoácidos conservados entre *pmoA* e *amoA* é de aproximadamente 40%, mostrando conservação no nível de grupos idênticos e refletindo na adaptação das funções *AMO* ou *pMMO*. Junto a isso, a conservação das estruturas primárias e secundárias de *pmoA* e *amoA* sugerem que ambas proteínas compartilham um ancestral comum (HOLMES et al., 1995).

A escolha dos primers no estudo das bactérias oxidadoras de metano tem grande impacto sobre a diversidade detectável, sendo que os primers A189-F (GGN GAC TGG GAC TTC TGG) e mb661-R (CCG GMG CAA CGT CYT TAC C) são os mais utilizados em estudos com o mesmo intuito deste trabalho (BOURNE; MCDONALD; MURRELL, 2001; COSTELLO; LIDSTROM, 1999; HOLMES et al., 1995; LÜKE; FRENZEL, 2011). O primer mb661r tem uma preferência nas publicações recentes pois não amplifica os homólogos oxidantes *amoA*, porém amplifica preferencialmente genótipos de *Methylobacter* (LÜKE et al., 2010; PANDIT et al., 2015).

2.5. A comunidade bacteriana metanotrófica

As bactérias metanotróficas aeróbicas podem consumir 43 a 90% do metano produzido em solos aeróbios e 7 a 10% da emissão global anual líquida de metano, tornando-o um processo chave que contrabalança emissões de metano em ambientes submersos como as zonas húmidas, turfeiras e a aterros (CHOWDHURY; DICK, 2013).

As estruturas da comunidade são diferentes nestes ambientes. Nos solos alagados, com altas taxas de produção de metano (~100ppm), encontram-se a maior parte dos gêneros pertencentes ao grupo taxonômico I, no entanto, em solos de planície onde a concentração do metano é menor do que 2ppm, a oxidação de metano é mais eficiente, e realizada por bactérias pertencentes ao grupo taxonômico II. Porém, a afinidade da enzima na oxidação do metano pode estar relacionada a quantidade de nitrogênio encontrado no ambiente, pois gêneros pertencentes ao grupo I as taxas de crescimento são estimulados com a presença do nitrogênio, enquanto que o tipo II são inibidas nestas condições (CHOWDHURY; DICK, 2013; ELSAS; JANSSON; TREVORS, 2006).

As alterações das comunidades metanotróficas nos diferentes solos podem ser consideradas devido as distintas estratégias de sobrevivência das bactérias metanotróficas (HO et al., 2016). Considerando que as bactérias metanotróficas são enquadradas em diferentes grupos e que as características ecológicas e funcionais também são distintas, mudanças na composição e diversidade destes microrganismos pode afetar diretamente nas taxas de oxidação de metano nos diversos ambientes (STEENBERGH et al., 2010).

Como a capacidade de utilizar o metano como fonte de carbono e energia é praticamente restrita as bactérias metanotróficas, suas funcionalidades podem não ser compensadas por completo por outros grupos microbianos, tornando a oxidação biológica de metano um traço de comunidade microbiana potencialmente vulnerável (HO et al., 2016).

O metano é oxidado primordialmente em condições aeróbicas, porém em ambientes sem oxigênio, a oxidação do metano pode ser realizada através de um consórcio entre as arqueias metanogênicas e as bactérias redutoras de sulfato, fenômeno conhecido como co-agregação microbiana, ou também através da redução do nitrato e nitrito a N_2 (ARONSON; ALLISON; HELLIKER, 2013; KELLY; WOOD, 2010; LEE et al., 2015; MCGLYNN et al., 2015).

Em 2006, a sintrofia de arqueias pertencentes a família Methanosarcinales e bactérias da divisão candidata NC10, denominada "*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*" já havia sido relatado, acoplando a oxidação de metano a desnitrificação (RAGHOEBARSING et al., 2006). Porém sequenciamentos de metagenomas e experimentos fisiológicos com bactérias NC10 forneceram forte indicação para um metabolismo de oxidação de metano intra-aeróbio no qual o nitrito é

primeiro reduzido a óxido nítrico (NO) que é então dismutado para nitrogênio molecular e oxigênio (ETTWIG et al., 2010). A bactéria NC10 responsável por este processo, "*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*", utiliza metano monooxigenase particulado (pMMO) para a oxidação do metano através da via aeróbia semelhante à das bactérias aeróbias metanotróficas, tornando um novo grupo de bactérias metanotrófica ainda a ser explorado. (WELTE et al., 2016).

Outros estudos mostraram que arqueias '*Candidatus Methanoperedens nitritiducens*' oxidam metano através da anaerobiose por meio de uma via de metanogenese reversa, usando nitrato e ferro como doador de elétrons, esta mesma via metabólica também já havia sido documentada com arqueias *Methanosarcina* (LUPOTTO et al., 2016; YAN et al., 2018).

Uma outra linha de pesquisa tem buscado compreender as interações bióticas e elos entre metanotróficos e outros microrganismos. Em laboratório, as bactérias metanotróficas se beneficiam na presença de outras bactérias heterotróficas, enquanto os metabólitos metanotróficos exsudados servem como uma fonte de carbono para os heterotróficos (HO et al., 2016; VERAART et al., 2018). Um exemplo desta interação foi observado no aumento da metanotrófica *Methylovulum miyakonense* em cultivos com *Rhizobium* sp., onde identificou-se o fator estimulante do crescimento como sendo a cobalamina, um nutriente essencial que as bactérias oxidadoras de metano são incapazes de sintetizar intracelularmente e, portanto, depende de uma fonte externa, estimulando o seu desenvolvimento (IGUCHI; YURIMOTO; SAKAI, 2011).

Da mesma forma, outros microrganismos podem realizar este tipo de interação, como observado em consórcios de degradação de metano com bactérias metanotróficas, no qual *Cupriavidus* spp. foram dominantes (LEE; PARK; CHO, 2013). Em culturas contendo *Cupriavidus taiwanensis*, a bactéria metanotrófica *Methylomonas* obteve um aumento de quatro vezes de sua densidade inicial (STOCK et al., 2013).

2.6. Cultivo bacteriano e genômica de bactérias metanotróficas

O isolamento e o cultivo de bactérias metanotróficas são difíceis por uma série de razões, tais como a resistência de alguns gêneros em se multiplicarem em meio sólido, a exigência de ambiente particular para a multiplicação celular, e a grande dificuldade de se multiplicar na presença de fungos e bactérias heterotróficas contaminantes, além da baixa abundância em solos (PANDIT et al., 2015).

De forma a resolver estes problemas, a literatura mostra casos de enriquecimento destas comunidades previamente ao isolamento. Esta metodologia se baseia no uso de diferentes técnicas, concentrações de nutrientes e metano, direcionando o isolamento de acordo com o

meio a ser estudado. Rotineiramente, o enriquecimento da amostra e o cultivo são realizados em pequenas quantidades do meio de cultura NMS (*Nitrato Mineral Salt*), adicionado a frascos vedados com atmosfera de até 01 parte metano para duas partes de ar atmosférico. Variações nas concentrações de Mg, NO₃⁻, SO₄²⁻, O₂ e CO₂, temperatura de cultivo e pH podem influenciar nos grupos a serem isolados (KELLY; WOOD, 2010; WHITTENBURY; PHILLIPS; WILKINSON, 1970b).

Apesar de haver divergências de métodos de enriquecimento e resistência a isolamento, algumas caracterizações morfológicas destas bactérias são descritas na literatura. Estas caracterizações englobam diversos tipos morfológicos, variando de cocos a hastes retas, curvas, e em formas de pêra, os quais possuem formas de resistência em cistos ou esporos. São obrigatoriamente aeróbicas, com paredes Gram-negativas e colônias em ágar com coloração branca, amarelas ou amarronzada, determinada de acordo com a quantidade de cobre encontrado no meio (HANSON; HANSON, 1996; MURRELL; DALTON, 1992).

Apesar das bactérias metanotróficas serem difíceis de serem mantidas em cultura pura, muitas não possuem uma taxa de crescimento alta e crescem melhor em meios contaminados, como *Crenothrix*, bactéria filamentosa metanotrófica que ainda é constituída por um ramo filogenético sem quaisquer genomas de organismos isolados (OSWALD et al., 2017; STOECKER et al., 2006). A fim de superar tais limitação metodológicas, a união de estratégias de enriquecimento destes microrganismos associadas às abordagens de estudos metagenômicos, têm permitido a obtenção de informações taxonômicas destes grupos microbianos no contexto ambiental, além de auxiliar na obtenção de informações de seus processos eco fisiológicos e melhorar o conhecimento de suas vias metabólicas (KIM; KIM; YOON, 2018; STEWART, 2012).

Genomas sequenciados permitem a implantação de abordagens de biologia de sistemas e estão rapidamente se tornando a base para uma investigação mais rigorosa do potencial metabólico e aspectos evolutivos de metanotrofia (KALYUZHNYAYA et al., 2006; TAMAS et al., 2014). TAMAS e colaboradores (2014) utilizaram esta estratégia e realizaram análises comparativas de genomas, onde se revelou que as vias metabólicas envolvidas na oxidação do metano parecem semelhantes, porém com desvios mesmo em genomas de estirpes relacionadas.

No contexto amazônico, existem poucos trabalhos relacionados as comunidades metanotróficas na mudança do uso da terra, e até então nenhuma estirpe foi recuperada de cultivos de enriquecimento ou substrato. Porém, dos poucos trabalhos existentes estes evidenciam a dinâmica e a importância da oxidação do metano em solos florestais e em ambientes degradados, necessitando de estudos mais específicos e profundos (DÖRR; GLASER;

KOLB, 2010; LIMA; MUNIZ; DUMONT, 2014; MIRZA; RODRIGUES, 2012; PAULA et al., 2014).

3. HIPÓTESES

Este trabalho se desenvolveu sob as seguintes hipóteses:

- (i) A composição da alfa e beta diversidade das comunidades relacionadas a metanotrofia é alterada quando ocorrem mudanças no uso do solo em diferentes áreas da Amazônia;
- (ii) O processo de enriquecimento de bactérias metanotróficas a partir de solos da Amazônia sob diferentes usos gera comunidades bacterianas distintas;
- (iii) A abundância e a estrutura genômica das bactérias relacionados a oxidação do metano nos diferentes ambientes amostrados são distintos.

4. OBJETIVOS

Baseado nas hipóteses formuladas, este trabalho tem como objetivo avaliar o impacto das alterações no uso do solo sobre a estrutura genômica e sobre as comunidades bacterianas associadas a oxidação do metano presentes no solo.

4.1. Objetivos específicos

- (i) Determinar a abundância das comunidades metanotróficas a partir do gene funcional *pmoA*;
- (ii) Enriquecimento, caracterização e cultivo de grupos microbianos relacionados a oxidação do metano a partir de solos sob diferentes usos na Amazônia;
- (iii) Avaliar ocorrências de alterações na diversidade dos microrganismos aeróbicos metanotróficos nos diferentes solos, por meio de sequenciamento em larga escala;
- (iv) Identificar grupos associados a oxidação do metano nos diferentes ambientes;
- (v) Realizar a montagem de genomas a partir de dados metagenômicos de bactérias envolvidas no processo.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto faz parte 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). Dessa forma, as amostras aqui analisadas são as mesmas utilizadas nas demais análises a serem desenvolvidas no referente projeto.

Para melhor visualização das etapas do trabalho, foi elaborado um fluxograma com a sequência das atividades realizadas (Figura 2).

Figura 2. Fluxograma das atividades realizadas ao longo do desenvolvimento do projeto de pesquisa.

5.1. Amostragens

A Floresta amazônica constitui um mosaico de terrenos e solos, composições de vegetação e estruturas físicas (LUIZAO et al., 2004; TER STEEGE et al., 2013), possuindo

diferentes padrões climáticos, com o Norte/Nordeste mais úmido, enquanto as florestas no Sul/Sudoeste são mais secas (SOMBROEK, 2001).

Como estas mudanças na precipitação são diretamente afetadas pela mudança do uso do solo, foram selecionados dois sítios de pesquisa para este estudo, no estado de Rondônia (Ariquemes - Fazenda Nova Vida), localizado na região oeste da Floresta Amazônica e no estado do Pará (Santarém - Floresta Nacional de Tapajós), localizado na região leste da Floresta Amazônica (Figura 3).

Figura 3. Localização dos sítios de pesquisa utilizados para o estudo. (a) na região leste da Floresta Amazônica, estado do Pará (Santarém - Floresta Nacional de Tapajós) e (b) região oeste, estado de Rondônia (Ariquemes - Fazenda Nova Vida).

Foram coletas as amostras de solos no final do mês de setembro do ano de 2016, na Floresta Nacional de Tapajós e arredores, englobando duas áreas de floresta primária, floresta secundária e pastagens, totalizando seis áreas. No final do mês de março de 2017, uma segunda coleta foi realizada na Fazenda Nova Vida e arredores, onde foi coletada amostras de 3 áreas de floresta primária e pastagem, totalizando mais seis áreas (Tabela 1).

Para a amostragem, em cada área de coleta foi traçado um transsecto linear de 200 metros com 5 pontos equidistantes (50 m) e destes, 3 pontos de cada perfil foram escolhidos na profundidade de 0-10cm (Figura 4).

Figura 4. Diagrama que representa o transsecto linear com a quantidade total de pontos e a escolha dos pontos amostrados (azul) para o desenvolvimento do projeto.

Tabela 1. Informações dos pontos amostrados, épocas das coletas e características ambientes do período amostrado. Os dados com * são médias referentes a informações atmosféricas do período da coleta. Informações: CPTEC - Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos e INMET – Instituto Nacional de Meteorologia.

Região	Área	Pontos	GPS	Amostragem	Precip. (mm) *	Úmid. (%)*	Temp.*
Santarém	Floresta primária	FP2	S2 51.290 W54 57.396	Set. – Out. /2016	25 – 50	70 – 75	30°C
		FP3	S2 51.422 W54 57.425				
	Floresta secundária	FS2	S3 15.407 W54 53.318				
		FS4	S3 15.846 W54 53.592				
	Pastagem	P3	S3 07.934 W54 57.458				
		P4	S3 07.659 W54 57.197				
Rondônia	Floresta primária	FP1	S10 08.385 W62 54.006	Mar. – Abr./2017	100 – 200	80 – 85	25°C
		FP2	S10 08.026 W62 53.317				
		FP3	S10 08.546 W62 52.922				
	Pastagem	P1	S10 10.144 W62 49.936				
		P2	S10 09.741 W62 50.240				
		P3	S10 12.250 W62 46.452				

Todas as amostras foram armazenadas em gelo desde o local da coleta até a extração do DNA para análises independentes de cultivo do solo inicial. As amostras que foram utilizadas para análises dependentes de cultivo (enriquecimento) e caracterização química do solo foram mantidas em temperatura ambiente.

5.2. Caracterização química das amostras de solo

As amostras de solo das áreas de coleta e pontos amostrados foram submetidas a caracterização das propriedades químicas do solo, sendo assim possível inferir sobre as diferenças de fertilidade destes solos. Para isso, foram encaminhadas ao Laboratório de Análise Química do solo no Departamento de Ciências do Solo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo. Os parâmetros avaliados foram: nitrogênio total (mg.kg^{-1}), pH em CaCl_2 , matéria orgânica (g.dm^{-3}), fósforo (mg.dm^{-3}), magnésio (mmolc.dm^{-3}) e cobre (mg.dm^{-3}).

5.3. Enriquecimento da comunidade metanotrófica

Para estimular a multiplicação das comunidades metanotróficas e uma melhor seleção dos grupos bacterianos de interesse foi utilizada a estratégia de enriquecimento. Para isso, foi utilizado 1,0 grama de cada amostra de solo dissolvida em 9ml do meio de cultura NMS (*Nitrate Mineral Salt*) a pH 6,8 (Anexo A), em frascos com volume total de 40 ml (WHITTENBURY; PHILLIPS; WILKINSON, 1970b). A suspensão resultante foi vedada com tampa de borracha e selada com cliques de alumínio. Foram adicionados 6 ml de gás metano estéril (por membranas filtrantes - 0,22 μ m), compondo aproximadamente 20% (v/v) da concentração atmosférica total do frasco. O metano adicionado corresponde a única fonte de carbono adicionada ao meio de enriquecimento (IGUCHI; YURIMOTO; SAKAI, 2011).

Os recipientes foram armazenados no escuro sob agitação de 150rpm e temperatura controlada de 28°C, por 54 dias sem mudança de frascos. Durante este período, os frascos foram abertos a cada 6 dias para troca gasosa e para a retirada de uma alíquota de 1ml com 13, 28, 43 e 54 dias de enriquecimento para monitoramento das comunidades microbianas (Figura 5).

Figura 5. Preparo do enriquecimento das amostras. (a) Frasco com meio auto clavado (b) Amostras de solo adicionada nos frascos, fechadas com tampas de butila e lacres de alumínio, este após 54 dias de agitação (c) esquema de enriquecimento das amostras.

5.4. Extrações de DNA

A extração de DNA foi realizada com 0,25 g (peso úmido) das amostras de solo e 0,4 ml das amostras de enriquecimento. O kit comercial *PowerSoil® DNA Isolation Kit* (MoBio Laboratories) foi usado para as extrações de DNAs, seguindo as instruções do fabricante. O produto foi verificado em eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) com tampão TAE 1X

juntamente com o marcador de peso molecular *GeneRuler DNA Ladder 1kb* (Invitrogen) e 2 µl do padrão molecular *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology). A eletroforese foi realizada a 10V.cm⁻¹, corada com solução de *GelRed™* 1000x e foto documentado em luz ultravioleta pelo *ImageQuant TL* software program (GE Healthcare Life Sciences). Os DNAs extraídos foram armazenados em -20 °C para usos posteriores.

5.5. Quantificação das comunidades microbianas por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A quantificação do número de cópias de genes bacterianos de 16S rRNA em cada amostra de solo foi estimada por meio de reações de PCR quantitativo, utilizando o equipamento *Real-Time PCR System StepOne* (Applied Biosystems), com o sistema SYBR Green I. As reações foram realizadas em um volume final de 20 µL, contendo: 10 µl de *SYBR® Green PCR MasterMix* (Life Technologies™), 0,25 pmol de iniciadores P1 (5'-CCT ACG GGA GCG AGC AG-3') e P2 (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993), 0,15 mg/ml *Bovine Serum Albumin* (Roche®) e 1 µL (cerca de 10 ng) de DNA molde. As reações foram realizadas com as seguintes condições de ciclo: desnaturação inicial a 95 °C durante 3 min, seguido por 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s e 72 °C durante 30 s. Para verificar a especificidade da amplificação, as curvas de desnaturação (*melting*) foram realizadas com temperaturas crescentes, a partir de 60 °C e chegando a 95 °C. As estimativas de quantificação de log do número de cópias do gene 16S rRNA por grama de solo ou ml de enriquecimento foram calculados comparando os valores de Ct obtidos com os da curva padrão previamente construída com produtos de clones. Com isto, foi determinado a eficiência da quantificação, bem como o valor de regressão logarítmica das diluições utilizadas (R²).

Para a quantificação das comunidades metanotróficas foi realizada a mesma técnica de qPCR anterior, 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 final de 10 µl contendo 5 µl do kit *SYBR Select Master Mix* (Thermo Fisher Scientific), MgCl (1,5mM), BSA (0,40 mg/ml) e 1 pmol/µl dos oligonucleotídeos A189F (GGN GAC TGG GAC TTC TGG) e Mb661R (CCG GMG CAA CGT CYT TAC C) (COSTELLO; LIDSTROM, 1999; HOLMES et al., 1995). As reações foram realizadas com as seguintes condições de ciclo: desnaturação inicial a 95 °C durante 10 min, seguido por 35 ciclos de 95°C durante 30s, 58°C durante 30s e 72°C durante 45s, a desnaturação final de 72°C por 5minutos. Para verificar a especificidade da

amplificação, as curvas de desnaturação (*melting*) foram realizadas com a ciclagem de 95°C por 15s, temperaturas crescentes partir de 58°C por 1 minuto e chegando a 95°C por 15s, as leituras foram realizadas a cada 0,5°C. As estimativas de quantificação em log do número de cópias do gene *pmoA* por grama de solo ou ml de enriquecimento foram calculados comparando os valores de Ct obtidos com os da curva padrão previamente construída utilizando como padrão o DNA do isolado conhecido *Methylosinus sporium* (DSMZ 17706). Com isto, determinou-se 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 dos genes de interesse e o cálculo da razão nos solos analisados. As médias e erros padrões foram calculados e análise de variância (ANOVA) foram determinadas através do software *PAST3* (HAMMER, 2018).

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

Para a caracterização das comunidades totais (bactérias e arqueias) presentes no solo e nos enriquecimentos foi realizado o sequenciamento da região V4-V5 do gene ribossomal 16S rRNA através da plataforma *Illumina MiSeq* (Illumina, USA).

Para cada uma das amostras, um volume de 20µL oriundo da extração de DNA foi liofilizado variando em concentração de 1-50ng e encaminhado ao Centro de Genômica Funcional (ESALQ/USP). A região variável V4-V5 do gene 16S rRNA foi amplificada utilizando os oligonucleotídeos 515F (5'-GTG YCA GCM GCC GCG GTAA-3') e 926R (5'-CCG YCA ATT YMT TTR AG TT'T-3') (WALTERS et al., 2015), utilizando as reações e as condições de amplificação seguindo o protocolo de amplificação 16S rRNA proposto pelo projeto *Earth Microbiome* (<http://www.earthmicrobiome.org/emp-standard-protocols/16s/>). Os *amplicons* foram sequenciados usando a plataforma de sequenciamento *Illumina MiSeq* (Illumina, USA).

5.7. Análises das sequências obtidas

A análise dos dados foi realizada seguindo as recomendações do *Brazilian Microbiome Project* (PYLRO et al., 2014) utilizando-se o pacote e o pipeline *BTW* (MORAIS et al., 2018). Basicamente, as sequências parciais do gene 16S rRNA foram montados, unindo as extremidades *pair-ended*, utilizando *fastq-join* QIIME 1.9 (CAPORASO; KUCZYNSKI; STOMBAUGH, 2010). Após a montagem, foi realizada a filtragem por qualidade utilizando como parâmetro o software *FastQC* o qual a qualidade média definida foi Q30 e o comprimento truncado de 350, as

sequências com valores inferiores ou contendo bases não identificadas foram descartadas utilizando o VSEARCH (ROGNES et al., 2016).

As sequências foram então convertidas em um arquivo *FASTA*, descartadas os *singletons*, realizado o agrupamento em uma matriz de OTUs usando o método UPARSE (ROGNES et al., 2016) com similaridade de 97% e a taxonomia atribuída utilizando o método *uclust*. O arquivo “.*biom*” gerado ao final do pipeline foi utilizado para inferir os índices de diversidades.

Os cálculos de abundância relativa, índices de riqueza (CHAO I), OTUs Observadas (OBSERVED_OTUS), Alfa diversidade (PHYLOGENETIC DIVERSITY) e Beta diversidade (UNIFRAC ponderada) de comunidades totais foram calculados padronizando o número de sequências a partir da tabela original de OTUs, considerado 4.200 sequências por amostra.

Para a avaliação das comunidades metanotróficas, foram selecionados grupos conhecidos na literatura e encontrados no procedimento anterior, realizado a filtragens das OTUs correspondentes e calculados os índices de riqueza, alfa e beta diversidade.

Ambos os dados, de comunidades totais e metanotróficas, foram gerados executando os *scripts* disponíveis no QIIME 1.9 (CAPORASO; KUCZYNSKI; STOMBAUGH, 2010). Os valores de médias, desvios padrões, análises de variâncias (ANOVA), teste de Tukey e análises de similaridades (ANOSIN), foram calculados utilizando o Software *PAST3* (HAMMER, 2018) e pela plataforma estatística *RStudio*.

As figuras de Análise de Coordenadas Principais (PCoA), para os dados de caracterização do solo, foram geradas utilizando a ferramenta estatística www.microbiomeanalyst.ca (DHARIWAL et al., 2017) utilizando a métrica de distância UNIFRAC ponderada. Para os dados dos enriquecimentos, as figuras de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) foram gerados na plataforma estatística do R, utilizando o pacote “*Vegan*”.

5.8. Análises de *network*

As análises de correlações microbianas das bactérias metanotróficas e dos demais componentes da comunidade bacteriana foi realizada através da matriz de abundância de todas as OTUs obtidas pelo programa QIIME 1.9.

A matriz foi utilizada como dados de entrada e a análise foi realizada com a ferramenta MENA (*Molecular Ecological Network Analysis*) através do servidor <http://ieg2.ou.edu/MENA/main.cgi> (DENG et al., 2012). O primeiro passo foi o cálculo da significância das OTUs, considerando somente as detectadas em mais de 50% das amostras foram utilizadas para a construção da matriz. Definiu-se para os cálculos da matriz de

similaridade o Coeficiente de Correlação de Pearson (R^2) e o modelo de distribuição randômica, a regressão Poisson. Os resultados obtidos foram unificados e a correlação adotada a partir da faixa de significância de $p < 0,05$.

Com a matriz de co-ocorrência e co-exclusões geradas, foram realizadas as análises de *network*, por meio do uso do programa *Cytoscape 3.6* (SHANNON et al., 2003). Como resultado, foram representadas as OTUs significativas e as linhas correspondem as correções positivas (co-ocorrência) ou negativas (co-exclusões) relacionados aos grupos metanotróficos encontrados.

5.9. Metagenoma dos cultivos enriquecidos

Para a montagem das bibliotecas metagenômicas foram selecionadas amostras do processo de enriquecimento representantes das cinco áreas estudadas: floresta primária, secundária e pastagem da região de Santarém e floresta primária e pastagem da região de Rondônia. A seleção foi realizada com base na abundância relativa de bactérias metanotróficas e na estrutura da comunidade, determinadas na análise anterior.

A extração de DNA foi realizada como descrito no item 5.4. A qualidade e a concentração do DNA serão mensuradas por espectrometria no *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific) e encaminhadas ao Centro de Genômica Funcional (ESALQ/USP). A montagem da biblioteca metagenômicas foi realizada utilizando o kit *Nextera DNA Library Preparation* (Illumina) e o sequenciamento foi em plataforma *HiSeq Flow Cell v4*, com o *HiSeq SBS Kit v4* e leituras pareadas de 100 bp (2x).

As análises dos dados brutos gerados foram inseridas no servidor *MG-RAST* (WILKE et al., 2014) para análise automatizada dos metagenomas e obtermos informações quantitativas sobre populações microbianas com base em dados de sequência (Submissões 381039-42 e 381147).

Em seguida, as sequências foram filtradas por qualidade utilizando o software *Trimmomatic* e a montagem das sequências realizada com o auxílio do software IDBA-UD (PENG et al., 2012). Com a formação dos *contigs*, a reconstrução de genomas individuais foi realizada pelo método de *binning* com o auxílio do software *Metabat*. A qualidade e o nível de contaminação dos genomas obtidos foram calculados pelo programa *CheckM v.0.9.4* (PARKS et al., 2015). Os *bins* com qualidade moderada ($>50\%$) e nível de contaminação médio ($<10\%$), foram selecionados para as análises posteriores e considerados MAGs (*Metagenome Assembled Genome*) (ALNEBERG et al., 2018).

A anotação dos genomas montados (MAGs) foram realizadas através da plataforma *RAST* (MEYER; PAARMANN; D'SOUZA, 2008) e regiões do genoma como ORFs (*open reads frames*) e regiões repetitivas foram identificadas e anotadas pelo conjunto de ferramentas *RASTtk* (BRETTIN et al., 2015). As anotações dos genes foram comparadas com as informações bioquímicas contidas no KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (KANEHISA; GOTO, 2000).

5.10. Isolamentos e seleções de bactérias

Uma alíquota de 0,1ml do enriquecimento com 13 dias foi inoculada em meio sólido NMS (*Nitrate Mineral Salt*) a pH 6,8 (WHITTENBURY; PHILLIPS; WILKINSON, 1970b). As placas de Petri resultantes foram armazenadas em frascos vedados com gás metano estéril (por membranas filtrantes - 0,22µm) na proporção de aproximadamente 20% (v/v) da concentração atmosférica total do frasco (IGUCHI; YURIMOTO; SAKAI, 2011) (Figura 6a).

Os recipientes foram armazenados no escuro e temperatura controlada de 28°C por 13 dias. Durante este período os frascos foram abertos a cada 6 dias para troca gasosa e as colônias monitoradas. Após a formação das colônias, estas foram selecionadas aleatoriamente, estriadas em novas placas contendo o mesmo meio de cultura e atmosfera de metano para a sua purificação.

Foi realizada a coloração de Gram para seleção de bactérias, na busca de características previamente descritas na literatura como metanotróficas, bem como para confirmação da purificação das colônias. Este método consistiu de um esfregaço da colônia bacteriana em uma lâmina com 10 a 20µl de água destilada auto clavada. Em seguida o material foi fixado com o auxílio do calor de uma chama. As células fixadas foram então submetidas à coloração com solução cristal de violeta, seguida de lavagem em água destilada esterilizada, e imersão em lugol. Após esta coloração as células foram lavadas em água destilada e imersas em solução de etanol: acetona (1:1). A lavagem final ocorreu em água destilada e a coloração final das células foi promovida por imersão em solução de safranina (1%). As lâminas foram então secas ao ar e observadas com microscópio óptico (100X) (Figura 6b).

Após realização da seleção das colônias, estas foram submetidas a cultivo em meio líquido e sólido NMS (*Nitrate Mineral Salt*) nas mesmas condições do enriquecimento anterior (Figura 6c).

Figura 6. Isolamento e seleção de bactérias. (a) frascos contendo gás metano para incubação de placas de petri e seleção de colônias. (b) caracterização e seleção de isolados através da coloração de Gram. (c) crescimento de estirpes selecionadas em meio líquido NMS com gás metano.

5.11. Amplificação do gene ribossomal 16S rRNA dos isolados bacterianos

O DNA bacteriano foi extraído de 2mL das culturas puras obtidas dos cultivos usando o kit comercial *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega) e foram submetidos à identificação taxonômica por meio de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada utilizando os *primers* 1492R (5' CGG TGT GTA CAA CGC CCG GGA ACG 3') e 027F (5' GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3')(WEISBURG et al., 1991) , numa reação com volume final de 50μL, onde foram utilizados 1μL de DNA (aprox. 50ng), 31,8μL de água estéril para análises moleculares, 4μL de dNTP's (2,5mM), 7,5μL de MgCl₂ (25mM), 5μL de *Taq Buffer* (10x), 0,5μL de *Taq DNA polimerase* (5U. μL⁻¹) e 0,1μL (100mM) de cada *primer*. A amplificação foi realizada em um termociclador *Applied Biosystems Veriti®* utilizando os seguintes ciclos: desnaturação inicial (94 °C por 4 minutos), 30 ciclos compostos por desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (63 °C por 1 minuto) e extensão inicial (72 °C por 1 minuto), finalizando a reação com a extensão final (72 °C por 10 minutos).

Para cada isolado, uma alíquota de 5μL do produto de amplificação foi verificada em eletroforese de gel de agarose 1% (p/v) com tampão TAE 1X juntamente com o peso molecular *GeneRuler DNA Ladder 1kb* (Invitrogen). A corrida foi realizada a 10V.cm⁻¹, corada com solução de GelRed™ 1000x e foto documentado em luz ultravioleta.

As amostras amplificadas foram purificadas com o kit *PureLink® PCR Purification* (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante. Após a purificação, uma alíquota de 1μL de cada amostra foi quantificada em eletroforese em gel de agarose 1,7% (p/v) com tampão TAE

1X juntamente com peso molecular *GeneRuler DNA Ladder 1kb* (Invitrogen) e *MassRuler Low Range DNA Ladder* (Invitrogen). As concentrações de todas as amostras foram ajustadas para 50ng. μl^{-1} e encaminhadas para laboratório de Biotecnologia Animal no Departamento de Zootecnia (ESALQ/USP) para o sequenciamento automatizado utilizando a técnica de Sanger, onde foi utilizado ambos o *primers* como a base para reação de sequenciamento (Genetic Analyzer ABI PRISM377, Applied Biosystems Inc.).

Os dados resultantes foram analisados utilizando o programa *CLC Genomics Workbench* (CLCbio, a QIAGEN Company), onde através da ferramenta *Quality Trimming* as sequências foram avaliadas e as sequências que apresentaram baixa qualidade foram eliminadas (qualidade Phred menor que 20 e tamanho mínimo de 200 bases).

As sequências válidas foram comparadas com as disponíveis no GenBank (nt/nt) por meio de *BLASTn* (Basic Local Alignment Search tool) e as com maior similaridade com as obtidas no presente estudo foram então utilizadas para a inferência com base em árvores filogenéticas.

Análises filogenéticas e evolutivas moleculares foram conduzidas usando o software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* versão 7.0 (MEGA 7) (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), as sequências foram alinhadas, e um dendrograma foi obtido com base na similaridade de aproximadamente 500pb do gene 16S rRNA utilizando o método Máximo Verossimilhança (ML), baseado no modelo de Kimura 2-parâmetro. A confiabilidade dos ramos formados determinada pela análise de *bootstrap* com base em 1000 sub-amostragem randômicas.

6. RESULTADOS

6.1. Caracterização dos solos estudados

6.1.1. Características química

As características químicas do solo são relevantes para a determinação da diversidade das comunidades microbianas, portanto foram escolhidas as principais características que podem influenciar as comunidades metanotróficas, como nitrogênio total, pH, matéria orgânica, fósforo, magnésio e cobre.

Os valores médios de nitrogênio total, matéria orgânica e fósforo, obtidos a partir dos diferentes solos, foram semelhantes ($p > 0,05$). Porém, as quantificações de pH e os outros nutrientes foram distintas nos diferentes usos do solo e nas duas áreas estudadas (Tabela 2). As principais características distintas nas diferentes áreas são:

- pH: em solos de pastagens, a média dos valores de pH ($4,4 \pm 0,3$ em Santarém e $4,9 \pm 0,2$, Rondônia) foram maiores em comparação ao solo de florestas primárias ($3,2 \pm 0,1$, Santarém e $4,5 \pm 0,4$, Rondônia) e secundária ($3,5 \pm 0,2$). Porém, estatisticamente as áreas também são distintas, com florestas de Santarém apresentando valores de pH diferentes das florestas de Rondônia.
- Magnésio: as quantidades de magnésio foram distintas entre os solos de pastagem ($8,17 \pm 3,2 \text{ mmolc.dm}^{-3}$) com a floresta primária ($2,33 \pm 0,4 \text{ mmolc.dm}^{-3}$) e floresta secundária ($2,50 \pm 0,8 \text{ mmolc.dm}^{-3}$) em Santarém. No entanto, pastagens e floresta de Rondônia não mostraram a mesma resposta, sendo estas semelhantes em relação a este parâmetro.
- Cobre: as quantidades de cobre não apresentaram diferenças estatísticas na área de Santarém. Já na área de Rondônia, os valores médios de cobre em pastagem ($2,13 \pm 0,98 \text{ mg.dm}^{-3}$) foram distintos dos observados na floresta primária ($0,87 \pm 0,51 \text{ mg.dm}^{-3}$).

Tabela 2. Valores médios dos atributos químicos analisados dos solos coletados (0-10cm) nas diferentes áreas e uso da terra. Médias seguidas com a mesma letra não apresentam diferenças estatísticas entre si (Tukey<0,05).

Área	Amostra	N total (mg.kg ⁻¹)	pH (CaCl ₂)	MO (g.dm ⁻²)	P (mg.dm ⁻²)	Mg (mmolc.dm ⁻³)	Cu (mg.dm ⁻³)
Santarém	Floresta primária	2472,2 a	3,2 c	34,3 a	7,5 a	2,33 b	0,25 b
	Floresta secundária	1428,0 a	3,5 c	41,8 a	9,8 a	2,50 b	0,13 b
	Pastagem	1606,5 a	4,4 b	29,7 a	8,0 a	8,17 a	0,18 b
Rondônia	Floresta primária	2071,2 a	4,5 b	33,7 a	12,6 a	5,66 ab	0,87 b
	Pastagem	2063,4 a	4,9 a	37,6 a	9,2 a	6,77 a	2,13 a

6.1.2. Quantificação das comunidades microbianas por PCR em tempo real (qPCR)

A primeira caracterização microbiológica do solo foi realizada através da quantificação de bactérias totais, utilizando como alvo o gene ribossomal 16S rRNA (Figura 7a). Os valores de regressão logarítmica das curvas obtidas (R^2) foi de 0,99 e as quantificações foram determinadas em $\log_{10}$ g de solo⁻¹. Os dados mostraram que os solos da área de Santarém apresentaram valores similares, com quantidades médias detectadas próximas a 10^9 cópias do gene por grama de solo ($P=0,223$). Em contrapartida, os valores quantitativos médios de $2,88.10^9$ referentes a floresta primária de Rondônia foram superiores ao da pastagem na mesma área, com $8,66.10^8$ cópias por grama de solo ($P<0,001$) (Figura 7a).

Para a quantificação das comunidades metanotróficas, foi realizada a quantificação do gene *pmoA* (Figura 7b) e o valor de regressão logarítmica (R^2) foi de 0,99. As comunidades metanotróficas representadas pelo gene *pmoA* apresentaram quantidades médias detectadas próximas a 10^6 cópias do gene por grama de solo ($\log_{10}$ g de solo⁻¹). Comparando a área de Rondônia, verificou-se que estas foram mais abundantes em pastagem, com média de $4,22.10^7$ cópias do gene, em comparação ao solo de floresta, valores médios de $2,38.10^6$ cópias por grama de solo ($P=0,003$). Na área de Santarém, não foi observada diferença significativa entre os diferentes usos do solo ($P=0,29$), com médias de $1,89.10^6$, $5,03.10^5$ e $2,08.10^6$ cópias do gene *pmoA* por grama de solo, para as áreas de floresta primária, secundária e pastagem, respectivamente (Figura 7b).

Uma análise complementar foi realizada, determinando a razão entre as quantificações do gene *pmoA* em relação as quantificações de bactérias totais, determinada pelo gene universal

16S rRNA, gerando um gráfico com proporção de 0 a 1 (Figura 7c). Nestas análises, os diferentes usos do solo na área de Santarém não mostraram diferenças estatísticas ($P=0,75$), enquanto que na área de Rondônia, a proporção do gene *pmoA* no solo de pastagens foi maior em relação ao de floresta ($P<0,001$).

Figura 7. Quantificação das comunidades bacterianas através do gene ribossomal 16S rRNA (a), metanotróficas pelo gene *pmoA* (b) e razão (c) em solos das diferentes áreas amostradas. Para os gráficos a e b, os valores indicam a média em log10 dos valores de cópias por grama de solo. As barras do erro padrão foram gerados a partir das réplicas biológicas e valores de P, análise de variância.

6.1.3. Sequenciamento da região V4-V5 do gene ribossomal 16s rRNA em diferentes amostras de solo

6.1.3.1. Caracterização microbiológica da comunidade total

Com o sequenciamento da região V4-V5 do gene ribossomal 16S rRNA realizado, foi possível determinar a descrição da estrutura da comunidade total (bactérias e arqueias) nos diferentes usos do solo e áreas coletadas. Inicialmente, foram comparados os valores dos índices de riqueza, alfa diversidade e beta diversidade encontrados em cada uma das áreas (Figura 8).

O número de espécies observadas (Figura 8b) como o número total de espécies, estimado pelo do índice de riqueza CHAO I (Figura 8a), não apresentaram diferenças significativas entre os solos amostrados e áreas de coleta ($P=0,211$). Apesar de não apresentar diferenças significativas ($P=0,0484$), as médias de OTUs observadas apresentaram valor mais elevado em solos de pastagem e as médias de floresta primária da área de Rondônia também foi mais elevada em relação a floresta primária da área de Santarém (Figura 8b). Quando realizado o

estudo da diversidade filogenética (Figura 8c), foi observada diferença estatística entre as florestas primárias da área de Santarém e Rondônia ($P=0,002$) (Figura 8c).

Em contraste, na beta diversidade, medida pelo índice de dissimilaridade UNIFRAC ponderado, houve uma diferença significativa entre as amostras ($P<0,001$). Na área de Santarém, a beta diversidade foi mais elevada em solos de pastagem, enquanto que em Rondônia este índice foi menor em pastagem quando comparado a floresta primária, evidenciando que as comunidades avaliadas foram significativamente mais semelhantes em florestas primária de Santarém e em pastagens de Rondônia. Estes dados também indicam que a estrutura da comunidade se diferencia tanto entre os diferentes solos quanto nas duas áreas estudadas (Figura 8d).

Figura 8. Valores médios de índices de riqueza e diversidade obtidos das comunidades totais nos diferentes usos do solo e áreas amostradas. (a) índices de riqueza (Chao I); (b) OTUs Observadas (c) Diversidade filogenética; (d) Beta diversidade (Unifrac ponderada). As letras apresentadas nas barras representam as diferenças nas comparações das médias por teste de Tukey ($p<0,05$), as barras o desvio padrão gerado através das réplicas biológicas.

Foi realizada a análise de coordenadas principais (PCoA) através da matriz de dissimilaridade UNIFRAC ponderada, o que demonstrou que em ambas as áreas amostradas, houve uma diferença significativa entre as amostras ($P < 0,001$). Observa-se que, tanto na área de Santarém (Figura 9a) quanto em Rondônia (Figura 9b), as estruturas das comunidades das florestas primárias e pastagens são distintas.

Figura 9. Análise das coordenadas principais (PCoA) ilustrando as separações entre as comunidades totais nos diferentes usos do solo utilizando a matriz de dissimilaridade Unifrac. (a) referente a área de Santarém e (b) Rondônia.

Com base nestes dados, foi calculado a abundância relativa dos principais filos encontrados, e determinados os grupos mais abundantes presentes nas amostras, compostos por: Acidobacteria, Proteobacteria, Actinobacteria e Chloroflexi (Figura 10). Além estes, outros filos em menor percentagem foram encontrados, como WPS-2, Verrucomicrobia, Planctomycetes, AD3, Crenarchaeota, Bacteroidetes, Firmicutes, Chlamydiae, GAL15, Cyanobacteria, Gemmatimonadetes, Elusimicrobia, Armatimonadetes, Euryarchaeota, FCPU426, Tenericutes, Nitrospirae, TM7, TM6, OP3, Chlorobi, Fibrobacteres, OD1, OP11, Spirochaetes, Parvarchaeota, BRC1, WS3 e Fusobacteria, completando um total de 33 filos.

Figura 10. Médias da abundância relativa dos principais filos encontrados nas áreas de Santarém e Rondônia e nos diferentes usos do solo. Os dados são resultados da classificação de sequências representativas de cada uma das OTUs obtivas (97% de similaridade) com a distribuição de 4.200 sequências por amostra.

Representantes do filo Acidobacteria apresentaram abundância relativa mais elevada nas amostras de florestas primária do que em pastagem em ambas as áreas. Na área de Santarém, este grupo representou 44% das sequências alocadas nas OTUs classificadas na floresta primária, 32% na floresta secundária e 17% em pastagem. Em Rondônia, o filo Acidobacteria apresentou abundância relativa de 27% em solo florestal e 15% em pastagem (Figura 10).

Para o filo Proteobacteria não houve diferença discrepante entre as amostras. Na área de Santarém foi mais abundante em floresta secundária (33,9%) em comparação a floresta primária (27%) e pastagem (27,7%), enquanto que na área de Rondônia a média da abundância relativa foi maior em floresta primária (31,6%) do que em pastagem (26,6%). Porém Chloroflexi, Actinobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes apresentaram diferenças entre amostras de florestas e

pastagens em ambas as áreas, a média de abundância relativa foram mais altas em solos de pastagens.

O filo Actinobacteria foi encontrado em 7,87% das sequências contidas nas OTUs classificadas em solos de floresta primária, 6,79% em floresta secundária e 13,9% em solos de pastagem, na área de Santarém. Em Rondônia, as porcentagens de sequências foram semelhantes aos da área de Santarém, com a porcentagem maior em solos de pastagens, sendo 7,79% em solos de floresta primária e 14,55% em pastagem.

Em relação ao filo Firmicutes as alterações foram maiores, com médias de 0,67% para floresta primária, 10,8% para pastagens e 3,39% em floresta secundária em Santarém. Na área de Rondônia esta diferença de proporção foi confirmada, com média de 2,64% das sequências oriundas da floresta primária e 14,4% de áreas de pastagem.

6.1.3.2. Caracterização da comunidade de bactérias metanotróficas presentes nas amostras de solo estudadas

Para a descrição da estrutura da comunidade de bactérias metanotróficas, foi realizada a filtragem das OTUs afiliadas a gêneros bacterianos já descritos na literatura como bactérias metanotróficas. Apesar da baixa abundância encontrada nos solos estudados, foi possível realizar a descrição da estrutura dessas comunidades (Figura 11).

Foi observado que o número estimado de espécies, calculado através do índice de riqueza CHAO I (Figura 11a), não apresentou diferença significativa entre os solos amostrados e áreas de coleta ($P=0,06$). Estes dados complementam os encontrados para o número de OTUs observadas (Figura 11b), onde também não foram observadas diferenças estatísticas entre os solos da área de Santarém, mas pode-se observar uma diferença significativa entre as áreas de pastagem da área de Rondônia com os demais solos ($P=0,0218$). Quando realizada a comparação diversidade filogenética (Figura 11c) observou-se que não houve diferença estatística entre os solos ($P=0,1853$).

Realizando os cálculos de beta diversidade, medida em índice de dissimilaridade UNIFRAC ponderada, houve diferença estatística entre as amostras ($P = 0,0327$). Na área de Santarém, a beta diversidade não se alterou entre os solos, porém na área de Rondônia, esta foi menor nos solos de pastagens, evidenciando que a comunidade de bactérias metanotróficas encontrada foi mais semelhante em solos de pastagem do que em solos de floresta primária, mostrando que a alteração na estrutura da comunidade metanotrófica, nesta área se diferencia entre os diferentes solos (Figura 11d).

Figura 11. Valores médios de índices de riqueza e diversidade obtidos das comunidades metanotróficas nos diferentes usos do solo e áreas amostradas. (a) índices de riqueza (Chao I); (b) OTUs observadas; (c) Diversidade filogenética; (d) Beta diversidade (Unifrac ponderada). As letras apresentadas nas barras representam as diferenças nas comparações das médias por teste de Tukey ($p < 0,05$), as barras o desvio padrão gerado através das réplicas biológicas.

Com as mesmas comparações entre as OTUs, foi realizada a análise de coordenadas de principais (PCoA) através da matriz de dissimilaridade UNIFRAC ponderada, confirmando que na área de Santarém os pontos de réplicas dos diferentes solos se sobrepõem, mostrando que as comunidades metanotróficas podem ser semelhantes nestes solos (Figura 12a). Já nos solos da área de Rondônia, a estrutura da comunidade metanotrófica da floresta primária e pastagem é distinta ($P < 0,001$), indicando que a comunidade de bactérias metanotróficas encontrada pode ser mais semelhante entre as amostras de solo de pastagem do que em solo de floresta primária (Figura 12b).

Figura 12. Análise das coordenadas principais (PCoA) ilustrando as separações entre as comunidades metanotróficas nos diferentes usos do solo, utilizando a matriz de dissimilaridade Unifrac ponderada. (a) referente a área de Santarém e (b) Rondônia.

A análise taxonômica das sequências das OTUs filtradas revelou os grupos de bactérias metanotróficas presentes nas amostras e suas abundâncias relativas, principalmente destacando a presença de representantes dos 3 principais grupos metanotróficos conhecidos (Figura 13a).

Figura 13. Médias das abundâncias relativas das bactérias metanotrófica encontradas nos diferentes usos do solo e áreas amostradas. (a) representa os valores médios dos três grupos metabólicos de bactérias metanotróficas encontradas e (b) representam os valores médios em nível de gênero e valores de P, a análise de variância.

Pode-se observar que em solos de pastagens as médias foram mais elevadas (0,06% para área de Santarém e 0,09% em Rondônia), em comparação aos solos de floresta primária (0,02% para área de Santarém e 0,04% para Rondônia) e secundária (0,02%) (Figura 13a).

Bactérias metanotróficas do grupo II (Alphaproteobacteria) foram presentes em todas as amostras com médias elevadas em solos de pastagens em comparação aos solos de florestas, o

mesmo ocorreu com as metanotróficas do grupo I (Gammaproteobacteria). No entanto, as metanotróficas do grupo III (Verrucomicrobia) foram mais abundantes no solo de floresta secundária e bactérias metanotróficas do grupo II (Alphaproteobacteria) foram mais abundantes em todos os usos de solo em comparação ao grupo I (Gammaproteobacteria) (Figura 13a).

Dentro do grupo das bactérias metanotróficas, os gêneros *Methylosinus* e unclassified *Methyloacidiphilales* foram os únicos representantes encontrados, pertencentes ao grupo II e III respectivamente. Já entre as metanotróficas do grupo I, foram encontradas diversas OTUs afiliadas filogeneticamente a unclassified *Methylococcales*, *Crenothrix*, unclassified *Methylococcaceae*, *Methylobacter*, *Methylocaldum* e *Methylomicrobium* (Figura 13b).

Na área de Santarém, foram encontradas somente sequências afiliadas a *Methylosinus* (grupo II) e unclassified *Methyloacidiphilales* (grupo III) em solos de floresta primária e secundária, enquanto que no solo de pastagem, além destas citadas, também encontramos representantes de *Methylocaldum* e unclassified *Methylococcaceae*, ambos pertencentes ao grupo I. Na área de Rondônia, além das únicas representantes dos grupo II (*Methylosinus*) e III (unclassified *Methyloacidiphilales*), encontramos OTUs correspondentes a *Methylobacter* somente em solo de floresta, e *Methylomicrobium* em solo de pastagem. O gênero de bactérias metanotróficas *Methylocaldum* teve um aumento na abundância relativa em solos de pastagem em comparação ao solo de floresta em ambas as áreas (Santarém e Rondônia).

6.2. Enriquecimento das comunidades metanotróficas

A estratégia de realizar enriquecimentos das comunidades metanotróficas possibilitou uma melhor visualização e caracterização da resposta das mesmas frente ao estímulo ambiental.

6.2.1. Quantificação das comunidades microbianas por PCR em tempo real (qPCR)

Com a realização do enriquecimento dos solos, foi realizado o acompanhamento das alterações microbiológicas ao longo do tempo, iniciando com a quantificação de bactérias totais pelo gene 16S rRNA e de bactérias metanotróficas pelo gene *pmoA*. As condições foram as mesmas relatadas anteriormente, curvas obtidas (R^2) de 0,99 e as quantificações em $\log_{10}$ g de solo⁻¹ para as amostras de solo e $\log_{10}$ ml de enriquecimento⁻¹ para as amostras de enriquecimento (Figura 14).

Figura 14. Quantificação das comunidades bacterianas e metanotróficas nos diferentes usos do solo, áreas e ao longo do enriquecimento. As figuras (a) e (d) refere-se à quantificação da comunidade bacteriana total pelo gene 16S rRNA, (b) e (e) metanotróficas pelo gene *pmoA* e (c) e (f) quantificação relativas calculados através da razão. As áreas de Santarém correspondem as Figuras (a), (b) e (c), e Rondônia (d), (e) e (f). Os valores indicam a média, em $\log_{10}$ do número de cópias por grama de solo ou ml de enriquecimento, as barras de erro padrão foram geradas a partir das réplicas biológicas e valores de P, a análise de variância.

Os dados quantitativos de bactérias totais, tendo como ponto inicial o solo, mostraram que na área de Santarém houve um declínio no número de cópias do gene aos 13 dias de enriquecimento ($P < 0,001$), de 10^9 cópias do gene por grama de solo no tempo inicial para aproximadamente 10^7 .mL enriquecimento⁻¹, e após mantendo-se na média de 10^8 cópias do gene por ml de enriquecimento ao longo dos demais dias (Figura 14a). O mesmo ocorreu com a floresta primária da área de Rondônia, com variação de 10^9 no solo inicial para 10^8 aos 13 dias de enriquecimento e mantendo-se a 10^9 nos demais dias de enriquecimento ($P < 0,001$). No enriquecimento de pastagem na área de Rondônia não houve alteração significativa entre os tempos de enriquecimentos ($P = 0,8025$), sendo a quantidade mantida em 10^8 cópias por ml (Figura 14d).

Na avaliação do gene funcional *pmoA*, as médias entre os períodos de enriquecimento apresentaram um crescimento inicial em todos os solos e áreas, com declínio nos últimos dias (Figura 14b e 14e), porém com número de cópias diferentes entre os usos do solo.

Na área de Santarém, o número de cópias do gene nos diferentes tempos de enriquecimento não foi significante em nenhum dos tipos de solo utilizados, porém podemos destacar que a média do número de cópias do gene *pmoA* em solos de floresta primária teve um aumento de $1,89.10^6$ para $9,34.10^7$ com 54 dias de enriquecimento. No enriquecimento de floresta secundária, houve um aumento de $5,03.10^5$ para $2,88.10^6$ na média de cópias por ml de enriquecimento; e em pastagem o aumento foi de $2,08.10^6$ para $4,44.10^7$ cópias por ml de enriquecimento (Figura 14b).

Em solos da área de Rondônia, o enriquecimento de floresta primária mostrou um resultado distinto ao longo do processo ($P < 0,001$), com $2,38.10^6$ cópias do gene por grama de solo houve um aumento para $2,6.10^8$ cópias por ml em 54 dias de enriquecimento. Em pastagem, como na área de Santarém, não houve significância, porém, pode-se observar que houve um aumento nas médias de $4,22.10^7$ cópias do gene no solo para $3,7.10^8$ cópias do gene por ml de enriquecimento (Figura 14e).

Para validar o método foi realizado o cálculo da quantificação relativa através da razão entre os valores das quantificações dos genes *pmoA* e do gene 16S rRNA, gerando um gráfico para cada área amostrada com proporção de 0 a 1 (Figura 14c e 14f).

Através destes dados foi possível confirmar que os enriquecimentos dos diferentes usos do solo na área de Santarém não obtiveram diferenças significativas, porém a média das quantificações relativas nos enriquecimentos de floresta secundária e pastagens teve um aumento aos 13 dias de enriquecimento, enquanto que na floresta primária a quantificação relativa foi maior aos 54 dias de enriquecimento. A quantificação relativa nas amostras enriquecidas de

pastagens manteve a média acima das quantificações de floresta primária e secundária ao longo de todo o enriquecimento (Figura 14c).

Na área de Rondônia, a análise de variância mostrou significativa em ambos os enriquecimentos de floresta primária e pastagem, o enriquecimento de 28 dias foi o que revelou maior quantificação relativa em relação aos outros tempos de enriquecimento. Em relação aos solos, não houveram diferenças significativas, com os solos oriundos de diferentes usos apresentando comportamentos semelhantes.

6.2.2. Sequenciamento da região V4-V5 do gene ribossomal 16s rRNA

6.2.2.1. Caracterização microbiológica da comunidade total

Com o enriquecimento das amostras de solo, houve alteração na composição das amostras, apontada a partir do sequenciamento da região V4-V5 do gene 16S rRNA. Em todas as áreas, alterações significativas entre as amostras enriquecidas, em comparação ao solo, foram encontradas para os valores de riqueza, alfa diversidade e beta diversidade (Figura 15).

Foi observado que o número de espécies, estimado por meio do índice de riqueza CHAO I (Figura 15a), e o número de OTUs observadas (Figura 15b), apresentaram diferença estatística entre as amostras de solo e enriquecidas ($P < 0,001$) em todos os usos do solo e área de coleta, com altos valores nas amostras de solo, e diminuição ao longo do enriquecimento.

Os valores de diversidade filogenética (Figura 15c) também apresentaram uma diminuição após o solo ser enriquecido ($P < 0,001$), destacando que, mesmo com o enriquecimento, as médias de diversidade em pastagens são maiores quando comparada com florestas.

Em contraste, a beta diversidade, foi significativamente mais elevada em todas as amostras enriquecidas quando comparadas ao solo inicial, evidenciando que a comunidade das amostras enriquecidas possui estrutura diferenciada quando comparada ao solo inicial, e são menos semelhantes entre si quando comparadas o padrão de amostras do solo original (Figura 15d).

Com base nestes dados, foi realizada a análise de coordenadas principais (PCoA) utilizando a matriz de dissimilaridade UNIFRAC ponderada, que permitiu observar que em ambas as áreas e solos, as amostras de enriquecimento são diferentes do solo inicial e as amostras enriquecidas são mais distantes entre si (Figura 16). Observa-se ainda, que há diferença no padrão das comunidades geradas ao longo do enriquecimento de maneira dependente do solo de origem,

evidenciando composições distintas entre as amostras dos usos do solo florestas e pastagem, em ambas as áreas de Santarém e Rondônia (Figura 16a e 16b). No entanto, as amostras de floresta primária e secundária de Santarém não se diferenciaram, indicando a pastagem mesmo com a estruturação do enriquecimento, mais distinto em relação as demais (Figura 16a).

Figura 15. Valores médios de índices de riqueza e diversidade obtidos das comunidades totais nos diferentes usos do solo, tempos de enriquecimento e nas áreas amostradas. (a) índices de riqueza (Chao I); (b) OTUs Observadas; (c) Diversidade filogenética; (d) Beta diversidade (Unifrac ponderada). As letras apresentadas nas barras representam as diferenças nas comparações das médias por teste de Tukey ($p < 0,05$), as barras o desvio padrão gerado através das réplicas biológicas e as cores representam os tempos de enriquecimento: ■ Soil ■ 13days ■ 28days ■ 43days ■ 54days.

Figura 16. Análise das coordenadas principais (PCoA) ilustrando as separações entre as comunidades totais nos diferentes usos do solo e tempos de enriquecimento, utilizando a matriz de dissimilaridade Unifrac. (a) referente a área de Santarém e (b) Rondônia.

Foi possível identificar os grupos taxonômicos que mais se alteraram com o enriquecimento das amostras, onde representantes de Proteobacteria e Bacteroidetes mostraram aumento em todas as amostras enriquecidas. Apesar deste aumento, o filo Bacteroidetes teve um enriquecimento maior em pastagens quando comparado a florestas. Representantes de Firmicutes tiveram padrão diferenciado, apresentando um aumento na maioria das amostras, e uma diminuição de 14,4% para 5,55% aos 54 dias no enriquecimento de pastagem da área de Rondônia (Figura 17). Representantes do filo Acidobacteria e Actinobacteria apresentaram diminuição da abundância relativa em todas as amostras.

Figura 17. Médias da abundância relativa dos principais filos encontrados nos diferentes usos do solo, ao longo dos tempos de enriquecimento e nas diferentes áreas amostradas.

6.2.2.1. Caracterização da comunidade metanotrófica

Para a descrição da estrutura da comunidade de bactérias metanotróficas ao longo dos enriquecimentos, foi realizado o mesmo procedimento descrito anteriormente para a caracterização do solo inicial e a realização das filtrações das OTUs já descritas na literatura como bactérias metanotróficas.

Foi observado que o número de espécies totais estimado pelo índice de riqueza CHAO I (Figura 18a), não apresentou diferença significativa entre os solos amostrados e enriquecimentos em floresta primária ($P=0,5254$) e secundária ($P=0,3237$) na área de Santarém. Porém, pode-se observar que as médias foram menores nos enriquecimentos de floresta primária. Nos demais enriquecimentos, houve um aumento significativo entre o solo amostrado e o enriquecimento, destacando que em pastagem de Santarém a diferença ocorreu aos 13 dias de enriquecimento ($P<0,05$), enquanto que na área de Rondônia, as médias foram maiores aos 28 dias de enriquecimento.

Figura 18. Valores médios de índices de riqueza e diversidade obtidos das comunidades metanotróficas nos diferentes usos do solo, tempos de enriquecimento e áreas amostradas. (a) índices de riqueza (Chao I); (b) OTUs Observadas; (c) Diversidade filogenética; (d) Beta diversidade (Unifrac ponderada). As letras apresentadas nas barras são diferenças estatísticas nas comparações das médias por teste de Tukey ($p < 0,05$), as barras de desvio padrão foram geradas através das réplicas biológicas, os valores de P referem a análise de variância e as cores representam os tempos de enriquecimento: ■ Soil ■ 13days ■ 28days ■ 43days ■ 54days.

Em relação ao número de OTUs observadas (Figura 18b), não foram observadas diferenças entre os enriquecimentos de floresta primária ($P=0,5335$) e secundária ($P=0,201$) da área de Santarém, porém em pastagem, no tempo de 13 dias de enriquecimento houve um aumento significativo desta comunidade ($P=0,0112$). Na área de Rondônia, em ambos os usos do solo foram observados aumento no número de espécies de bactérias metanotróficas nos enriquecimentos ($P=0,0023$ para floresta primária e $P<0,001$ para pastagem). Em ambas as áreas, as médias em pastagens foram mais altas quando comparadas as médias de floresta primária.

Quando calculado a diversidade filogenética (Figura 18c), confirmaram-se as mesmas tendências observadas nas amostras enriquecidas de floresta primária e secundária da área de Santarém nas análises anteriores, não apresentando diferenças, mas um aumento na amostra de pastagem coletada no tempo de 13 dias de enriquecimento ($P=0,0132$). Na área de Rondônia, em ambos os usos do solo foi observado um aumento da diversidade filogenética de bactérias metanotróficas nos enriquecimentos ($P=0,0088$ para floresta primária e $P=0,0032$ para pastagem), com as médias em pastagens mais altas quando comparadas à floresta primária.

Realizando o cálculo de beta diversidade, medida em índice de dissimilaridade UNIFRAC ponderada (Figura 18d), apesar das médias serem mais altas em amostras enriquecidas, não houve diferença estatística em floresta primária e pastagem da área Santarém, restando apenas uma diferenciação em floresta secundária, na amostra de solo coletada aos 13 dias de enriquecimento.

Em Rondônia, em floresta primária houve diferenciação estatística ($P<0,001$) somente aos 54 dias de enriquecimento. Na pastagem da mesma área, as comunidades metanotróficas foram mais semelhantes no solo inicial e houve uma dispersão significativa entre os tempos de 28 e 43 dias de enriquecimentos (Figura 18d).

Com base nestes dados foi verificado quais grupos de bactérias metanotróficas foram enriquecidas e que este aumento se deu de forma diferenciada nos 3 grupos metabólicos encontrados no início do experimento (Figura 19).

Figura 19. Médias da abundância relativa das bactérias metanotrófica encontradas nos diferentes usos do solo e áreas amostradas. (a) representa os valores médios dos três grupos metabólicos de bactérias metanotróficas encontradas e (b) representam os valores médios em nível de gênero, as barras indicam o desvio padrão da média e valores de P, análise de variância.

Uma alta variação entre as réplicas biológicas foi observada nas amostras enriquecidas, porém podemos observar que em todos os solos e nas duas áreas, as médias das frequências de grupos metanotróficos aumentaram com o enriquecimento (Figura 19a). Pode-se observar que não foram todos os grupos que tiveram alteração com o enriquecimento, representante do grupo III (Verrucomicrobia) não apresentou enriquecimento ao longo do tempo. Assim, os grupos bacterianos mais responsivos ao processo de enriquecimento realizado foram, primeiramente, o grupo I (Gammaproteobacteria) e grupo II (Alphaproteobacteria).

Na área de Santarém, metanotróficas do grupo II (Alphaproteobacteria) tiveram um aumento constante ao longo do enriquecimento em solo da floresta primária, de média 0,02% no solo para 1,62% aos 54 dias de enriquecimento. Em solo da floresta secundária e pastagem, bactérias pertencentes a Alphaproteobacteria apresentou aumento no início do enriquecimento e um declínio nos últimos dias, o aumento de 0,02% em solo de floresta secundária para 3,51% aos 13 dias e 0,04% em solo de pastagem para 4,42% aos 28 dias. Metanotróficas do grupo I (Gammaproteobacteria) apresentaram alterações menos perceptíveis em solos de floresta primária, de 0,0002% para 0,07% aos 13 dias, e secundária, de 0,0008% para 0,015% aos 28 dias, porém em pastagem houve um aumento de 0,02% do solo para 19,22% aos 13 dias de enriquecimento.

Na área de Rondônia, metanotróficas do grupo II (Alphaproteobacteria), também apresentaram um aumento constante ao longo do enriquecimento em solo de floresta primária, de média 0,03% para 5,76% aos 54 dias. Porém, em solo de pastagem, como ocorreu em Santarém, apresentaram um aumento no início do enriquecimento, de 0,06% para 3,55% aos 28 dias e um declínio os últimos dias. Metanotróficas do grupo I (Gammaproteobacteria), diferentemente da área de Santarém, mostraram aumento nas frequências, tanto em solos de floresta primária como de pastagem no início do enriquecimento, de 0,01% para 16,31% aos 13 dias para floresta primária e 0,02% para 20,92% aos 13 dias para pastagem, após aos 13 dias um declínio.

Verificando os gêneros encontrados, classificados como metanotróficos, foi possível identificar os mais responsivos ao enriquecimento em cada ambiente analisado. Nas amostras de solo foram encontradas somente sequências do gênero *Methylosinus* (pertencente ao grupo II) e unclassified *Methylacidiphilales* (pertencentes ao grupo de III). No entanto, ao longo dos enriquecimentos, uma maior quantidade de sequências foi afiliada aos gêneros pertencentes ao grupo I, como os grupos unclassified *Methylococcales*, *Crenothrix*, unclassified *Methylococcaceae*, *Methylobacter*, *Methylocaldum*, *Methylococcus*, *Methylomicrobium*, *Methylomonas*, *Methylosarcina*. Alguns destes, como *Methylomas* e *Methylosarcina*, presentes nas amostras de solo em baixa abundância relativa, o que impediu sua detecção nas amostras iniciais, indicando a importância da prática do enriquecimento para este tipo de estudo (Figura 19b).

Na área de Santarém, mesmo com o enriquecimento, os solos de floresta primária e secundária apresentaram maior abundância relativa dos gêneros *Methylosinus* e unclassified *Methylacidiphilales*, e um aumento para 0,007%, 0,06% e 0,004% dos gêneros *Crenothrix*, unclassified *Methylococcaceae* e *Methylosarcina*, respectivamente em solo de floresta primária.

Na área de Rondônia, como mencionado anteriormente, o gênero *Methylosinus* teve um aumento constante na floresta primária e aumento seguido de diminuição em na pastagem. Este aumento seguido de diminuição também foi observado em outros gêneros, como unclassified *Methylococcales*, *Crenothrix*, unclassified *Methylococcaceae* e *Methylosarcina*. Podemos notar que gêneros como *Methylobacter* e *Methylocaldum* foram unicamente enriquecidos em solo de pastagem nesta área de Rondônia e *Methylocalcum* em pastagem de Santarém (Figura 19b).

6.3. Interações microbianas

6.3.1. Análises de *network*

Com o intuito de avaliar associações positivas e negativas entre os grupos microbianos identificados nos diferentes usos dos solos e ao longo dos enriquecimentos, e inferir sobre interações ecológicas da comunidade microbiana, foi utilizada a análise de *network*, na tentativa de correlacionar a ocorrência diferencial de grupos bacterianos nos diferentes solos e áreas coletadas.

Os resultados mostraram que amostras enriquecidas da área de Santarém apresentaram a quantidade de nós maiores em enriquecimento de pastagem (Tabela 3). No entanto, as ocorrências positivas (co-ocorrência) foram maiores (85,9%) em enriquecimento de floresta primária, enquanto que pastagens apresentaram maior número de correlações negativas (co-exclusões), 36,9% correlações negativas em comparação a 14,1% em floresta primária (Tabela 3).

Tabela 3. Número de nós e ocorrências positivas (co-ocorrência) e negativas (co-exclusões) encontradas na análise de *network* das comunidades microbianas analisadas nas diferentes áreas e uso do solo e enriquecimento.

Área	Amostra	Similaridade threshold	Modularidade (módulos)	Network (nós)	Links		
					Negativo (%)	Positivo (%)	Total (n°)
Santarém	Floresta primária	0.8100	0.435 (14)	171	14,10	85,90	390
	Floresta secundária	0.7400	0.579 (11)	163	35,82	64,18	402
	Pastagem	0.7000	0.645 (12)	231	36,96	63,04	514
Rondônia	Floresta primária	0.7100	0.629 (16)	306	69,96	30,04	456
	Pastagem	0.7300	0.708 (23)	217	82,92	17,08	281

Contrário aos dados coletados da área de Santarém, a área de Rondônia apresentou o maior número de nós em enriquecimento de floresta primária. No entanto, as ocorrências positivas (co-ocorrência) foram maiores (30,04%) em enriquecimento de floresta primária, enquanto que pastagens apresentaram maior número de correlações negativas (co-exclusões), 82,92% em comparação a 69,96% em floresta primária (Tabela 3).

Em ambas as áreas, a modularidade nos enriquecimentos de pastagens (0,645 e 0,708, Santarém e Rondônia, respectivamente) também foi maior em comparação a floresta primária (0,435 e 0,629, Santarém e Rondônia, respectivamente). Desta forma, foi observado que as correlações encontradas se diferenciam entre nos usos do solo.

Um detalhamento desta análise elencou os filos que apresentaram maior número e o tipo de correlações, onde se destacam os filos Proteobacteria, Acidobacteria e Actinobacteria que apresentaram 815, 414 e 230 correlações, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Número de co-ocorrência (positivas) e co-exclusões (negativas) encontradas nos principais filos em relação as diferentes áreas e uso do solo.

Phylum	Santarém						Rondônia				Total
	Floresta primária		Floresta secundária		Pastagem		Floresta primária		Pastagem		
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
Acidobacteria	14	151	10	39	18	51	64	26	31	10	414
Actinobacteria	0	21	5	26	22	38	38	26	47	7	230
AD3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Armatimonadetes	1	7	0	0	0	0	0	0	1	0	9
Bacteroidetes	0	0	2	0	8	4	12	2	5	2	35
Chlorobi	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3
Chloroflexi	2	39	0	2	1	3	7	0	34	2	90
Crenarchaeota	0	7	0	0	1	0	2	2	0	0	12
Cyanobacteria	0	1	0	2	1	2	3	1	0	0	10
Elusimicrobia	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3
Euryarchaeota	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	3
Firmicutes	26	2	60	0	60	14	5	0	11	6	184
Gemmatimonadetes	2	1	0	0	5	0	11	1	11	0	31
Nitrospirae	0	0	1	0	0	1	4	7	0	0	13
Planctomycetes	2	5	2	0	9	0	14	3	10	3	48
Proteobacteria	7	88	51	167	54	176	139	58	61	14	815
Verrucomicrobia	0	2	13	7	6	8	14	10	11	2	73
WPS-2	1	11	0	0	0	0	0	0	0	0	12
WS3	0	0	0	0	0	0	3	1	5	2	11
Unclassified	0	0	0	15	2	27	0	0	2	0	46
Total	55	335	144	258	190	324	319	137	233	48	2043

Na área de Santarém, bactérias afiliadas ao filo Acidobacteria, Proteobacteria e Actinobacteria, apresentaram o maior número de correlações positivas em todos os usos do solo. O filo Acidobacteria teve maior número de correlações positivas na floresta primária em comparação a floresta secundária e pastagens. Enquanto que o filo Proteobacteria teve o maior número de correlações positivas em floresta secundária e pastagem. Em relação as correlações negativas, o filo Firmicutes teve o destaque nos três diferentes enriquecimentos (Tabela 4) e a maior parte destas correlações negativas foram associadas ao filo Acidobacteria (Anexo B).

Na área de Rondônia, em oposição a Santarém, os filos Acidobacteria, Proteobacteria e Actinobacteria, apresentaram maior número de correlações negativas em solos de floresta primária (Tabela 4). Os filos que apresentaram maiores correlações aparentemente se

correlacionaram com todos os filos encontrados, porém se percebe que na pastagem, o filo Firmicutes com maior número de correlações negativas com o filo Proteobacteria (Anexo B).

Nas análises de *network* com o objetivo de verificar as relações estabelecidas pelas bactérias metanotróficas, não foram encontradas correlações significativas em floresta primária na área de Santarém, enquanto que em floresta primária de Rondônia, somente foi observada a correlação entre OTUs do mesmo gênero (*Methylosinus*). Em floresta secundária, o gênero *Methylosinus* apresentou 2 correlações negativas com OTUs classificadas como *Salinispora* e *Koribacteraceae*. OTUs de *Methylosinus* também mostraram correlações positivas com *Flavisolibacter* em pastagem da área de Santarém. Nas *networks* de pastagem da área de Rondônia o número de OTUs correlacionadas foram maiores, sendo que os gêneros metanotróficos *Methylobacter*, *Methylocaldum* e unclassified *Methylococaceae* apresentaram correlações negativas com diversos gêneros encontrados, unclassified *Methylococaceae* e *Methylobacter* com pelo menos uma correlação negativa com OTUs classificadas como filo *Chloroflexi* (Figura 20).

Figura 20. Análise de *network* por co-ocorrência e co-exclusões de OTUs componentes da comunidade total analisada relacionadas as bactérias metanotróficas em nível de gênero, nos diferentes usos do solo e enriquecimento amostrados. Cada círculo representa uma OTU; as linhas cinzas e vermelhas representam respectivamente as correlações negativas e positivas significativas ($p < 0,05$) em relação as bactérias de interesse.

6.3.2. Isolamentos, cultivo e caracterização microbiana

Na realização de isolamentos de bactérias foram selecionadas e identificadas 24 estirpes. A afiliação taxonômica destes isolados revelou que nenhum destes apresentou similaridade com bactérias afiliadas aos gêneros descritos na literatura como metanotróficas (Figura 21).

Alguns destes gêneros bacterianos foram encontrados em uma única área. No entanto, estirpes afiliadas ao gênero *Burkholderia* foram isoladas nos diferentes solos da área de Santarém e em Rondônia somente em floresta primária. Na área de Santarém, foram encontrados isolados afiliados ao gênero *Cupriavidus* e *Dyella* somente em floresta primária, *Ralstonia* em floresta secundária e *Pandorea* em ambas os solos de floresta primária e secundária. Em Rondônia, isolados afiliados ao gênero *Pseudomonas* foram isolados em enriquecimento do solo de floresta primária e pastagem, enquanto isolados afiliados aos gêneros *Mitsuaria* e *Duganella* somente foram obtidos de enriquecimento de pastagem e *Caulobacter* em floresta primária (Figura 21).

Figura 21. Dendrograma dos isolados com base na similaridade de aproximadamente 500pb do gene 16S rRNA utilizando o método Máximo Verossimilhança (ML), baseado no modelo de Kimura 2-parâmetro. Os valores de *bootstrap* nas árvores foram obtidos com base em 1000 sub-amostragem. Os isolados obtidos estão em negrito e a afiliação em itálico com as identificações do banco de dados entre parênteses.

Nas análises de *network*, não foram encontradas correlações significativas de bactérias metanotróficas com os gêneros bacterianos isolados, porém verificou que estes isolados foram enriquecidos juntamente durante o cultivo, mostrando evidências que estas foram favorecidas com o aumento da abundância relativa relacionadas as estirpes isoladas (Figura 22).

Os gêneros *Burkholderia*, *Cupriavidus* e *Dyella* foram enriquecidas com maior eficácia na área de Santarém, enquanto que *Pseudomonas* teve um aumento na abundância relativa nos enriquecimentos de solos de pastagem em Santarém e em ambos os solos na área de Rondônia. Desta forma, tem-se evidências de que estes gêneros foram beneficiados com o enriquecimento e podem possuir alguma correlação com as bactérias metanotróficas.

Figura 22. Médias da abundância relativa das bactérias isoladas e encontradas através do sequenciamento 16S rRNA nos diferentes usos do solo, tempos de enriquecimento e áreas amostradas.

Foram investigados a presença de outros tipos de metanotrofia, como bactérias redutoras de sulfato, arqueias *Methanosarcina* e *Candidatus Methyloirabilis oxyfera*, porém não foram encontradas evidências no enriquecimento destes grupos pela metodologia utilizada.

6.4. Metagenoma e reconstrução dos genomas a partir dos cultivos enriquecidos

Com as amostras caracterizadas e avaliadas, foram selecionadas amostras do processo de enriquecimento representantes das cinco áreas estudadas: floresta primária, secundária e pastagem da região de Santarém e floresta primária e pastagem da região de Rondônia. A seleção foi realizada com base na abundância relativa de bactérias metanotróficas e na estrutura da comunidade.

O sequenciamento dos metagenomas gerou um total de 13 milhões de sequências com 156 pb (R1 e R2), distribuídos em 5 *datasets* com uma média de 2,6 milhões de sequências por

amostra. Destas, uma média de 5,2% não passou pelo controle de qualidade do *pipeline* do MG-RAST.

A avaliação taxonômica das comunidades foi realizada utilizando a anotação filogenética dos *reads* metagenômicos (Figura 23). Através da curva de rarefação apresentada, pode ser observado que o número de espécies e *reads* em enriquecimento de floresta secundária foi mais alta quando comparada aos demais enriquecimentos, porém o número de espécies em pastagens foi mais alto em comparação a florestas primárias (Figura 23a).

Dentro dos dados avaliados, o domínio *Bacteria* foi predominante na composição das comunidades microbianas em todas as áreas de estudo, representando aproximadamente 98% do conjunto de dados. O filo bacteriano encontrado em maior abundância em todos os enriquecimentos foi Proteobacteria, seguido de Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e Acidobacteria (Figura 23b).

Nos enriquecimentos da área de Santarém, o filo Proteobacteria teve uma abundância relativa maior em floresta primária (77%) em comparação a floresta secundária e pastagem (63% e 65%, respectivamente). Em contrapartida, o filo Firmicutes teve uma abundância relativa maior em floresta secundária (18%) e o filo Bacteroidetes uma abundância relativa de 11% em enriquecimento de pastagem (Figura 23b).

Nas amostras enriquecidas da área de Rondônia, o filo Proteobacteria teve abundância relativa maior em floresta primária (80%) em comparação a pastagem (64%), enquanto que os filos Actinobacteria e Bacteroidetes tiveram a abundância relativa mais elevada em enriquecimento de pastagem.

Figura 23. Análise dos metagenomas obtidos através do servidor MG-RAST. (a) curva de rarefação obtida de cada amostra sequenciada e (b) os principais filos encontrados. As siglas iniciais com s, se refere a Santarém e r a Rondônia. FP, floresta primária; FS, floresta secundária e P, pastagem.

Dentre os principais gêneros encontrados nas amostras avaliadas observa-se que o gênero *Burkholderia* teve a abundância relativa mais elevada em enriquecimento de floresta primária e secundária, enquanto o gênero *Methylobacter* teve a abundância relativa maior nas amostras de pastagens e floresta primária da área de Rondônia, confirmando que as florestas primárias de Santarém e Rondônia possuem características distintas mesmo após o enriquecimento (Figura 24).

Figura 24. Abundância relativa dos principais gêneros anotados pelo servidor MG-RAST. As letras se referem as diferentes amostras, (a) floresta primária de Santarém, (b) floresta secundária de Santarém, (c) pastagem de Santarém; (d) floresta primária de Rondônia, (e) pastagem de Rondônia.

Com os dados avaliados e realizadas as reconstruções genômicas, foram gerados 91 bins. Após a realização da filtragem por qualidade, obteve-se um total de 45 *Metagenome Assembled Genome* (MAG) entre os 5 *datasets* (Anexo C).

Após os MAGs terem sido anotados na plataforma *RAST* (Tabela 5) e comparados ao KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), os MAGs que continham a via metabólica metanotrófica foram selecionadas e comparadas (Tabela 5).

Na área de Santarém, houve uma diferenciação dos MAGs encontrados entre as amostras de florestas e pastagem (Tabela 5). Os MAGs marcados filogeneticamente a Rhizobiales (Alphaproteobacteria) foram encontradas somente em floresta primária e secundária, nestas os genomas continham somente a via do metano monooxigenase particulada C (*pmoC*). Ainda, na análise do genoma montado pertencente à floresta primária, apresentou 2 cópias do gene, enquanto que em floresta secundária somente 1 cópia do gene foi encontrada. Percebe-se ainda que o MAG de floresta secundária, apesar de conter 85% do genoma e a contaminação ter valor de 0,47%, apresenta uma heterogeneidade de 100%, indicando que este MAG pode ter se formado com várias populações diferentes. Em pastagem, foram montados 4 genomas, um número maior do que os encontrados em florestas primária e secundária, todos com similaridade a Gammaproteobacteria. Todos os MAGs com similaridade a Gammaproteobacteria encontradas em pastagens possuem o gene *pmoC*, porém nem todos possuem os genes *pmoB* e *pmoA*. Apenas dois MAGs com similaridade Gammaproteobacteria foram descritos com a formação do operon *pmoCAB*, uma com *pmoCB* e uma somente o gene *pmoC* (Tabela 5).

Na área de Rondônia, foram montados 5 genomas, destes somente um em floresta primária e os demais em pastagem. Dos genomas montados, foi encontrado somente um com similaridade a Rhizobiales, pertencente a pastagem. Porém, todos estes possuem o sistema operon *pmoCAB*, alguns com mais de uma cópia.

Tabela 5. Informações dos genomas montados (MAG), anotados e comparados ao KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) dos diferentes enriquecimentos e áreas de coleta.

Área	Amostra	MAGs	Marcador de linhagens	Nº Genomas	% Genoma	Contaminação	Heterogeneidade	Contigs	bp	Metano monooxigenase particulada (EC 1.14.13.25) – Subunidades		
										C	B	A
Santarém	Floresta primária	1.05	Rhizobiales	92	98,01	0,62	0	43	3.548.014	2	0	0
		1.20	Rhizobiales	92	99,53	1,14	16,67	55	4.079.132	2	0	0
	Floresta secundária	9.08	Rhizobiales	92	84,77	0,47	100	416	3.011.676	1	0	0
		3.01	Gammaproteobacteria	112	95,69	1,59	30	215	4.885.560	1	2	1
	Pastagem	3.15	Gammaproteobacteria	112	84,13	1,76	62,5	331	3.399.282	2	1	0
		3.18	Gammaproteobacteria	112	88	0,58	0	248	4.192.494	3	1	2
		3.23	Gammaproteobacteria	112	90,81	4,94	70,97	337	3.839.180	2	0	0
Rondônia	Floresta primária	4.04	Gammaproteobacteria	112	96,73	0,94	0	393	5.150.800	2	2	2
		5.08	Rhizobiales	92	98,01	2,2	66,67	240	3.776.709	3	1	1
	Pastagem	5.11	Gammaproteobacteria	112	96,46	1,15	30	107	4.357.643	1	1	1
		5.13	Gammaproteobacteria	112	92,23	1,63	25	373	4.685.015	1	1	1
		5.21	Gammaproteobacteria	112	97,28	1,84	30	229	3.926.979	3	2	2

Não foi possível realizar a anotação taxonômica dos genomas montados (MAGs) e a recuperação do gene ribossomal 16S rRNA, os quais são genomas montados a partir de metagenomas, porém foi recuperado o fragmento do gene *recA* conhecido como marcador filogenético. Sequências do gene *recA* e *pmoC* foram comparadas com sequências encontradas no banco de dados GenBank (Figura 25).

Em ambos os dendrogramas reconstruídos, os MAGs foram semelhantes em comparação aos dois fragmentos utilizados, confirmando que possuem similaridades com marcadores de linhagens diferenciadas. Os MAGs de Rhizobiales tiveram 80% de similaridade com genomas encontrados no banco de dados com *Methylocystis*, metanotróficas Alphaproteobacteria (tipo II). Os MAGs de Gammaproteobacteria (tipo I), foram subdivididas em dois grupos, um grupo com 80% de similaridade a bactérias classificadas como *Methylomonas* e outro com similaridade a *Methylovulum*. Como os genomas montados são provenientes da montagem de genomas por metagenomas (MAG), não se pode afirmar o gênero ou espécie pertencente, somente o grau de similaridade com genomas encontrados no banco de dados.

Figura 25. Dendrogramas dos genomas montados (MAG) com base no fragmento da proteína *recA* (a) e *pmoC* (b) utilizando o método Máximo Verossimilhança (ML), baseado no modelo de Kimura 2-parâmetro e similaridades de aproximadamente 960pb e 690pb, respectivamente. Os valores de *bootstrap* nas árvores foram obtidos com base em 1000 sub-amostragem. Os isolados obtidos estão em negrito e a afiliação em itálico com as identificações do banco de dados entre parênteses, as cores azul e amarelo indicam Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria, respectivamente.

Com o sistema de comparações de proteínas do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), foi comparada uma região com 16.000 pb entre os genomas montados, permitindo observar que mesmo o genoma montado possui mais de uma cópia do gene *pmoC*, os fragmentos comparados possuem genes diferentes. Observa-se ainda que os genomas que contem estrutura relacionada ao metabolismo tipo II, possui a tendência de ter mais genes cuja posição relativa é conservada em comparação aos outros MAGs (Figura 26).

Nos genomas montados de metanotróficas do tipo II, a comparação dos fragmentos mostrou que em pelo menos uma das cópias a função 8, hypothetical protein, foi presente em todos MAGs de florestas enquanto o mesmo não foi presente na pastagem (Figura 26). No genoma montado de pastagem, foi observado os genes *pmoB* e *pmoA*, além de *Hydrogenase-4* e *LysR-family* em pelo menos uma das cópias, sendo que estes genes não foram encontrados nas

análises de floresta. Esta análise indica que genomas montados com similaridade as mesmas linhagens filogenéticas e metabólicas podem possuir metabolismos diferentes.

Em relação a MAGs de metanotróficos com similaridade ao tipo I, o subsistema Amonificação de nitrato e nitrito foi observado como uma posição relativa conservada em pelo menos quatro outros genomas montados. Nestas mesmas linhagens, foram encontradas proteínas ligadas a transportes de polissacarídeos como *LptA*, *LptB* e *LptC*.

Com a comparação destes fragmentos evidenciamos que nem todos os genomas montados realizam o ciclo de oxidação completa do metano completo, pois somente em dois genomas montados foram encontradas a enzima ativadora de formaldeído (*14-Formaldehyde activating enzyme*), evidenciando que nem todos os genomas montados são também metilotróficos, podendo atuar apenas na metanotrofia.

Figura 26. Comparação das regiões do gene *pmoC*. O gráfico é centrado no gene foco, que é vermelho e numerado 1. Conjuntos de genes com sequência similar são agrupados com o mesmo número e cor. Os genes cuja posição relativa é conservada em pelo menos quatro outros genomas montados são funcionalmente acoplados e compartilham caixas de fundo cinza. O tamanho da região foi 16000 pb e foram comparadas até 30 regiões tendo como ponto inicial a amostra 1.05. O gene de foco sempre aponta para a direita, mesmo que esteja localizado na linha negativa. Funções: 1- *Particulate methane monooxygenase C-subunit*; 2- *Particulate methane monooxygenase A-subunit*; 3- *Particulate methane monooxygenase B-subunit*; 4- *Uncharacterized MFS-type transporter*; 5- *Transcriptional regulator, LysR family*; 6- *hypothetical protein*; 7- *hypothetical protein*; 8- *hypothetical protein*; 9- *hypothetical protein*; 10- *Proline iminopeptidase*; 11- *D-arabinose 5-phosphate isomerase*; 12- *3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate phosphatase*; 13- *Lipopolysaccharide export system protein LptC*; 14- *Formaldehyde activating enzyme*; 15- *hypothetical protein*; 16- *FIG00455579: hypothetical protein*; 17- *LSU ribosomal protein L31p*; 18- *AmpG permease*; 19- *Na⁺/H⁺ antiporter NhaD type*; 20- *Carboxyl-terminal protease*; 21- *Glycine oxidase ThiO*; 22- *Sulfite reductase [NADPH] hemoprotein beta-component*; 23- *Hydrogenase-4 component F*; 24- *Lipopolysaccharide export system protein LptA*; 25- *Dihydroorotate dehydrogenase (quinone)*; 26- *Lipopolysaccharide ABC transporter LptB*.

7. DISCUSSÃO

7.1. Caracterização dos solos estudados

A conversão do solo florestal para pastagem pode gerar desestruturação do solo, aumentando sua susceptibilidade à erosão e impactando em mudanças na sua composição química. O solo de floresta tropical amazônico, sem modificação antrópica, compõe um ambiente relativamente estável e com rica produção de biomassa diversificada em comparação com a monocultura dos solos de pastagem. Solos de pastagem tem maior índice de reflexão de calor, podendo provocar concentração da precipitação na área, alta quantidade de conteúdo radicular e menor equilíbrio entre os microrganismos residentes, gerando pressão de seleção nas comunidades microbianas presentes (DAVIDSON et al., 2012; NAVARRETE et al., 2015b). Além disso, como os resultados apontam, solos de florestas secundárias apresentaram atributos químicos do solo mais semelhantes às áreas de floresta primária, enquanto que as pastagens exibiram a maior dissimilaridade (MOREIRA et al., 2009).

A semelhança estatística entre os diferentes usos do solo nos valores de nitrogênio total e fósforo impossibilitam avaliar suas interferências na comunidade total e metanotrófica, podendo estar presentes no solo em diferentes graus de susceptibilidade à metabolização biológica.

A matéria orgânica não apresentou diferença quantitativa, mas pode ser composta qualitativamente de maneira bastante distintas entre os diferentes ambientes, como exemplo a exsudação radicular da forrageira da monocultura e excrementos dos animais pastoris, que tende a homogeneizar a diversidade de fontes de carbono para a biologia do solo (NAVARRETE et al., 2015b).

Os valores de pH impactam diretamente na comunidade microbiana dos solos, modulando a estrutura e composição. Os baixos valores encontrados nos solos de florestas são característicos de solos tropicais, naturalmente ácidos, pobres em nutrientes e geralmente intemperados. As principais causas de baixo pH podem estar correlacionada a rápida e contínua decomposição de material orgânico causada pelas altas temperaturas e umidade, liberando íons H^+ do complexo de troca (MOREIRA; FAGERIA, 2009).

Devido a estas condições serem desfavoráveis para a maioria das culturas, a conversão de áreas florestais para não florestais é geralmente seguida pelas práticas de corte e queimadas podendo elevar o pH do solo e resultar no aumento a curto prazo de teores de nutrientes no solo, pela deposição de cinzas da biomassa da floresta queimada (CARVALHO et al., 2016; MOREIRA et al., 2009).

As variações nas concentrações de pH no solo de pastagem podem ter influenciado diretamente a diferença estatística da quantidade de cobre na pastagem de Rondônia. O cobre é um elemento cuja fonte no solo provem da matéria orgânica e contendo alta afinidade e adsorção com os colóides orgânicos, sendo liberado a partir da decomposição da matéria orgânica, este aumento do cobre no solo pode estar relacionado com a quantidade de matéria orgânica presente neste solo e os valores de pH, possibilitando maior decomposição nesta área e, portanto, maior liberação do cobre da matéria orgânica (BRADY; WEIL, 2013).

Tanto o cobre, quanto o magnésio têm importância na expressão gênica dos microrganismos metanotróficos (KENNEY; SADEK; ROSENZWEIG, 2016; STRONG; XIE; CLARKE, 2015). Concentrações de magnésio e cobre estão relacionados a quantidade de microrganismos metanotróficos cultivados e a estimulação da síntese do gene *pMMO* em altas condições de concentração de cobre na biomassa do solo (BUSSMANN et al., 2004; KNAPP et al., 2007). Verificando a quantificação das comunidades microbianas por PCR em tempo real, observa-se uma diferenciação das comunidades metanotróficas em solo de pastagem na área de Rondônia, o que pode estar correlacionada com as alterações de pH e cobre nos solos amostrados.

A conversão da floresta em pastagem aumenta a perda de matéria orgânica do solo, com a intensificação do clima quente e úmido, aumentando os processos de decomposição microbiana. Diante disso, a alta atividade microbiana gera diminuição da acidez do solo, visualizada nas análises químicas, aumentando o consumo de oxigênio e da concentração de dióxido de carbono na atmosfera do solo, promovendo processos anaeróbicos, tais quais como a metanogênese. Assim, o metano produzido nos micro sítios anaeróbios do solo é oxidado nos sítios de aerobiose pelas bactérias metanotróficas, possibilitando o aumento da abundância destas bactérias nos solos de pastagem (CHRISTIANSEN et al., 2017; KNIEF, 2015a; RANJAN et al., 2017).

Estudos anteriores têm mostrado o fluxo do gás metano após a conversão de floresta para pastagens, atribuindo as alterações das propriedades físico-químico do solo às influências nas mudanças na microbiota do solo (PAULA et al., 2014). Outros trabalhos têm mostrado que a oxidação de metano tem sido maior em solos florestais e abundância relativa de genes que codificam enzimas na via *pMMO* significativamente menor em solos de pastagem. Porém, o fluxo do gás metano pode estar relacionado não só a quantidade do gene associado mas ao tipo de metabolismo e a alteração da diversidade das bactérias metanotróficas encontradas (FERNANDES et al., 2002; MEYER et al., 2017).

Novos trabalhos estão sendo realizados no momento, através de medições do fluxo de metano nas áreas estudadas deste trabalho, mostrando que em alguns casos há pouca diferença entre os tipos de uso da terra em Santarém com o pouco consumo de metano atmosférico (WEBSTER et al., 2017). Entretanto os fluxos do gás metano em de pastagem na área de Rondônia foram maiores que em floresta primária e secundária, evidenciando a maior produção do metano em solos de pastagem na área de Rondônia e o maior consumo em floresta secundária (WEBSTER et al., 2017). Isto pode indicar um comportamento diferenciado deste processo frente a diversidade ambiental encontrada dentro do bioma Amazônico.

De forma a melhor entender os resultados, por meio da realização do sequenciamento da região V4-V5 do gene ribossomal 16S rRNA, pode-se verificar as alterações da diversidade das comunidades totais (bactérias e arqueias) e de bactérias metanotróficas encontradas em dois ambientes com similaridades no uso do solo na Amazônia. Os dados de riqueza e OTUs observadas não apresentaram diferenças significativas, porém CARVALHO e colaboradores (2016) associaram a intensificação do uso da terra e o aumento da diversidade bacteriana à mudanças do pH no solo, alterando a composição da comunidade bacteriana, mostrando que a diversidade bacteriana foi mais alta nos sistemas perturbados em comparação com a floresta primária não perturbada, como mostrado nos dados de diversidade filogenética encontrados.

RODRIGUES e colaboradores (2013) relataram que a riqueza e a diversidade local das bactérias do solo aumentam após a conversão, em contraste a beta diversidade, que foi significativamente menor nos solos de pastagem: As comunidades bacterianas foram significativamente mais semelhantes em composição e tiveram um *turnover* significativamente menor no espaço. Levando em consideração as áreas amostradas, os dados de Rodrigues e colaboradores (2013) foram semelhantes aos apresentados na área de Rondônia, porém pode-se perceber que os resultados encontrados para as métricas ecológicas foram diferentes na área de Santarém.

Os dados foram confirmados com a análise de coordenadas principais, onde apesar da beta diversidade mostrar que os solos das áreas amostradas possuírem estruturas distintos, ambas as áreas mostraram que as composições das comunidades totais dos solos de florestas foram significativamente diferentes dos solos de pastagens. As alterações na estrutura da comunidade total avaliada foram observadas em outros trabalhos realizados anteriormente, bem como os grupos de maiores abundâncias, como Acidobacteria, bactérias fixadoras de nitrogênio e até mesmo arqueias, encontrados diferencialmente em ambientes de florestas e de pastagens (MENDES et al., 2015; MEYER et al., 2017; MIRZA et al., 2014; NAVARRETE et al., 2015b; RODRIGUES et al., 2013).

A pastagem constitui um ambiente de alta instabilidade e baixa diversidade de fontes de carbono, quando comparada às florestas primárias e secundárias, caracterizando pressão seletiva para grupos microbianos mais aptos a competir em tais condições, como aqueles pertencentes aos filos Actinobacteria e Firmicutes. Esses filos são compostos de bactérias gram-positivas que, em decorrência de apresentarem parede celular mais complexa, composta por polissacarídeos e proteínas, tendem a apresentar maior resistência diante de efeitos estocásticos, a exemplo de prolongados períodos de estiagem (DINI-ANDREOTE et al., 2012).

O filo Actinobacteria apresenta importante papel na decomposição da matéria orgânica e formação de húmus, por isso seu aumento ocorre na pastagem, favorecido pela seleção de grupos mais aptos a metabolização da matéria orgânica em maior quantidade (CANNAVAN, 2007). O filo Firmicutes é representado majoritariamente pela classe Baccilli, que apresenta crescimento rápido em condições nutricionais ótimas e se sobressaem em condições de baixa competitividade (monoculturas) e alta instabilidade (CANNAVAN, 2007).

Resultados similares a alta abundância relativa do filo Acidobacteria nas amostras de florestas foram descritos em trabalhos anteriores avaliando comunidades bacterianas, em áreas com diferentes coberturas de solo (LAUBER et al., 2008). O filo Acidobacteria é responsivo às mudanças de pH e conteúdo de matéria orgânica no solo, onde observa-se diminuição da sua abundância com o aumento desses fatores (NAVARRETE et al., 2015b). Esse resultado é corroborado pelo menor valor de pH aferido em amostras de solos florestais, quando comparado à pastagem. Além disso, o conteúdo de matéria orgânica é mais homogêneo em pastagem em decorrência do maior volume radicular, consequente exsudação radicular das plantas cultivadas e excrementos dos animais pastoris (NAVARRETE et al., 2015a).

As alterações da estrutura da comunidade observadas também foram perceptíveis em relação as bactérias metanotróficas. MEYER e colaboradores (2017) observaram mudanças nas características da comunidade metanotrófica na área de Rondônia, sugerindo que a metanotrofia é alterada após a conversão da floresta em pastagem. Os pesquisadores notaram que apesar da comunidade metanotrófica não diferir em riqueza e alfa diversidade, eram diferentes na beta diversidade, sendo que a comunidade florestal exibiu uma dissimilaridade média significativamente maior do que a comunidade de pastagem, indicando uma maior variabilidade na participação da comunidade na floresta. Estes estudos corroboram com os dados mostrados da área de Rondônia, onde o número de OTUs observadas foi maior em solo de pastagem e não diferiu em diversidade filogenética, mas a beta diversidade mostrou-se maior em solo de floresta primária. Na área de Santarém, porém, os dados de riqueza, diversidade e beta diversidade não

diferiram, indicando que as áreas amostradas se diferem entre elas também para os microrganismos metanotróficos.

A diferenciação tanto das comunidades totais quanto metanotróficas nas áreas amostradas ficou evidente nos dados apresentados. Estudos biogeográficos de comunidades metanotróficas sugerem que as contingências históricas podem ser responsáveis pelas diferenças de campo, considerando um grande reservatório de bactérias oxidadoras de metano viáveis, mas inativas, agindo como um banco de sementes microbianas, onde as condições ambientais podem ter selecionado e ativado um subconjunto diferente de cada vez, moldando assim a comunidade (TATE, 2015).

As comunidades metanotróficas foram retratadas neste trabalho tanto com bases em grupos encontrados na literatura, como Alphaproteobacteria (grupo II), Gammaproteobacteria (grupo I) e Verrucomicrobia (grupo III) (KALYUZHNYAYA; PURI; LIDSTROM, 2015b), quanto em nível de gênero.

MEYER e colaboradores (2017) observaram que bactérias metanotróficas Alphaproteobacteria mostraram uma abundância relativa significativamente menor em pastagem. Os dados apresentados neste estudo não apresentaram diferenciação significativas entre os solos e áreas, porém contrário a Meyer e colaboradores (2007), a média da abundância relativa de Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria foram maiores em pastagens. A diferenciação dos grupos de metanotróficos encontrados pode estar correlacionados a as suas estratégias de fisiologia, afinidade de substrato e estratégias de vida (HANSON; HANSON, 1996; HO et al., 2013; KNIEF, 2015a).

A tendência ao aumento de gêneros pertencentes ao grupo I (Gammaproteobacteria) pode ter ocorrido devido a estas apresentarem um melhor desempenho sob condições de alta disponibilidade de substratos ou a locais frequentemente perturbados, além da afinidade da Gammaproteobacteria com a taxa de pH mais próxima a neutra, que é encontrada nas áreas de pastagem em comparação com as florestas (HO et al., 2013; KOLB, 2009).

Para o grupo Alphaproteobacteria, embora tenha apresentado alta representatividade em todas as áreas amostradas, também demonstrou um aumento com a mudança do uso da terra. As metanotróficas pertencentes ao filo Alphaproteobacteria são consideradas espécies tolerantes ao estresse, uma vez que eles são capazes de usar substratos versáteis e ter boas respostas a variações do gás metano ou oxigênio, o que poderia explicar sua alta quantidade representativa em todas as áreas amostradas (HO et al., 2013).

Apesar de todos os gêneros metanotróficos encontrados neste trabalho serem considerados metanotróficos obrigatórios, a alteração na quantidade e variedades de gêneros

encontrados podem estar relacionados a afinidade da enzima com as concentrações de gás metano encontrada no ambiente. Assim, algumas bactérias metanotróficas do tipo II (Alphaproteobacteria) possuem uma vantagem sob condições de falta de metano, tendo a capacidade de suportar flutuações de metano, consideradas metanotróficas de alta afinidade. Por outro lado, as metanotróficas de “baixa afinidade” são encontrados em muitos ambientes emissores de metano, são representados por tipo I (Gammaproteobacteria) (HO et al., 2013; MALYAN et al., 2016).

Além, das alterações por diferentes concentrações do gás metano, as bactérias metanotróficas são controladas por muitos fatores de interações, como o conteúdo da matéria orgânica do solo, pH, textura, potencial redox, fertilizantes e temperatura do solo (MALYAN et al., 2016). Portanto, podemos dizer que o possível e espacialmente limitado aumento de metanotróficos em áreas de pastagens pode ser devido ao aumento das concentrações de gás metano e perturbações no manejo destes solos, sendo necessário maior compreensão nas estratégias de vida destas bactérias para compreensão dos fluxos de gases encontrados na literatura.

Assim, podemos concluir que a estrutura da comunidade total e metanotrófica se altera com a mudança do uso do solo, de maneiras distintas nas áreas amostradas. Porém, em ambas as áreas, o filo Acidobacteria é característico de áreas florestais, enquanto Actinobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes são mais presentes em áreas de pastagens. A abundância relativa e riqueza de metanotróficos é mais elevada em solos de pastagens.

7.2. Enriquecimento das comunidades metanotróficas

Com a baixa porcentagem de bactérias metanotróficas encontradas nos solos amostrados, a cultura de enriquecimento é muito utilizada para melhor compreensão da dinâmica e estruturas das comunidades metanotróficas, suas predominâncias, taxas de crescimento e consórcios de cultura (GHASHGHAHI; JETTEN; LÜKE, 2017; KALYUZHNYAYA et al., 2006; KELLY; WOOD, 2010; LEE; PARK; CHO, 2013; ŠANTL-TEMKIV et al., 2013; SINISCALCHI, 2015; WHITTENBURY; PHILLIPS; WILKINSON, 1970b).

Diversos compostos multicarbonetos podem influenciar o enriquecimento de bactérias metanotróficas, como o nitrogênio, o ferro, fosfatos, cloretos, magnésio, além do pH, oligoelementos e minerais, além das concentrações dos gases atmosféricos. (VEKEMAN et al., 2016). Esses conhecimentos deram origem a meios de isolamento modificados, como NMS (*Nitrate Mineral Salt*), utilizado neste estudo.

No entanto, é evidente que os compostos utilizados para realização do meio de enriquecimento influenciam na atividade e no crescimento das bactérias oxidadoras de metano, e podem ter um efeito diferencial nas comunidades enriquecidas. Um exemplo claro está na expressão das principais enzimas para a oxidação do metano, a monooxigenase de metano solúvel e particulada (*sMMO* e *pMMO*, respectivamente), as quais são mutuamente e exclusivamente expressas na célula, dependendo da concentração de cobre em seu ambiente (SEMRAU et al., 2013).

Na escolha dos *primers* para a amplificação do gene *pmoA* utilizado neste trabalho, encontra-se presente na enzima metano monooxigenase (*pMMO*) e na maioria das metanotróficos, sendo muito utilizada para análise da comunidade metanotrófica em diversos trabalhos. Além da escolha do conjunto de *primers* utilizados para a avaliação inicial do experimento, a porcentagem de metano adicionada ao enriquecimento está de acordo com o praticado em outros trabalhos (DIANOU; ADACHI, 1999; IGUCHI; YURIMOTO; SAKAI, 2011; PANDIT et al., 2015).

Neste trabalho, pode-se perceber que a resposta ao processo do enriquecimento das bactérias metanotróficas foram distintas em relação as áreas coletadas, confirmando as evidências iniciais de que a diferenciação dos solos se mantiveram ao longo do enriquecimento e as condições impostas pelo enriquecimento podem ter selecionado e ativado grupos distintos de metanotróficos.

Utilizando as mesmas condições de enriquecimento e *primers* para quantificação, PANDIT e colaboradores (2015) no trabalho com metanotróficos em rizosfera de arroz, encontraram inicialmente $2,5 \times 10^6$ cópias do gene *pmoA* por grama de solo fresco e após 10 dias de enriquecimento foi confirmado o enriquecimento, isolamento e caracterização das bactérias atuantes nos ambientes alvos do estudo. Porém, poucos trabalhos têm relatado o enriquecimento e isolamento de metanotróficos em solos tropicais, bem como as alterações desta comunidade ao processo de pressão seletiva por cultura de enriquecimento. Os resultados obtidos neste estudo mostram que é possível o enriquecimento destes grupos em solos aerados e que a quantificação da comunidade metanotrófica pode variar em dias e tipos de uso do solo.

Estas modificações nas comunidades ao longo do tempo de enriquecimento, apresentadas neste trabalho, foram confirmadas com o sequenciamento, tanto das comunidades metanotróficas quanto de bactérias e arqueias envolvidas no processo de enriquecimento. As alterações de riqueza e diversidade confirmaram que houve a seleção de microrganismos impostos pelo enriquecimento, diminuindo o número de espécies encontradas e aumentando a frequência dos grupos presentes.

Esta diferenciação das comunidades bacterianas em resposta a concentração do gás metano inserido no meio de enriquecimento nos mostra que houve alteração da dinâmica desta comunidade, corroborando que a diversidade bacteriana não é estática e que respondem a mudanças ambientais. KATAYAMA e colaboradores (2016), em seu trabalho com enriquecimento sobre as mudanças nas comunidades microbianas associadas a hidratos de gás em sedimentos de subsolo, mostraram que os padrões de distribuição de microrganismos envolvidos na ciclagem de carbono mudaram com a ocorrência de hidratos gasosos.

Apesar da diferenciação da comunidade ao longo de um enriquecimento ser esperada devido a seleção de microrganismos, os resultados deste trabalho mostraram evidência de diferenciação entre os usos do solo. Esta separação pode ser devido aos efeitos persistentes de eventos históricos influenciando a diferenciação da comunidade bacteriana presente (MARTINY et al., 2006; TATE, 2015).

Esta diferenciação da comunidade foi confirmada verificando os filos que enriqueceram e tiveram a abundância relativa diminuída, como mostrado, nos filos Acidobacteria e Actinobacteria, com uma diminuição ao longo do enriquecimento. Estes são responsivos às mudanças de pH e conteúdo de matéria orgânica no solo (NAVARRETE et al., 2013). A diminuição da abundância relativa é justificada pelas alterações ocorridas pelo meio de enriquecimento, elevando o valor de pH e diminuindo a matéria orgânica presente.

O filo Bacteroidetes, que apresentou aumento na abundância ao longo do enriquecimento, principalmente em áreas de pastagens, é especialista na degradação de polissacarídeos, possui genoma altamente plástico e frequentemente reorganizado por meio de rearranjos genéticos, duplicações gênicas e transferências laterais de genes, uma característica que pode ter impulsionado sua adaptação a nichos ecológicos distintos e neste caso nos enriquecimentos (THOMAS et al., 2011).

Além disso, STRONG; XIE; CLARKE (2015) mencionam em seu trabalho que restrições energéticas impostas pelas várias vias de assimilação de carbono sob baixas concentrações de oxigênio e metano mostraram desencadear uma produção substancial de exopolissacarídeos em bactérias metanotróficas, podendo estarem correlacionado com o aumento de Bacteroidetes. Além dos polissacarídeos provenientes das paredes bacterianas de grupo que tiveram a abundância reduzida ao longo do enriquecimento.

O aumento do filo Proteobacteria era esperado, pois os dois maiores grupos de metanotróficos (Tipo I e II) pertencem a este filo. Além disso, comunidades que possuem influências do metano podem compreender a multiplicidade de interações entre metanotróficos,

metilotróficos e heterotróficos, onde a maior parte destes também são Proteobacteria (KNIEF, 2015b; VOOSSEN, 2017).

Ao analisarmos a riqueza e diversidade das bactérias metanotróficas, percebe-se que as composições destas comunidades se diferenciam ao longo do enriquecimento, intensificando as alterações oriundas dos diferentes usos do solo. Nos solos de floresta primária e secundária da área de Santarém, estas apresentam uma comunidade metanotrófica mais conservada em comparação aos demais solos.

Em muitos ecossistemas, a diversidade de bactérias metanotróficas é relativamente baixa, e juntamente com a alta especialização funcional dos metanotróficos, levanta a possibilidade de uma baixa redundância funcional, e portanto, pode ser mais vulnerável à perda de diversidade do que é tipicamente encontrada para funções dirigidas por grupos mais diversos de microrganismos com metabolismo mais versátil (SCHNYDER et al., 2018). As alterações destas comunidades foram verificadas através da abundância relativa das bactérias metanotróficas e estão em conformidade com quantificações do número de cópia realizadas pela técnica de qPCR descrita anteriormente.

MEYER e colaboradores (2017), em seu trabalho com alteração do uso do solo na conversão floresta para pastagem, mencionaram que dos três principais tipos de metanotróficos encontrados nas áreas de estudo (Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Verrucomicrobia), as Alphaproteobacteria metanotróficas variaram mais entre os tipos de solo, mas as comunidades de metanotróficos pertencentes a Verrucomicrobia e Gammaproteobacteria não diferiram em composição, diversidade, abundância ou uniformidade entre os tipos de uso das terras.

Neste trabalho, percebemos que a Verrucomicrobia não deferiu em abundância, mesmo no processo de enriquecimento, enquanto que para Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria não foram realizadas análises separadas de riqueza e diversidade, porém foram encontrados somente um gênero de Alphaproteobacteria e a variedade de gêneros foi maior em Gammaproteobacteria. Pode-se perceber que os processos de enriquecimento foram diferentes entre os grupos de metanotróficos, o que pode estar relacionado com as diferenças na fisiologia, afinidade de substrato e estratégias de vida (HANSON; HANSON, 1996; HO et al., 2013; KNIEF, 2015b).

As metanotróficas Verrucomicrobia são acidófilas e podem ser prevalentes em ambientes menos hostis, parecendo estar restrita aos ambientes de onde eles foram isolados (OP DEN CAMP et al., 2009).

HO e colaboradores (2013), consideraram diversas observações ecológicas, e classificaram as metanotróficas do tipo II (Alphaproteobacteria) como tolerantes ao estresse (S) e

tolerantes ao estresse-ruderal (S-R), porém metanotróficas do tipo I (Gammaproteobacteria) respondem rapidamente à disponibilidade do substrato e uma comunidade predominantemente ativa em muitos ambientes, portanto pode ser classificado como competidores (C) e concorrentes-ruderais (C-R).

Estas estratégias de vida das bactérias metanotróficas podem ser facilmente observadas neste trabalho, com o aumento gradual de Alphaproteobacteria e a rápida resposta de Gammaproteobacteria em solos de florestas primária da área de Rondônia, corroborando com as sugestões de outras pesquisas que apontam que solos de floresta tropical abrigam comunidades microbianas que são mais tolerantes ao estresse (MEYER et al., 2017; NAVARRETE et al., 2015b; RODRIGUES et al., 2013).

Neste trabalho, foi encontrado somente o gênero *Methylosinus* como representante de Alphaproteobacteria metanotróficas, o qual se difere por conter membranas intracitoplasmáticas, apresentar obrigatoriedade a metanotrofia e também realizar a fixação do nitrogênio por meio da nitrogenase (DEDYSH; KNIEF, 2018).

Os gêneros enriquecidos de metanotróficas pertencentes a Gammaproteobacteria são muito diversos, assimilam formaldeído via RuMP e possuem membranas intracitoplasmáticas (ICM) organizadas em pilhas de vesículas planas orientadas perpendicularmente à membrana celular e preenchendo a maior parte do volume celular (KALLISTOVA et al., 2017).

Atualmente, alguns pesquisadores têm separado as Gammaproteobacteria em metanotróficos tipo Ia e Ib, onde representantes da família Methylococcaceae são definidos como metanotróficos tipo Ia, enquanto *Methylococcus* e *Methylocaldum* ao Ib. No entanto, um estudo de uma grande amostra das sequências de *pmoA* das metanotróficas do tipo Ib mostrou que a maioria dessas sequências foi obtida a partir de habitats saturados com água e potencialmente hipóxicos, sendo o meio de enriquecimento neste estudo viável a estas bactérias (DANILOVA et al., 2016; KALLISTOVA et al., 2017).

Os membros do gênero *Crenothrix*, enriquecidos neste experimento, são bactérias filamentosas pertencentes a Gammaproteobacteria, ótimas oxidantes de metano bem como para atuantes na redução de nitrato para N₂, porém não estão disponíveis em culturas puras ou de enriquecimento e não são facilmente coletados em amostras ambientais (OSWALD et al., 2017; STOECKER et al., 2006).

Assim, podemos concluir que a técnica de enriquecimento foi eficiente para o estudo de bactérias metanotróficas, mostrando que o processo de enriquecimento gera comunidades totais e metanotróficas diferenciadas a partir de amostras de diferentes usos do solo da Amazônia.

7.3. Interações microbianas

Um importante benefício das interações para o estudo da ecologia microbiana é a capacidade de entender quais organismos são mais importantes na manutenção da estrutura e das interações das comunidades microbianas nos solos (LUPATINI et al., 2014). Segundo FAUST e RAES (2012), após a obtenção de dados de abundância, é possível prever relações microbianas sob a premissa de que padrões de distribuição fortemente não aleatórios são principalmente devidos a razões ecológicas.

A análise de *network* para estudos de co-ocorrência apresenta-se uma forma eficaz para detectar associações positivas e negativas entre os microrganismos e percepção das interações ecológicas (BARBERÁN et al., 2012). Estes modelos são capazes de prever o resultado de alterações na comunidade e os efeitos de perturbações, ajudando no conhecimento de comunidades microbianas complexas (FAUST; RAES, 2012).

Neste trabalho, foi demonstrado que o número de interações da comunidade mudou com a conversão do solo da floresta em pastagem. As comunidades de florestas apresentaram maior número de conexões, os grupos de interações estão mais relacionados (menor modularidade), mais ligações positivas e menos negativas quando comparadas com o enriquecimento de pastagens da mesma área. Então, a alta proporção de correlações positivas entre as espécies, mostrada como co-ocorrência ou abundância similar entre as diferentes amostras, propõe as respostas de um ambiente de menor perturbação, como as florestas (FAUST; RAES, 2012; ZHOU et al., 2011).

As diferenças de modularidade entre solos de floresta e pastagens foi evidenciada por NAVARRETE e colaboradores (2015a), mostrando que em solos florestais a modularidade, o número de *links* e nódulos foram menores em comparação a áreas desmatadas. Através destas afirmações, podemos perceber que as perturbações em florestas da área de Rondônia são maiores do que as observadas em Santarém, mas menor que na pastagem da mesma área.

Por meio do estudo da modularidade e número de correlações, podemos perceber que a comunidade microbiana em enriquecimento de pastagem apresentou mais correlações negativas entre as espécies, evidenciando uma relação mais competitiva entre estas, em que as perturbações afetam rapidamente a comunidade microbiana relacionada. O módulo é definido como um grupo de nós que interagem fortemente e tem baixa interação com outros módulos, juntamente com a modularidade que indica a medida do grau de delimitação organizado da rede de módulo (FAUST; RAES, 2012; ZHOU et al., 2011).

Apesar da abundância de gêneros parecer ser um parâmetro importante que define as interações entre membros taxonômicos da comunidade bacteriana do solo, LUPATINI e

colaboradores (2014) indicam que não há relação de força entre medidas de centralidade e abundância de táxons, mas que é possível notar que a baixa abundância apresenta uma leve tendência a ter altos valores de proximidade.

Apesar do meio de enriquecimento selecionar grupos bacterianos de interesse no experimento, o número de correlações positivas encontradas no filo Acidobacteria na área de Santarém surpreendeu. Isto nos permite sugerir que a diminuição da abundância relativa mencionada anteriormente está correlacionada a seleção do ambiente imposto, e não por interações de competições, mostrando que as amostras enriquecidas se mantiveram as características iniciais presentes.

A co-ocorrência de Proteobacteria e Acidobacteria foi encontrada em trabalhos anteriores (DURRER et al., 2017; TAKETANI et al., 2018), porém os Firmicutes compõem um extenso grupo de bactérias com alta diversidade fenotípica e metabólica, já descritos como afetados na conversão em solo floresta-pastagem (MENDES et al., 2015; NAVARRETE et al., 2015a; RODRIGUES et al., 2013).

A relação de co-ocorrência e co-exclusões não tiveram um padrão entre as áreas, alguns filos como Proteobacteria e Actinobacteria se mostraram opostos nas áreas amostradas. LUPATINI e colaboradores (2014) investigaram as interações da comunidade bacteriana do solo em vários usos do solo e perceberam que as redes de interações pertenciam principalmente a diferentes gêneros do filo Proteobacteria e Actinobacteria, unidades taxonômicas pertencentes a Chloroflexi, Bacteroidetes e Firmicutes também foram caracterizados como fundamentais grupos.

Comunidades conduzidas pelo metano podem compreender uma multiplicidade de interações entre metanotróficos, metilotróficos e heterotróficos. Um estudo com biofilmes microbianos impulsionados pela oxidação de metano em caverna de fonte mineral, sugere a co-ocorrência metanotróficos e metilotróficos, e uma cooperação com os resultantes metanólicos (KARWAUTZ et al., 2017; VOOSSEN, 2017).

A fim de verificar estas interações, foram selecionados os nódulos correspondentes a OTUs de metanotróficos e as co-ocorrência e co-exclusões destes com as demais OTUs. Pode-se perceber que a rede de interações foi maior em enriquecimentos de pastagens em comparação as florestas. Efeitos da biodiversidade no funcionamento dos metanotróficos, utilizando cepas puras de bactérias metanotróficas em enriquecimentos com comunidades artificiais de diferentes níveis de diversidade, mostraram que a diversidade microbiana teve um efeito positivo sobre a oxidação do metano, sugerindo que a biodiversidade é também importante em comunidades metanotróficas naturais para a função do ecossistema de oxidação de metano (SCHNYDER et al.

2018). Portanto, a manutenção das condições do solo que suportam uma alta diversidade de metanotróficos pode ajudar a reduzir a emissão do gás metano no efeito estufa.

Os metanotróficos também são bem conhecidos como produtores abundantes de polissacarídeos extracelulares. Esta produção de exopolissacarídeos é realizada como uma reação de extrapolação de energia, impedindo que o acúmulo de metano reduza o carbono para outros membros heterotróficos em uma comunidade de biofilme. (KARWAUTZ et al., 2017; STRONG et al., 2016). A produção de exopolissacarídeos em bactérias metanotróficas pode ter favorecido as correções positivas entre as metanotróficas *Methylosinus* e o Bacteroidete *Flavisolibacter* em solo de pastagem na área de Santarém.

Os metanotróficos formam a base de uma rede alimentar movida a metano, fornecendo compostos de carbono derivados do metano para outros organismos (STOCK et al., 2013). As interações podem ser mutuamente benéficas, proporcionando um ambiente estável ou pela remoção de produtos residuais tóxicos de oxidação de metano, como o metanol e formaldeído (HANSON; HANSON, 1996; STOCK et al., 2013).

Trabalhos anteriores analisaram a similaridade de sequências do gene *mxhF* (Methanol dehydrogenase) em Methylobacteriaceae e revelaram maiores similaridades com táxons como *Mucilaginibacter* e *Flavisolibacter* (ambos Bacteroidetes), *Pseudomonas* (Gammaproteobacteria) ou *Methylophilus* (Betaproteobacteria) do que com outras espécies de Methylobacteriaceae, evidenciando que a bactéria *Flavisolibacter* também pode estar realizando a metilotrofia nesta comunidade (LAU et al., 2013; MORAWE, 2017).

A maioria das bactérias metanotróficas podem utilizar metil formato, dimetil carbonato e metanol como única fonte de carbono e energia, mas há indicações de que o metanol é um substrato tóxico se fornecido em altas concentrações (HANSON; HANSON, 1996). Estes produtos residuais da oxidação do metano podem muitas vezes provocar a co-exclusões de diversos microrganismos na comunidade microbiana.

Apesar do enriquecimento das comunidades metanotróficas, a dificuldade de cultivo e o isolamento de metanotróficos pode ser devido a uma variedade de razões, tais como a resistência ao crescimento em meio sólido ou líquido e a exigência de crescimento em ambientes especiais (PANDIT et al., 2015). No entanto foi realizado o enriquecimento e isolamento de alguns gêneros, evidenciando que estes foram beneficiados com a cultura de enriquecimento e podem possuir uma correlação neutra com as bactérias metanotróficas, já que não são significantes na correlação de Pearson pela análise de *network*.

As bactérias isoladas através do meio de enriquecimento podem possuir papéis importantes na comunidade bacteriana pela alta diversidade metabólica destes grupos, além de

algumas espécies de *Pseudomonas* e *Burkholderia* serem consideradas metilotróficas e comumente encontradas em culturas com bactérias metanotróficas por realizarem a oxidação do metanol (CHISTOSERDOVA; KALYUZHNYAYA, 2018; EYICE; SCHÄFER, 2015; HAUPT, 2016; KALYUZHNYAYA; PURI; LIDSTROM, 2015; LAU et al., 2013).

Em culturas de enriquecimento de metanotróficos, *Methylocystis* com hidrocarbonetos, os gêneros *Hydrothalea*, *Hyphomicrobium*, *Burkholderia*, *Rhodospseudomonas* e *Castellaniella*, foram responsáveis pelas bactérias remanescentes que sobrevivem de subprodutos metanotróficos, como o metanol, confirmando que culturas metanotróficas frequentemente coexistem com metilotróficas ou heterotróficas, sobrevivendo em subprodutos metanotróficos (MYUNG et al., 2015).

Muitos microrganismos podem se beneficiar por este tipo de interação, como nos consórcios de degradação de metano, no qual *Cupriavidus* spp. foram dominantes e em culturas contendo *Cupriavidus taiwanensis*, onde a bactéria metanotrófica *Methylobacter* obteve um aumento de quatro vezes de sua densidade inicial (LEE; PARK; CHO, 2013; STOCK et al., 2013).

Assim podemos concluir que os enriquecimentos possuem interações microbianas diferenciadas devido a alteração do uso do solo e áreas coletadas, mostrando que florestas possuem correlações mais estáveis que solos de pastagem, porém diferentes entre as áreas. Estas correlações também são perceptíveis entre a associação de bactérias metanotróficas com outros grupos, e gêneros como *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Flavisobacter* e *Cupriavidus* podem estar exercendo papéis importantes para a manutenção do meio comum.

7.4. Metagenoma dos cultivos enriquecidos

Os dados de metagenomas anotados no MG-RAST mostraram-se compatíveis com os dados mostrados inicialmente, tanto das amostras originais como as oriundas de enriquecimento. Foi confirmado que as médias de riqueza apresentaram valor mais elevado em solos de pastagem em comparação a floresta primária da mesma área. Alguns estudos anteriores já haviam descritos o aumento da riqueza e diversidade após a conversão da floresta em pastagem (PAULA et al., 2014; RODRIGUES et al., 2013).

Os grupos taxonômicos encontrados também foram compatíveis com os dados avaliados anteriormente, e como esperado o filo Bacteroidetes teve uma diferença na abundância relativa em solos de pastagens. Este filo é composto de bactérias especialistas na degradação de polissacarídeos, que pode ter alterado em solos de pastagens pela quantidade de nutrientes ou o

aumento de polissacarídeos liberados por bactérias metanotróficas, como discutido anteriormente.

Como descrito e discutido anteriormente, houve o enriquecimento de grupos de metanotróficos, e podemos perceber que os tipos de metanotróficas foram enriquecidas de forma diferentes nos diferentes tipos de solo. A forma diferenciada de enriquecimento dos tipos de metanotróficos pode estar correlacionada ao metabolismo diferenciado dos grupos metanotróficos (DEDYSH; KNIEF, 2018; KALYUZHNAIA; PURI; LIDSTROM, 2015b).

A fim de melhor compreender os metanotróficos encontrados, a montagem e recuperação de genomas por metagenomas realizada neste trabalho é um método atualmente utilizado para entender os diversos papéis dos microrganismos na ecologia, evolução, saúde humana e animal, de microrganismos de difícil cultivo ou incultiváveis (ALBERTSEN et al., 2013). NGUYEN e colaboradores (2018) utilizou esta técnica para obter sequências do genoma de bactérias raras e não cultivadas obtidas sobre a adaptação ácida de novos metanotróficos enriquecidos a partir de solos florestais ácidos. Em seu trabalho, o tamanho dos cinco genomas montados (MAGs) foram de 2,8 a 4,7Mb, o número de *contigs* e a porcentagem de formação do genoma também variou, o que coloca este trabalho de acordo com o encontrado na literatura.

Em comparação com o banco de dados KEGG, pudemos confirmar a diferenciação das bactérias metanotróficas e a variação do número de cópias do gene *pMMO* e do operon *pmoCAB*. De acordo com a literatura, existem duas formas diferentes de MMO (*Methane Monooxygenase*): 1. MMO solúvel (*sMMO*), onde a expressão é inibida por altas concentrações de Cobre, codificado por *mmoX*, *mmoY* e *mmoZ*; 2. MMO de partículas codificado por *pmoCAB* (HASHGHAVI; JETTEN; LÜKE, 2017). A metano monooxygenase específico da membrana (*pMMO*) catalisa a hidroxilação do metano e está presente em praticamente todos os metanotróficos, enquanto o *sMMO* só foi demonstrado em certos gêneros, como *Methylococcus*, *Methylosinus*, *Methylosystis*, *Methylomonas* e *Methylocella* (HOLMES et al., 1995; MURRELL; DALTON, 1992; SEMRAU et al., 1995). Algumas espécies de *Methylocella* e *Methyloferula*, possuem apenas *sMMO* e não seriam direcionadas em estudos moleculares com *pMMO*. Neste trabalho, não encontramos nenhuma evidência destes gêneros e MAGs anotados que possuíssem apenas *sMMO*, portanto o estudo somente com que foram encontrados a *pMMO* (DEDYSH; KNIEF, 2018).

O *pMMO* pertence à superfamília da amônia monooxygenase e tem mostrado ser de alta relevância biogeoquímica e química, devido à estreita correlação entre a família e os fluxos globalmente importantes de metano e óxido nitroso. Isto faz com que os genes *pMMO* sejam marcadores extremamente úteis em estudos de feedback biológico que analisam as mudanças climáticas globais (CONRAD, 2009).

A estrutura da enzima pMMO é composta por até três cópias de cada uma de suas três subunidades: α (*pmoB*), β (*pmoA*) e γ (*pmoC*), arrançadas na forma $\alpha_3\beta_3\gamma_3$. Os genes que codificam para essa enzima encontram-se agrupados no operon *pmoCAB* (CULPEPPER; ROSENZWEIG, 2012; GHASHGHAHI; JETTEN; LÜKE, 2017; SEMRAU et al., 1995). Apesar de não ter encontrado em todos os genomas recuperados os genes *pmoA* e *pmoB*, estes têm sua elevada importância na oxidação do metano. Dados bioquímicos indicam que a atividade de pMMO é dependente de cobre, e o sítio ativo está localizado na região N-terminal do domínio solúvel do peptídeo *pmoB*, onde se encontra o centro dinuclear de ligação de cobre (Cu) (CULPEPPER; ROSENZWEIG, 2012; KHADKA et al., 2018; SIRAJUDDIN et al., 2014).

GHASHGHAHI; JETTEN; LÜKE (2017) em estudo sobre a diversidade de metanotróficos por primers degenerados mostrou que o gene *pmoB* não contém nenhum alongamento de sequência conservada, e as únicas regiões conservadas residiam em *pmoC* e *pmoA*. O *pmoA*, que codifica a subunidade beta do pMMO, tem sido usado como um marcador genético funcional e de diversidade metanotrófica em muitos estudos, inclusive neste, por mostrar-se altamente conservado (BOURNE; MCDONALD; MURRELL, 2001; COSTELLO; LIDSTROM, 1999; GHASHGHAHI; JETTEN; LÜKE, 2017; HOLMES et al., 1995; KOLB et al., 2003; WANG et al., 2014).

O gene *pmoC*, encontrado em todos os genomas recuperados, pode ser a chave para a inibição da enzima. A forma de ativação e inibição da enzima ainda é muito controversa, onde estudos com *Methylococcus capsulatus* sugerem que através da ocupação de zinco no sítio de ligação de metal intramembranar *pmoC*, inibe a enzima, que também pode estar correlacionada com conversão do acetileno (CULPEPPER; ROSENZWEIG, 2012; KHADKA et al., 2018; PHAM et al., 2015). Porém, em estudos com diversas concentrações de zinco, a melhor atividade enzimática é obtida a partir de pMMO intacto, contendo todas as três subunidades (*pmoCAB*), sugerindo que as regiões transmembrana têm uma função importante (SIRAJUDDIN et al., 2014).

A variação da quantidade de cópias do operon *pmoCAB* e dos genes compostos é comum entre as metanotróficas. Estudos mostram que cópias do *pmoCAB* possuem afinidades diferentes de metano e padrões de expressão (DUNFIELD; KNIEF; LIPSKI, 2003; KHADKA et al., 2018; OP DEN CAMP et al., 2009).

Fragmentos do gene *pmoC* encontrados em todos os genomas montados e comparados ao banco de dados GenBank, confirmaram os marcadores de linhagens e que estes possuem maior similaridade ao grupo I (Gammaproteobacteria) e II (Alphaproteobacteria).

A tendência de possuir mais genes cuja posição relativa é conservada encontrada ao metabolismo tipo II, pode estar correlacionada a estratégia de vida descrita na literatura, possuindo mais tolerância ao stress. (HO et al., 2013; MEYER et al., 2017). Porém, o genoma recuperado da pastagem foi o único com o operon *pmoCAB*, sugerindo que este pode estar realizando uma melhor atividade enzimática. A família do regulador transcricional *LysR* foi também encontrada somente neste genoma de pastagem, e pode estar correlacionada a regulação de um conjunto diversificado de genes, incluindo aqueles envolvidos em virulência, metabolismo, *quorum sensing* e mobilidade (MADDOCKS; OYSTON, 2008; NICHOLS et al., 2012).

Pode-se perceber que os genomas montados do tipo I, além de possuírem muitas regiões distintas, foi encontrado maior número de *pmoCAB* completos, sendo alguns com mais de uma cópia, sugerindo uma melhor eficiência na oxidação do metano, porém mais sensíveis a alterações do ambiente.

O subsistema amonificação de nitrato e nitrito, cuja posição relativa é conservada, em pelo menos quatro outros genomas recuperados é comum entre os metanotróficos, a nitrogenase ocorre em uma ampla gama de metanotróficos (α e γ Proteobacteria), permitindo o uso de N_2 como fonte de nitrogênio (KOLB et al., 2003).

A liberação de polissacarídeos, realizada por muitas metanotróficas, também foi confirmada em diversos genomas recuperados de metanotróficas tipo I. O *Lipopolissacarídeo ABC transportador LptB* é comumente encontrado em bactérias gram-negativas, desempenhando papéis essenciais na proteção de bactérias de ambientes agressivos, na resistência a drogas e na patogênese (DONG et al., 2017).

A assimilação do formaldeído encontrado em dois genomas montados pertencentes ao tipo II é comum, os metanotróficos da família Methylocystaceae (pertencentes ao tipo II) assimilam formaldeído através da via serina (KALLISTOVA et al., 2017). Metanotróficas e metilotróficas são aparentemente ambíguas, porém algumas metanotróficas não são metilo, elas liberam o metanol ou formaldeído para o meio modificando as condições do ambiente, o que pode estar ocorrendo com estes genomas montados (KELLY; WOOD, 2010; KOLB et al., 2003).

Ademais, após a conversão do metano em metanol, este dá origem ao formaldeído e segue para os diferentes processos de biossíntese celular. Desta forma, pode ser sugerido que muitos metanotróficos além de possuírem diferentes afinidades na oxidação do metano também podem estar liberando resultantes da oxidação no meio presente, sendo necessário estudo mais profundos destes genomas para entendermos o completo papel no meio ambiente.

Podemos concluir com estas análises de metagenomas e montagem dos genomas por metagenomas que há diferenciação na composição microbiana nos diferentes solos e áreas amostradas mesmo com as amostras enriquecidas. Houve diferenciação no enriquecimento de metanotróficas nos diferentes solos e áreas e que os genomas montados possuem metabolismos distintos. Por fim, diferenças estruturais nos genomas de bactérias envolvidas na metanotrofia podem ser sugeridas dentre as diferentes áreas amostradas.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho veio a contribuir para um melhor entendimento sobre as mudanças do uso do solo nas áreas de floresta amazônica. A interação entre as metodologias utilizadas permitiu bases mais sólidas para inferências sobre a alteração microbiana mediante modificações do ambiente, metabolismo microbiano e suas interações. Assim, os resultados obtidos validaram as hipóteses iniciais e atingiram os objetivos propostos, dando base a conclusões.

Os dados de caracterização das áreas indicam a variabilidade na estrutura da comunidade com a alteração do uso do solo e entre as áreas amostradas. A estrutura da comunidade total (bactérias e arqueias) e metanotróficas se altera com a mudança do uso do solo, de maneiras distintas nas áreas amostradas. Porém, em ambas as áreas, o filo Acidobacteria mostrou-se característico de áreas florestais, enquanto Actinobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes são mais encontrados em áreas de pastagens. A abundância relativa e riqueza de metanotróficos é mais elevada em solos de pastagens.

Com o processo de enriquecimento, houve diferenças entre os grupos metanotróficos enriquecidos correlacionadas as estratégias fisiológicas, concluindo que a técnica de enriquecimento é eficiente para o estudo de bactérias metanotróficas, mostrando que o processo de enriquecimento gera comunidades totais e metanotróficas diferenciais sob os usos do solo e áreas coletadas.

As diferenças comportamentais também se aplicam na análise de correlações com a comunidade presente. As interações microbianas são diferenciadas na alteração do uso do solo e áreas coletadas, mostrando que florestas possuem correlações mais estáveis que solos de pastagem, porém diferentes entre as áreas. Estas correlações também são perceptíveis entre a associação de bactérias metanotróficas com outros grupos, e gêneros como *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Flavisobacter* e *Cupriavidus* podem estar exercendo papéis importantes para a manutenção do meio comum.

As análises de metagenomas e montagem dos genomas por metagenomas confirmaram que há diferenciação na composição microbiana nos diferentes solos e áreas amostradas mesmo com as amostras enriquecidas. Houve diferenciação no enriquecimento de metanotróficas nos diferentes solos e áreas, e os genomas montados possuem metabolismos distintos.

As diferenças dos estilos de vida das bactérias metanotróficas estão associadas as diferenças encontradas no fragmento do genoma montado. Contudo, são necessários estudos mais aprofundados, com mais áreas amostradas para melhor compreender as alterações na diversidade total e de bactérias metanotróficas frente as mudanças do uso do solo, além de

estudos genômicos das bactérias para compreender a expressão dos genes e a inferência de consumo do gás pelos diferentes grupos metanotróficos.

REFERÊNCIAS

- ALBERTSEN, M. et al. Genome sequences of rare , uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 6, 2013.
- ALEJANDRO, D. **Improving estimates of CO₂ emissions under REDD + in the Colombian Amazon: Better understanding for climate change mitigation**. 2016. 199p. These (Philosophy in Geography). University of Exeter, Exeter, UK, 2016.
- ALNEBERG, J. et al. Genomes from uncultivated prokaryotes: a comparison of metagenome-assembled and single-amplified genomes. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 173, 2018.
- ARONSON, E.; ALLISON, S.; HELLIKER, B. Environmental impacts on the diversity of methane-cycling microbes and their resultant function. **Frontiers in microbiology**, v. 4, n. August, p. 1–15, 2013.
- AYDIN, M. et al. Recent decreases in fossil-fuel emissions of ethane and methane derived from firm air. **Nature**, v. 476, n. 7359, p. 198-201, 2011.
- BARBERÁN, A. et al. Using *network* analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. **ISME Journal**, v. 6, n. 2, p. 343–351, 2012.
- BOURNE, D. G.; MCDONALD, I. R.; MURRELL, J. C. Comparison of *pmoA* PCR Primer Sets as Tools for Investigating Methanotroph Diversity in Three Danish Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 3802–3809, 2001.
- BOWMAN, J. P. et al. Revised Taxonomy of the Methanotrophs: Description of *Methylobacter* gen. nov., Emendation of *Methylococcus*, Validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* Species, and a Proposal that the Family Methylococcaceae Includes Only the Group I Methanotrophs. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, n. 4, p. 735–753, 1993.
- BRADY, N. C.; WEIL, R. R. **Elementos da natureza e propriedades dos solos**. Bookman Editora Ltda. (3. ed.) 2013.
- BRETTIN, T. et al. RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.
- BUSSMANN, I. et al. Preferential cultivation of type II methanotrophic bacteria from littoral sediments (Lake Constance). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 47, n. 2, p. 179–189, 2004.
- CANNAVAN, Fabiana de Souza. **Diversidade das comunidades bacterianas em solos de Terra Preta Antropogênica da Amazônia Central e Oriental**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) - Ecologia de Agroecossistemas, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007. doi:10.11606/D.91.2007.tde-01022008-085546

- CAPORASO, J.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, p. 335–336, 2010.
- CARVALHO, T. S. et al. Land use intensification in the humid tropics increased both alpha and beta diversity of soil bacteria. **Ecology**, v. 97, n. 10, p. 2760–2771, 2016.
- CHISTOSERDOVA, L.; KALYUZHNYAYA, M. G. Current Trends in Methylophony. **Trends in Microbiology**, v. xx, p. 1–12, 2018.
- CHOWDHURY, T.; DICK, R. Ecology of aerobic methanotrophs in controlling methane fluxes from wetlands. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 5, n. 65, p. 8–22, 2013.
- CHRISTIANSEN, J. R. et al. Different soil moisture control of net methane oxidation and production in organic upland and wet forest soils of the Pacific coastal rainforest in Canada. **Can. J. For. Res.**, p. 1–29, 2017.
- CIAIS, P. et al. Carbon and other biogeochemical cycles, 2013. In: **Climate Change 2013: The Physical Science Basis**. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Stocker, T. F. et al (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- CONRAD, R. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. **Environmental microbiology reports**, v. 1, n. 5, p. 285–92, out. 2009.
- COSTELLO, A.; LIDSTROM, M. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 11, p. 5066–5074, 1999.
- CULPEPPER, M. A.; ROSENZWEIG, A. C. Architecture and active site of particulate methane monooxygenase. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 47, n. 6, p. 483–492, 2012.
- DANILOVA, O. V. et al. A new cell morphotype among methane oxidizers: A spiral-shaped obligately microaerophilic methanotroph from northern low-oxygen environments. **ISME Journal**, v. 10, n. 11, p. 2734–2743, 2016.
- DAVIDSON, E. A et al. The Amazon basin in transition. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 321–8, 2012.
- DEDYSH, S. N.; KNIEF, C. Diversity and phylogeny of described aerobic methanotrophs. **Methane Biocatalysis: Paving the Way to Sustainability**, p. 17–42, 2018.
- DENG, Y. et al. Molecular ecological *network* analyses. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 1, 2012.
- DHARIWAL, A. et al. MicrobiomeAnalyst: A web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W180–W188, 2017.

- DINI-ANDREOTE, F. et al. Bacterial genomes: habitat specificity and uncharted organisms. **Microbial ecology**, v. 64, n. 1, p. 1–7, 2012.
- DIANOU, D.; ADACHI, K. Characterization of methanotrophic bacteria isolated from a subtropical paddy field. **FEMS Microbiology Letters**, v. 173, n. 1, p. 163–173, Apr. 1999.
- DIAS-FILHO, M.; DAVIDSON, E.; CARVALHO, C. Linking biogeochemical cycles to cattle pasture management and sustainability in the Amazon Basin. In: MCCLAIN, M.; VICTORIA, R.; RICHEY, J. (Eds.). **The Biogeochemistry of the Amazon Basin**. New York: Oxford University Press, 2001. p. 86–101.
- DIRZO, R.; RAVEN, P. Global state of biodiversity and loss. **Annual Review of Environment Resources**, v. 28, p. 137–167, 2003.
- DONG, H. et al. Structural insight into lipopolysaccharide transport from the Gram-negative bacterial inner membrane to the outer membrane. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1862, n. 11, p. 1461–1467, 2017.
- 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. 1307–10, 2010.
- DUNFIELD, P. F.; KNIEF, C.; LIPSKI, A. Diversity and Activity of Methanotrophic Bacteria. **American Society for Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6703–6714, 2003.
- DURRER, A. et al. The drivers underlying biogeographical patterns of bacterial communities in soils under sugarcane cultivation. **Applied Soil Ecology**, v. 110, p. 12–20, 2017.
- ELSAS, J. VAN; JANSSON, J.; TREVORS, J. (2006) **Modern soil microbiology**. (2nd ed., Books in soils, plants, and the environment). Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis.
- ETTWIG, K. F. et al. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 543–548, 2010.
- EYICE, Ö.; SCHÄFER, H. Culture-dependent and culture-independent methods reveal diverse methylotrophic communities in terrestrial environments. **Archives of Microbiology**, v. 198, n. 1, p. 17–26, 2015.
- FAUST, K.; RAES, J. Microbial interactions: From *networks* to models. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 8, p. 538–550, 2012.
- FEELEY, K.; SILMAN, M. Extinction risks of Amazonian plant species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 2009, p. 1–6, 2009.
- FERNANDES, S. A. P. et al. Seasonal variation of soil chemical properties and CO₂ and CH₄ fluxes in unfertilized and P-fertilized pastures in an Ultisol of the Brazilian Amazon. **Geoderma**, v. 107, n. 3–4, p. 227–241, 2002.

- 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. 2773–2786, 2015.
- GHASHGHAHI, M.; JETTEN, M. S. M.; LÜKE, C. Survey of methanotrophic diversity in various ecosystems by degenerate methane monooxygenase gene primers. **AMB Express**, v. 7, n. 1, 2017.
- HAMMER, Ø. PAST. Paleontological Statistics. Version 3.20. **PAST. Paleontological Statistics. Version 3.20. Reference manual**, n. 1999, p. 205, 2018.
- HANSON, R. S.; HANSON, T. E. Methanotrophic Bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 439–471, 1996.
- HAUPT, E. **Methanotrophic Bacteria and Biogeochemical Cycling in an Oil Sands End Pit Lake**. 2016. 97p. These (Biological Sciences). University Of Calgary, 2016.
- HEIMANN, M. Enigma of the recent methane budget. **Nature**, v. 476, p. 194–198, 2011.
- HO, A. et al. Conceptualizing functional traits and ecological characteristics of methane-oxidizing bacteria as life strategies. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 3, p. 335–345, 2013.
- HO, A. et al. Resilience of (seed bank) aerobic methanotrophs and methanotrophic activity to desiccation and heat stress. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 101, p. 130–138, 2016.
- HOLMES, A. J. et al. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. **FEMS microbiology letters**, v. 132, p. 203–208, 1995.
- IGUCHI, H.; YURIMOTO, H.; SAKAI, Y. *Methylovulum miyakonense* gen. nov., sp. nov., a type I methanotroph isolated from forest soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 810–815, 2011.
- IPCC. **Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change**. Intergovernmental Panel on Climate Change, v. 1, 125p. 2015.
- ISLAM, T. et al. Novel Methanotrophs of the Family Methylococcaceae from Different Geographical Regions and Habitats. **Microorganisms**, v. 3, n. 3, p. 484–499, 2015.
- KALLISTOVA, A. Y. et al. Methane formation and oxidation by prokaryotes. **Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 671–691, 2017.
- KALYUZHNAIA, M. G. et al. Fluorescence in situ hybridization-flow cytometry-cell sorting-based method for separation and enrichment of type I and type II methanotroph populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 4293–4301, 2006.

- KALYUZHNYAYA, M. G.; PURI, A. W.; LIDSTROM, M. E. Metabolic engineering in methanotrophic bacteria. **Metabolic Engineering**, v. 29, n. 9, p. 142–152, 2015.
- KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 2000.
- KARWAUTZ, C. et al. Microbial megacities fueled by methane oxidation in a mineral spring cave. **The ISME Journal**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2017.
- KATAYAMA, T. et al. Changes in microbial communities associated with gas hydrates in subseafloor sediments from the Nankai Trough. **FEMS microbiology ecology**, p. 33, May, 2016.
- KELLER, M.; MITRE, M. E.; STALLARD, R. F. Consumption of atmospheric methane in soils of central Panama: Effects of agricultural development. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 4, n. 1, p. 21–27, 1990.
- KELLY, D. .; WOOD, A. Isolation and Characterization of Methanotrophs and Methylobacteria: Diversity of Methylobacterial Organisms And of One-Carbon Substrates. In: GUAZZARONI, M. E.; CORTE, N. L. (Eds.). **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. v. 1, p. 3828–3845, 2010.
- KENNEY, G. E.; SADEK, M.; ROSENZWEIG, A. C. Copper-responsive gene expression in the methanotroph *Methylosinus trichosporium* OB3b. **Metalomics**, v. 1, 2016.
- KHADKA, R. et al. Evolutionary History of Copper Membrane Monooxygenases. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. October, p. 2493, 2018.
- KIM, J.; KIM, D. D.; YOON, S. Rapid isolation of fast-growing methanotrophs from environmental samples using continuous cultivation with gradually increased dilution rates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 13, p. 5707–5715, 7 jul. 2018.
- KNAPP, C. W. et al. Methane monooxygenase gene expression mediated by methanobactin in the presence of mineral copper sources. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 29, p. 12040–12045, 2007.
- KNIEF, C. Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on *pmoA* a molecular marker. **Frontiers in microbiology**, v. 6, n. 1664–302x, p. 1346, 2015.
- KOLB, S. et al. Quantitative Detection of Methanotrophs in Soil by Novel *pmoA*-Targeted Real-Time PCR Assays. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 5, p. 2423–2429, 2003.
- KOLB, S. The quest for atmospheric methane oxidizers in forest soils. **Environmental Microbiology Reports**, v. 1, n. 5, p. 336–346, 2009.

- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.
- LAU, E. et al. The Methanol Dehydrogenase Gene, *mxoF*, Functional and Phylogenetic Marker for Proteobacterial Methanotrophs in Natural Environments. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013.
- LAUBER, et al. The Influence of Soil Properties on the Structure of Bacterial and Fungal Communities across Land-Use Types. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2407–2415, 2008.
- LEE, E.; PARK, H.; CHO, K. Biodegradation of methane, benzene, and toluene by a consortium MBT14 enriched from a landfill cover soil. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 48, p. 273–278, 2013.
- LEE, H. J. et al. High resolution depth distribution of Bacteria, Archaea, methanotrophs, and methanogens in the bulk and rhizosphere soils of a flooded rice paddy. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. June, p. 1–13, 2015.
- LEWIS, S. et al. Tropical Forests and Atmospheric Carbon Dioxide: Current Conditions and Future Scenarios. (2016). In: Avoiding dangerous climate change. **Cambridge University Press**. p. 147–153.
- LIMA, A. B.; MUNIZ, A. W.; DUMONT, M. G. Activity and abundance of methane-oxidizing bacteria in secondary forest and manioc plantations of Amazonian Dark Earth and their adjacent soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. OCT, p. 1–10, 2014.
- 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, 2004.
- LÜKE, C. et al. Biogeography of wetland rice methanotrophs. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 862–872, 2010.
- LÜKE, C.; FRENZEL, P. Potential of *pmoA* amplicon pyrosequencing for methanotroph diversity studies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 17, p. 6305–6309, 2011.
- LUPATINI, M. et al. *Network* topology reveals high connectance levels and few key microbial genera within soils. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, n. May, 2014.
- LUPOTTO, E. et al. Distribution and activity of the anaerobic methanotrophic community in a nitrogen-fertilized Italian paddy soil. **FEMS microbiology ecology**, v. 92, n. April, p. 1–11, 2016.

- MADDOCKS, S. E.; OYSTON, P. C. F. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. **Microbiology**, v. 154, n. 12, p. 3609–3623, 2008.
- MADIGAN, M. et al. (2015). **Brock Biology of microorganisms**. 15. ed. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ..
- MAHMUD, I. et al. NMR-based metabolomics study of the biochemical relationship between sugarcane callus tissues and their respective nutrient culture media. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 24, p. 5997–6005, 2014.
- MALYAN, S. K. et al. Methane production, oxidation and mitigation: A mechanistic understanding and comprehensive evaluation of influencing factors. **Science of the Total Environment**, v. 572, p. 874–896, 2016.
- MARENGO, J. A. et al. Climatic characteristics of the 2010-2016 drought in the semiarid Northeast Brazil region. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 0, p. 1973–1985, 2017.
- MARTINY, A. C.; TRESEDER, K.; PUSCH, G. Phylogenetic conservatism of functional traits in microorganisms. **The ISME journal**, v. 7, n. 4, p. 830–8, 2013.
- MARTINY, J. B. H. et al. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 102–112, 2006.
- MCGLYNN, S. E. et al. Single cell activity reveals direct electron transfer in methanotrophic consortia. **Nature**, v. 526, n. 7574, p. 531–535, 2015.
- MENDES, L. W. et al. Land-use system shapes soil bacterial communities in Southeastern Amazon region. **Applied Soil Ecology**, v. 95, p. 151–160, 2015.
- MEYER, F.; PAARMANN, D.; D'SOUZA, M. The metagenomics RAST server—a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC microbiology**, v. 8, p. 1–8, 2008.
- MEYER, K. M. et al. Conversion of Amazon rainforest to agriculture alters community traits of methane-cycling organisms. **Molecular Ecology**, v. 38, n. 1, p. 42–49, 2017.
- MIRZA, B. et al. Response of free-living nitrogen-fixing microorganisms to land use change in the Amazon rainforest. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 1, p. 281–8, 2014.
- MIRZA, B.; RODRIGUES, J. Development of a direct isolation procedure for free-living diazotrophs under controlled hypoxic conditions. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 16, p. 5542–5549, 2012.
- MORAIS, D. K. et al. BTW—Bioinformatics Through Windows: an easy-to-install package to analyze marker gene data. **PeerJ**, v. 6, n. April, p. e5299, 2018.

- MORAWE, M. **Aerobic Methylophilic Microorganisms in an Acidic Deciduous Forest Soil: Substrate Range and Effect of pH**. 2017. 399p. Tese (Natural Sciences). Faculty of Biology, Chemistry and Geosciences, University of Bayreuth.
- MOREIRA, A.; FAGERIA, N. K. Soil chemical attributes of Amazonas State, Brazil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 40, n. 17–18, p. 2912–2925, 2009.
- MOREIRA, F. M. DE S. et al. Differentiation in the fertility of Inceptisols as related to land use in the upper Solimões river region, western Amazon. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 2, p. 349–355, 2009.
- MURREIL, J. C.; GILBERT, B.; MCDONALD, I. R. Molecular biology and regulation of methane monooxygenase. **Archives of Microbiology**, v. 173, n. 5–6, p. 325–332, jun. 2000.
- MURRELL, J. C.; DALTON, H. **Methane and Methanol Utilizers**. Biotechnol (ed.). Plenum Press, 1992.
- MUYZER, G.; DE WAAL, 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 rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695–700, 1993.
- MYUNG, J. et al. Long-term cultivation of a stable *Methylocystis*-dominated methanotrophic enrichment enabling tailored production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). **Bioresource Technology**, v. 198, p. 811–818, 2015.
- NAVARRETE, A. A. et al. Soil microbiome responses to the short-term effects of Amazonian deforestation. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 10, p. 2433–2448, 2015a.
- NAVARRETE, A. A. et al. Differential Response of Acidobacteria Subgroups to Forest-to-Pasture Conversion and Their Biogeographic Patterns in the Western Brazilian Amazon. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015b.
- NAVARRETE, A. A. et al. Acidobacterial community responses to agricultural management of soybean in Amazon forest soils. **FEMS microbiology ecology**, v. 83, n. 3, p. 607–21, 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 B: Biological Sciences**, v. 363, n. 1498, p. 1737–1746, 2008.
- NGUYEN, N. L. et al. Genomic insights into the acid adaptation of novel methanotrophs enriched from acidic forest soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. aug, p. 1–15, 2018.
- NICHOLS, N. N. et al. Chemotaxis to furan compounds by furan-degrading *Pseudomonas* strains. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 17, p. 6365–8, 2012.

- OP DEN CAMP, H. J. M. et al. Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic Verrucomicrobia. **Environmental Microbiology Reports**, v. 1, n. 5, p. 293–306, 2009.
- OSWALD, K. et al. Crenothrix are major methane consumers in stratified lakes. **ISME Journal**, v. 11, n. 9, p. 2124–2140, 2017.
- PARKS, D. H. et al. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. **Genome Research**, v. 25, n. 7, p. 1043–1055, 2015.
- PANDIT, P. S. et al. Deciphering Community Structure of Methanotrophs Dwelling in Rice Rhizospheres of an Indian Rice Field Using Cultivation and Cultivation-Independent Approaches. **Microbial Ecology**, p. 634–644, 7 nov. 2015.
- 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, 2014.
- PEDRO, G. DE A. V. et al. Determinants of the Brazilian Amazon deforestation. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 3, p. 169–176, 2017.
- PENG, Y. et al. IDBA-UD: A de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. **Bioinformatics**, v. 28, n. 11, p. 1420–1428, 2012.
- PHAM, M. D. et al. Inactivation of the particulate methane monooxygenase (pMMO) in *Methylococcus capsulatus* (Bath) by acetylene. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1854, n. 12, p. 1842–1852, 1 dez. 2015.
- 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.
- RAGHOEBARSING, A. A. et al. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. **Nature**, v. 440, n. 7086, p. 918–921, 2006.
- RANJAN, S. et al. Methane oxidation in response to iron reduction-oxidation metabolism in tropical soils. **European Journal of Soil Biology**, v. 78, p. 75–81, 2017.
- RODRIGUES, J. 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. 988–993, 2013.
- ROGNES, T. et al. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. **PeerJ**, v. 4, p. e2584, 2016.
- ŠANTL-TEMKIV, T. et al. Viable methanotrophic bacteria enriched from air and rain can oxidize methane at cloud-like conditions. **Aerobiologia**, v. 29, n. 3, p. 373–384, 2013.

- SCHIMEL, J.; GULLEDGE, J. Microbial community structure and global trace gases. **Global Change Biology**, v. 4, p. 745–758, 1998.
- SCHNYDER, E. et al. Positive diversity-functioning relationships in model communities of methanotrophic bacteria. **Ecology**, v. 99, n. 3, p. 714–723, 2018.
- SEMRAU, J. D. et al. Particulate methane monooxygenase genes in methanotrophs. **Journal of bacteriology**, v. 177, n. 11, p. 3071–3079, 1995.
- SEMRAU, J. D. et al. Methanobactin and *MmoD* work in concert to act as the “copper-switch” in methanotrophs. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 11, p. 3077–3086, 2013.
- SHANNON, P. et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction *networks*. **Genome Research**, n. 13, p. 2498–2504, 2003.
- SINISCALCHI, L. A. B. **Enriquecimento de micro-organismos metanotróficos e avaliação do potencial de oxidação anaeróbia de metano a partir de lodo de reator UASB**. 2015. 199p. Tese (Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos). Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais.
- SIRAJUDDIN, S. et al. Effects of zinc on particulate methane monooxygenase activity and structure. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 31, p. 21782–21794, 2014.
- SOARES-FILHO, B.; NEPSTAD, D. Modelling conservation in the Amazon basin. **Nature**, v. 440, n. March, p. 3–6, 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. 388–396, 2001.
- STEENBERGH, A. K. et al. Biphasic kinetics of a methanotrophic community is a combination of growth and increased activity per cell. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 71, n. 1, p. 12–22, 2010.
- STEWART, E. J. Growing unculturable bacteria. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 16, p. 4151–60, 2012.
- STOCK, M. et al. Exploration and prediction of interactions between methanotrophs and heterotrophs. **Research in Microbiology**, v. 164, n. 10, p. 1045–1054, 2013.
- STOECKER, K. et al. Cohn’s *Crenothrix* is a filamentous methane oxidizer with an unusual methane monooxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 7, p. 2363–2367, 2006.
- STRONG, P. et al. The Opportunity for High-Performance Biomaterials from Methane. **Microorganisms**, v. 4, n. 1, p. 11, 2016.

- STRONG, P. J.; XIE, S.; CLARKE, W. P. Methane as a resource: Can the methanotrophs add value? **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 7, p. 4001–4018, 2015.
- TAKETANI, R. G. et al. Co-occurrence patterns of litter decomposing communities in mangroves indicate a robust community resistant to disturbances. **PeerJ**, v. 6, p. e5710, 2018.
- TAMAS, I. et al. The (d)evolution of methanotrophy in the Beijerinckiaceae--a comparative genomics analysis. **The ISME journal**, v. 8, p. 369–382, 2014.
- TATE, K. R. Soil methane oxidation and land-use change e from process to mitigation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 80, p. 260–272, 2015.
- TER STEEGE, H. et al. Hyperdominance in the Amazonian tree flora. **Science (New York, N.Y.)**, v. 342, n. 6156, p. 1243092, 18 out. 2013.
- THEISEN, A. R.; MURRELL, J. C. Facultative methanotrophs revisited. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 13, p. 4303-4305, 2005.
- THOMAS, F. et al. Environmental and gut Bacteroidetes: The food connection. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. May, p. 1–16, 2011.
- VEKEMAN, B. et al. Improved enrichment culture technique for methane-oxidizing bacteria from marine ecosystems: the effect of adhesion material and gas composition. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, n.2, p. 281-289, 2016.
- VERAART, A. J. et al. Living apart together-bacterial volatiles influence methanotrophic growth and activity. **The ISME Journal**, 2018.
- VOOSEN, P. Scientists flag new causes for surge in methane levels. **Science**, v. 354, n. 6319, p. 1513, 2017.
- WALTERS, W. et al. Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys. **mSystems**, v. 1, n. 1, p. e0009-15, 2015.
- WANG, Y. et al. Soil methane uptake by grasslands and forests in China. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 74, p. 70–81, 2014.
- WEARN, O.; REUMAN, D.; EWERS, R. Extinction debt and windows of conservation opportunity in the Brazilian Amazon. **Science**, v. 337, p. 228–232, 2012.
- WEBSTER, K. D. et al. Recovery of Methane Consumption by Secondary Forests in the Amazon River Basin. **American Geophysical Union**, Fall Meeting 2017, p. B21B-1960. Abstract
- WEISBURG, W. G. et al. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697–703, 1991.
- WELTE, C. U. et al. Nitrate- and nitrite-dependent anaerobic oxidation of methane. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 92, 2016.

- WHITTENBURY, R.; PHILLIPS, K. C.; WILKINSON, J. F. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. **Journal of general microbiology**, v. 61, n. 2, p. 205–218, 1970.
- WILKE, A. et al. **MG-RAST Manual for version 3.3.6**, revision 9, 2014.
- YAN, Z. et al. A biochemical framework for anaerobic oxidation of methane driven by Fe(III)-dependent respiration. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2018.
- ZHOU, J. et al. Phylogenetic Molecular Ecological *Network* of Soil Microbial Communities in Response to Elevated CO₂. **mBio**, v. 2, n. 4, p. 1–8, 2011.

ANEXOS

ANEXO A. Preparo do meio de cultura NMS (*Nitrate Mineral Salt*)

O preparo do meio NMS (*Nitrate Mineral Salt*) foi realizado utilizando uma mistura de soluções esterilizadas separadamente para que não ocorra precipitação, conforme (WHITTENBURY; PHILLIPS; WILKINSON, 1970b) (Tabela 6).

Tabela 6. Composição do meio de cultura NMS (*Nitrate Mineral Salt*)

Quantidade	Reagentes
150 ml	Solução B (Tabela 7)
100 ml	Solução C (Tabela 7)
20 ml	Solução de CaCl_2 (Tabela 7)
2 ml	Solução de Fe quelato (Tabela 8)
0,5 ml	Solução de traço de Metais (Tabela 8)
727 ml	Água Milli-Q auto clavada

Tabela 7. Composição das soluções que compõem o meio de cultura NMS, estas soluções devem ser esterilizadas em autoclave.

Soluções	Quantidade	Reagentes
B	0,537 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	0,272 g	KH_2PO_4
	150 ml	Água Milli-Q
C	1 g	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	1 g	KNO_3
	100 ml	Água Milli-Q
Cloreto de Cálcio	1 g	CaCl_2
	100 ml	Água Milli-Q

Tabela 8. Composição das soluções de ferro quelato e traços de metais, estas soluções são esterilizadas por filtração através de sistema de membrana Millipore 0,22 μm .

Soluções	Quantidade	Reagentes
Ferro quelato	0,2 g	EDTA
	0,5 g	Cloreto de Ferro III
	0,3 ml	HCl concentrado
	100 ml	Água Milli-Q
Traço de metais	20 mg	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	1 mg	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	0,3 mg	$\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	3 mg	$\text{H}_3\text{BO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
	2 mg	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
	0,1 mg	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	0,2 mg	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
	0,3 mg	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	100 ml	Água Milli-Q

ANEXO B. Análises de *networks* dos diferentes solos e áreas coletadas.

Figura 27. Análise de *network* por co-ocorrência de OTUs componentes da comunidade total analisada em nível de Filo nos diferentes usos do solo e enriquecimento amostrados. Cada ponto representa uma OTU significativa; as linhas vermelhas e cinzas representam respectivamente as correlações negativas (co-exclusões) e positivas (co-ocorrência) significativas ($p < 0,05$) em relação as bactérias de interesse.

ANEXO C. Total de genomas montados por Metagenoma

Tabela 9. Dados dos genomas montados (MAGs) e anotados pelo servidor RAST dos diferentes enriquecimentos e áreas de coleta.

Área	Amostra	MAGs	Marcador de linhagem	N. Genomas	% Genoma	Contaminação
Santarém	Floresta primária	1.17	<i>Bradyrhizobium</i>	37	99,8	1,82
		1.20	Rhizobiales	92	99,53	1,14
		1.4	Bactéria	2258	99,08	1,72
		1.5	Rhizobiales	92	98,01	0,62
		1.16	Bactéria	901	89,74	3,42
		1.8	<i>Burkholderia</i>	64	76,42	1,51
		1.18	Deltaproteobacteria	83	73,5	1,33
		1.10	Gammaproteobacteria	1097	68,45	1,74
		1.9	Bacteroidetes	364	65,96	1,23
	Floresta secundária	1.6	Bactéria	5449	63,79	0
		9.1	Burkholderiales	54	99,43	0,57
		9.11	Clostridiales	172	99,11	2,13
		9.7	Burkholderiales	91	88,83	3,95
		9.8	Rhizobiales	92	84,77	0,47
		9.3	Clostridiales	172	76,52	4,05
	Pastagem	9.10	Bactéria	433	63,47	0,29
		3.16	Bacteroidetes	364	100	0,49
		3.10	Bacteroidetes	364	99,01	1,48
		3.12	Burkholderiales	193	99,01	0,31
		3.5	Flavobacteriaceae	81	98,94	0
		3.6	Bacteroidetes	350	98,1	0
		3.1	Gammaproteobacteria	112	95,69	1,59
		3.17	Bacteroidetes	350	93,16	1,67
		3.23	Gammaproteobacteria	112	90,81	4,94
		3.18	Gammaproteobacteria	112	88	0,58
		3.15	Gammaproteobacteria	112	84,13	1,76
		3.19	Bacteroidetes	364	75,64	2,22
		3.14	Bactéria	924	75,75	0,66
		3.25	Bactéria	433	74,16	3,21
	Floresta primária	4.3	Burkholderiales	54	98,51	0,4
		4.4	Gammaproteobacteria	112	96,73	0,94
		4.2	Bactéria	5449	69,31	8,62
Rondônia	Pastagem	5.3	Bacteroidetes	350	99,52	0,95
		5.17	Betaproteobacteria	323	99,04	0,32
		5.8	Rhizobiales	92	98,01	2,2
		5.21	Gammaproteobacteria	112	97,28	1,84
		5.2	Burkholderiales	193	97,28	0,93
	Pastagem	5.11	Gammaproteobacteria	112	96,46	1,15
		5.20	Flavobacteriaceae	81	94,61	0,42
		5.18	Burkholderiales	193	93,26	1,92
		5.13	Gammaproteobacteria	112	92,23	1,63
		5.7	Bactéria	2258	85,96	0,89
		5.14	Bactéria	5449	83,75	0,86
		5.1	Bactéria	5449	75,17	0
		5.10	Bactéria	5449	74,31	0