**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
Centro de Energia Nuclear na Agricultura**

**Comunidades bacterianas e metanotróficas da Terra Preta da
Amazônia sob atmosfera enriquecida com metano**

Marília Hauck Reichert

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestra em Ciências. Área de
concentração: Ecologia Aplicada

Piracicaba

2015

Marília Hauck Reichert
Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas

**Comunidades bacterianas e metanotróficas da Terra Preta da
Amazônia sob atmosfera enriquecida com metano**

Orientadora:
Profª Drª **TSAI SIU MUI**

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestra em Ciências. Área de
concentração: Ecologia Aplicada

Piracicaba
2015

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

Reichert, Marília Hauck

Comunidades bacterianas e metanotróficas da Terra Preta da Amazônia sob
atmosfera enriquecida com metano / Marília Hauck Reichert. - - Piracicaba, 2015.
56 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Centro
de Energia Nuclear na Agricultura, 2015.

1. Terra Preta da Amazônia 2. Metanotróficas 3. qPCR 4. pmoA 5. Bacteria
I. Título

CDD 631.46
R351c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico...

...aos meus pais, Roberto (in memoriam) e Maria Aparecida, responsáveis pela formação do meu caráter e educação. Não teria conseguido nada sem o constante e eterno apoio de vocês.

Agradeço...

...primeiramente a Deus, por me conceder a oportunidade de tentar novamente a cada dia.

...aos meus pais, que nunca mediram esforços para me mostrar que o caminho nem sempre é fácil, mas que a possibilidade de dormir em paz é reconfortante. Mãe, obrigada por tudo. Pai, eu sei que daí de cima você sabe que essa conquista também é sua.

...a toda minha família, pelo amor, apoio, paciência e oração.

...a professora Tsai Siu Mui, por ter me permitido conhecer um pouco mais de perto a ciência, pelo apoio e transmissão de conhecimento.

...ao meu noivo, Fabiano, pelo amor e por ter aguentado os surtos de uma pós-graduanda.

...ao pessoal de Manaus e da EMBRAPA Caldeirão, pelo auxílio nas coletas.

...ao Rafael Moral, pelo auxílio com as análises estatísticas.

...à FAPESP, pela concessão da bolsa (Projeto 2011/17035-6).

...às Bibliotecárias pelo auxílio na formatação do trabalho.

...à Mara Casarin, pelo constante bom humor e simpatia, pela prontidão em auxiliar nos assuntos referentes aos prazos e aos processos administrativos.

...aos técnicos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA/USP): Fábio, Wagner e Elias por todo o auxílio durante o desenvolvimento do projeto desde a montagem de experimento até nos momentos de tentar encontrar soluções para o inexplicável, mas, principalmente, pelo apoio e amizade construída nesses anos de convivência, conversas e risadas.

...às pessoas que tive oportunidade de conviver no laboratório: Acacio, Aline Morgan, Andreza, Bia, Carol, Clóvis, Dani, Dennis, Ellen, Enéas, Fabi, Felipe, Fernanda Cassieri, Gustavo, Helena, Lina, Lucas, Lucas Palma, Janne, João, Mari, Marina, Maju, Patrícia,

Paulinha, Rosineide, Tatiana. Obrigada por todo auxílio e apoio do começo ao fim e mais, por hoje fazerem parte da minha história.

...aos queridos Aline, Andressa e Caio por estarem presentes nos momentos bons e ruins, buscarem comigo soluções para os problemas e prontidão nas horas de necessidade, pela comemoração a cada fim de reação ou experimento com bons resultados, além da amizade e companheirismo.

...às “pitchucas”, Marcela e Naíssa, o que seria de mim sem vocês? Obrigada pela amizade, ajuda, companheirismo, risadas, choros e a constante presença, mesmo que de longe. Sei que sempre vou lembrar-me de vocês com saudade e vocês farão muita falta, mas não pensem que não aparecerei nas suas residências para uma visita e tomar umas cervejinhas!

...às “azamigas de verdade!” por fazerem parte da minha vida desde a faculdade. Obrigada por estarem sempre por perto, independente da distância, do tempo, dos compromissos. Quero vocês para sempre na minha vida!

...a todos que de alguma forma contribuíram para a execução desse trabalho.

...a todos que estiveram presente na minha vida durante esses anos em Piracicaba. Aqui se encerra uma etapa da minha vida onde aprendi muito com meus erros e acertos e que levarei muitas lembranças para o novo ciclo que se inicia daqui para frente!

Muito Obrigada!

“O sábio teme o céu sereno; em compensação, quando vem a tempestade ele caminha sobre as ondas e desafia o vento.”

Confúcio

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 DESENVOLVIMENTO	17
2.1 Revisão Bibliográfica	17
2.1.1 Microrganismos Do Solo	17
2.1.2 Metanotróficas.....	18
2.1.3 Terra Preta da Amazônia	19
2.1.4 Técnicas moleculares em Ecologia Microbiana	21
2.2 Materiais e Métodos	23
2.2.1 Área de Estudo	23
2.2.2 Amostragem.....	25
2.2.3 Caracterização química do solo	26
2.2.4 Experimento de microcosmo	26
2.2.5 Extração de DNA genômico total do solo	29
2.2.6 qPCR dos genes 16S rRNA <i>Bacteria</i> e <i>pmoA</i>	30
2.2.7 Processamento de dados.....	31
2.3 Resultados e Discussão	32
2.3.1 Caracterização química das amostras de solo	32
2.3.2 Avaliação do consumo de metano.....	35
2.3.3 Extração do DNA total do solo	37
2.3.4 Análise comparativa de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para os genes 16S rRNA <i>Bacteria</i> e <i>pmoA</i>	38
3 CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	45
ANEXOS.....	53

RESUMO

Comunidades bacterianas e metanotróficas da Terra Preta da Amazônia sob atmosfera enriquecida com metano

Os microrganismos são responsáveis por diversos processos biológicos essenciais ao ambiente, sendo estes intimamente relacionados com as taxas de decomposição da matéria orgânica e com a persistência da fertilidade nos solos. Apesar da importância e grande diversidade, a identificação de táxons envolvidos em processos específicos está geralmente restrita a uma pequena fração da microbiota que pode ser isolada e cultivada. Sendo assim, pouco se sabe sobre os microrganismos que atuam no ciclo do carbono no solo, como, aqueles que participam da oxidação do metano (CH_4), por exemplo. Estes, chamados metanotróficos exercem papel importante no controle da emissão desse gás de efeito estufa para a atmosfera podendo servir como um filtro de metano e mitigar suas emissões. A Terra Preta Antropogênica (TPA) é um importante ecossistema na região amazônica e contém fragmentos cerâmicos e frações orgânicas, como o carvão (biocarvão), que foram incorporados em períodos pré-colombianos. Isso resultou em solos sustentáveis com elevada fertilidade, apresentando cerca de três vezes mais matéria orgânica, setenta vezes mais biocarvão e diversidade microbiana maior quando comparados com os solos adjacentes. Com o presente trabalho, objetivou-se avaliar o efeito do enriquecimento atmosférico com metano sobre a abundância da comunidade bacteriana total e de metanotróficas nos solos de Terra Preta da Amazônia sob floresta e cultivo (TPA Floresta e TPA Cultivada) e seus respectivos solos adjacentes (ADJ Floresta e ADJ Cultivado), coletados Estação Experimental do Caldeirão (Iranduba, AM). Para tanto, foi realizado um experimento de microcosmo no qual os solos foram incubados com atmosfera contendo 10% de metano e meio de cultura NMS (do inglês, Nitrate mineral salts), utilizado para crescimento de metanotróficas, a fim de avaliar a resposta dessas comunidades ao longo de 21 dias. A variação da concentração de metano na atmosfera dos frascos foi monitorada através de cromatografia gasosa e o DNA do solo recuperado nos tempos de coleta durante o experimento foi extraído para utilização na técnica de PCR quantitativo (qPCR), a qual possibilitou a quantificar o número de cópias dos genes 16S rRNA *Bacteria* e *pmoA* nas amostras. O solo de Terra Preta da Amazônia se mostrou um potencial dreno de CH_4 atmosférico. Comparando as respostas dos solos com floresta (TPA Floresta e ADJ Floresta) e cultivados (TPA Cultivada e ADJ Cultivado), notou-se uma menor variação da abundância da comunidade metanotrófica presente nestes últimos, o que indica que alteração do uso do solo afeta a capacidade do mesmo em retirar metano da atmosfera. Os solos Adjacentes apresentaram resposta diferente dos solos de TPA, indicando que a história de formação, ocupação e uso do solo também influenciam na capacidade do solo em drenar o metano da atmosfera.

Palavras-chave: Terra Preta da Amazônia; Metanotróficas; qPCR; *pmoA*; *Bacteria*

ABSTRACT

Bacterial and methanotrophic communities of Amazonian Dark Earth under methane enriched atmosphere

Microorganisms are responsible for several biological processes essential to the environment, which are closely related to the rates of decomposition of organic matter and with the persistence of fertility in soils. Despite the importance and high diversity, identification of taxa involved in specific processes is usually restricted to a small fraction of the microbiota that can be isolated and cultivated. Thus, little is known about the microorganisms that act on the carbon cycle in the soil, such as those participating in the oxidation of methane (CH₄), for example. These, known as methanotrophs play an important role in controlling the emission of greenhouse gas into the atmosphere and may serve as a methane filter and mitigate their emissions. Amazonian Dark Earth (ADE) is an important ecosystem in the Amazonian region and contains ceramic fragments and organic amendments, such as charcoal (biochar), which were incorporated in Pre-Columbian periods. This resulted in sustainable soils with high fertility, presenting about three times more organic matter, seventy times more biochar and higher microbial diversity when compared to adjacent soils. The present work aimed to evaluate the effect of atmospheric methane enrichment on the abundance of the bacterial and methanotrophic community in ADE soils under forest and cultivation (ADE Forest and ADE Cultivated) and their respective adjacent soils (ADJ Forest and ADJ Cultivated), sampled at Caldeirão Experimental Station (Iranduba, AM). For this purpose, a microcosm experiment was performed in which the soils were incubated under an atmosphere containing 10% of methane and NMS (Nitrate mineral salts) culture medium used for methanotrophic growth in order to evaluate the response of these communities over 21 days. The variation of methane concentrations in the atmosphere of the vials was measured by gas chromatography and the soil DNA recovered in the collection time during the experiment was extracted for use in the technique of quantitative PCR (qPCR), which made it possible to quantify the number of copies of 16S rRNA Bacteria and *pmoA* on samples. The Amazonian Dark Earth soil showed a potential sink for atmospheric CH₄. Comparing atmospheric responses of forest soils (ADE Forest and ADJ Forest) and cultivated soils (ADE Cultivated and ADJ Cultivated), noted a minor variation in the abundance of methatroph community in these last, indicating that land use change affects the ability of it to sink the methane atmosphere. Adjacent soils had different responses of ADE soils, indicating that the history formation, occupation and land use also influence the capacity of the soil to drain methane from the atmosphere.

Keywords: Amazonian Dark Earth; Methanotrophs; qPCR; *pmoA*; Bacteria

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos são responsáveis por transformações fundamentais nos ciclos biogeoquímicos, na ciclagem de nutrientes, na regulação da dinâmica da matéria orgânica, no sequestro de carbono no solo, degradação de xenobiontes, fixação biológica do N_2 atmosférico e produção de gases relacionados ao efeito estufa, entre outras transformações conhecidas e muitas ainda por serem descobertas (LAMBAIS et al., 2005).

Os solos de Terra Preta da Amazônia (TPA) (Latossolo amarelo antrópico) são considerados peças-chave na busca de soluções para a agricultura sustentável na Amazônia, pois consistem em pequenas faixas de solo que apresentam altas concentrações de nutrientes, substâncias húmicas, matéria orgânica e visível distribuição de fragmentos de cerâmica e artefatos líticos (FALESI, 1972), e encontram-se distribuídos aleatoriamente, representando 10% dos solos amazônicos.

A população microbiana exerce um papel fundamental nos ciclos biogeoquímicos e está intimamente relacionada com as taxas de decomposição da matéria orgânica e com a persistência da fertilidade nos solos de TPA (TSAI et al., 2009). Entretanto, pouco se conhece sobre a magnitude e estrutura da diversidade microbiana e o verdadeiro papel dos microrganismos na manutenção da capacidade produtiva destes solos.

Nesse sentido, a elaboração de uma prospecção da diversidade microbiana dos solos de TPA é de suma importância para o conhecimento da extensão da diversidade deste bioma tropical e para a sustentabilidade da agricultura, assim como para a compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas no solo e suas interações com outros componentes da biodiversidade, bem como para intensificar benefícios econômicos e estratégicos, como a descoberta de microrganismos potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos.

Devido a elevação das emissões de CH_4 com o passar dos anos (FEIGL et al., 2002) e a importância desse gás para o aquecimento global tem-se intensificado as pesquisas para o entendimento do papel dos microrganismos envolvidos no ciclo

do metano em ambientes variados. As bactérias metanotróficas apresentam a habilidade de utilizar o metano como fonte de carbono e energia (HANSON; HANSON, 1996), conferindo a esse grupo de microrganismos grande potencial na redução de emissões de CH₄ para a atmosfera.

Nesse contexto, objetivou-se o estudo dos microrganismos responsáveis pela oxidação do metano em solos de Terra Preta da Amazônia e Solo Adjacente, através do enriquecimento das comunidades metanotróficas. Foi avaliado o consumo de CH₄ *in vitro*, além de técnicas moleculares como a quantificação de *Bacteria* e do gene funcional *pmoA*, assim como a identificação dos metanotróficos a partir do solo enriquecido.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.2 Microrganismos Do Solo

As comunidades microbianas podem ser consideradas a base das cadeias alimentares do ecossistema (HOLGUIN et al., 2001). Apesar da diversidade microbiana no solo ser maior do que em qualquer outro ambiente e ainda maior do que a dos organismos eucarióticos (STREIT et al., 2004), apenas a algumas décadas começou-se a entender que sua biodiversidade é fator preponderante na regulação e no funcionamento dos ecossistemas (COPLEY, 2000).

O estudo de Ecologia Microbiana do Solo é importante para o entendimento das inter-relações entre os microrganismos e o ambiente através do estudo das estruturas e da diversidade funcional das comunidades microbianas no solo e a sua resposta aos distúrbios naturais ou antropogênicos (RANJARD et al., 2000). Essa avaliação é facilitada pela sensibilidade e disponibilidade dos microrganismos nas amostras, podendo ser considerados como indicadores rápidos e sensíveis às alterações do solo (GARCÍA-ORENES et al., 2013).

Devido a essas atribuições é crescente o interesse no estudo dos microrganismos do solo que desempenham papel chave na ciclagem de nutrientes e manutenção da fertilidade do solo, além de apresentarem valor biotecnológico para a produção de muitos produtos ainda inexplorados (COPLEY, 2000).

Portanto, o estudo da diversidade microbiana nos solos é essencial tanto para a definição de estratégias para preservação de biomassa quanto para o desenvolvimento de sistemas indicadores de alterações ambientais associadas a distúrbios, como a presença de poluentes ou a utilização não sustentável de solos agrícolas (KENNEDY; SMITH, 1995). Além disso, o conhecimento dos recursos genéticos da microbiota dos solos pode contribuir para a descoberta de genes codificando novas enzimas com atividade ótima em condições ambientais extremas e peptídeos com atividades de interesse biotecnológico (LAMBAIS et al., 2005).

2.2.1 Metanotróficas

Nas últimas décadas o foco das pesquisas e da preocupação da população mundial são mudanças climáticas provocadas pelo aumento na emissão dos gases responsáveis pelo efeito estufa, dentre eles o dióxido de carbono, metano e óxido nitroso. (THE WORLD BANK, 2014).

O efeito estufa é um fenômeno natural necessário à manutenção da vida no planeta. No entanto, a partir da Revolução Industrial na década de 1950, o incremento de gases na atmosfera associados a queima de combustíveis fósseis, ao desmatamento (BARRETO et al., 2009) e as mudanças no uso da terra (FOLEY et al., 2005) fez com que as concentrações dos gases de efeito estufa sofressem expressiva elevação.

Dentre os gases do efeito estufa, o metano (CH_4) é um dos principais gases que contribuem com o aquecimento global, sendo o hidrocarboneto mais abundante na atmosfera, $1,21 \text{ mg/m}^3$ em média, apresentando uma ação entre 20 e 30 vezes maior do que a do dióxido de carbono (CO_2) em relação à retenção do calor responsável por esse fenômeno (LE MER; ROGER, 2001; THANGARAJAN et al., 2013).

Um importante grupo relacionado ao ciclo do carbono são as metanotróficas, um grupo dentro dos microrganismos metilotróficos que utilizam metano como base de carbono e fonte de energia (HANSON; HANSON, 1996; BOWMAN et al., 1993). Podem ser divididos em dois grupos taxonômicos: tipo I e tipo II. No tipo I inclui-se os gêneros *Methylobacter*, *Methylomicrobium*, *Methylomonas*, *Methylocaldum*, *Methylosphaera*, "*Methylothermus*", *Methylosarcina* e *Methylococcus*, as quais pertencem a subdivisão γ de *Proteobacteria*. O tipo II inclui os gêneros *Methylocystis*, *Methylosinus*, *Methylocella* e *Methylocapsa* pertencentes a subdivisão α de *Proteobacteria* (HANSON; HANSON, 1996).

A utilização do metano pelas bactérias metanotróficas como fonte de carbono e energia é possível devido à ação da enzima metano monooxigenase (MMO) que oxida o metano produzindo metanol com geração de duas moléculas de água (HANSON; HANSON, 1996). Essa enzima apresenta uma forma particulada ligada à membrana (pMMO), presente em todas as bactérias metanotróficas com exceção do

gênero *Methylocella*, e em uma forma solúvel citoplasmática (sMMO) (THEISEN et al., 2005; McDONALD et al., 2008). O metanol é transformado em formaldeído, pela ação da enzima metanol desidrogenase (MDH), que pode ser utilizado em diferentes rotas metabólicas (HANSON; HANSON, 1996).

O processo de oxidação biológica do metano depende de diferentes fatores físico-químicos, envolvem tanto características geotécnicas quanto microbiológicas da cobertura. Na literatura, encontram-se informações sobre a importância do teor de umidade do solo de cobertura (ZEISS, 1996; BOECKX et al., 1996; VISVANATHAN, 1999; CHRISTOPHERSEN, 2001), e sobre a concentração de nutrientes e inibidores (KIGHTLEY; NEDWELL, 1995; BOGNER, 1995; VISVANATHAN, 1999).

2.2.2 Terra Preta da Amazônia

A Amazônia, maior floresta do mundo, se espalha por seis países da América Latina e representa a vigésima parte de toda a superfície continental da Terra. O Brasil possui cerca de 20% da biodiversidade mundial, concentrando-se na Floresta Amazônica, no entanto, essa imensa diversidade biológica e as espécies que a compõem juntamente com suas relações filogenéticas são pouco conhecidas, assim como os microrganismos e suas interações com outros seres (SOUZA et al., 2004).

Diferentemente do que com frequência é levantado sobre a Amazônia como sendo um ambiente uniforme de alta pluviosidade e altas temperaturas, observa-se nessa região condições ambientais muito diversificadas, o que é acompanhada por variações na vegetação, nos tipos e nas propriedades dos solos (SOMBROEK, 2000).

Os solos de Terra Preta da Amazônia, classificados como Latossolo amarelo antrópico, representam 0,1 a 0,3% dos solos amazônicos (SOMBROEK et al., 2003) com manchas distribuídas aleatoriamente e podem ser considerados peças-chave na busca de soluções para a agricultura sustentável na Amazônia, por apresentarem altas concentrações de nutrientes, substâncias húmicas, matéria orgânica e visível distribuição de fragmentos de cerâmica e artefatos líticos (FALESI, 1972).

Estes solos possuem origem antrópica, datados de atividade de índios do período Pré-Colombiano e foram enriquecidos com nutrientes provavelmente pelo manejo de restos orgânicos e do fogo pelas populações pré-colombianas, e apresentam teores de matéria orgânica estável superiores aos solos adjacentes (SMITH, 1980; MCCANN et al., 2001; GLASER et al., 2001), podendo ser relacionado às características mineralógicas desses solos orgânicos ou devido à presença de maior quantidade de carvão vegetal (carbono orgânico) em relação aos solos adjacentes, onde ocorre rápida decomposição da matéria orgânica devido às altas temperaturas, precipitações elevadas e deficiência de minerais estáveis (LIANG et al., 2009)

As Terra Pretas, de modo geral, não são homogêneas, apresentando diferenças quanto a fertilidade e potencial produtivo (LEHMANN et al., 2003, porém algumas características são comuns a maioria das TPA como elevados teores de fósforo, cálcio e alguns micronutrientes, como o manganês e o zinco, além de pH mais elevado, baixa saturação por Al e Fe, e elevados níveis de capacidade de troca catiônica (CTC) (KERN; KÄMPF, 1989) quando comparados aos solos adjacentes.

A denominação desse solo está relacionada à sua coloração escura, ocasionada pelo acúmulo de matéria orgânica, aproximadamente, 35% de carvão pirogênico ao longo do espesso horizonte A antrópico (GLASER et al. 2000; 2001).

O carvão pirogênio é formado pela carbonização parcial de materiais lignocelulósicos e são altamente resistentes à oxidação térmica, química e foto-oxidação (SKJEMSTAD et al., 1996). Sua incorporação no solo é um mecanismo importante de sequestro de carbono (SCHMIDT et al., 2000) decorrente da sua capacidade recalcitrante (SWIFT, 2001) e frequentemente exercem importantes efeitos sobre a fertilidade dos solos (WARDLE et al., 1998; KLEINMAN et al., 1995), incluindo o aumento da decomposição da matéria orgânica mais lábil com o consequente aumento da disponibilidade de cátions e dos valores de pH (TAMM, 1991).

Segundo Tsai et al. (2003), a presença de material orgânico estável e a grande atividade biológica indicam que o solo TPA pode ser um sítio de alta diversidade microbiana, constituindo uma fonte de germoplasma microbiano, resultado obtido a partir da avaliação da diversidade bacteriana com base no sequenciamento do gene 16S rDNA onde foi possível encontrar alta ocorrência de

clones homólogos a bactérias não cultivadas. Isto demonstra a necessidade de se intensificar estudos nesses ambientes, que podem ser *hot spot* de diversidade bacteriana e de novos produtos biotecnológicos.

2.2.3 Técnicas moleculares em Ecologia Microbiana

Tradicionalmente, os microrganismos são estudados através do cultivo e isolamento de microrganismos em laboratório (RANJARD et al., 2000), porém apenas uma pequena fração dos organismos na natureza, ao redor de 0,1% ou no máximo 10% do total da população, é cultivável através do uso de técnicas microbiológicas de rotina (TORSVIK et al., 1990; AMANN et al., 1995).

A caracterização dos microrganismos não cultivados, utilizando métodos moleculares é uma maneira de identificar e conhecer suas distribuições e funções no meio ambiente. Microrganismos não cultivados presentes no solo são filogeneticamente distintos dos cultiváveis e seus requerimentos para cultura em laboratório ainda não foram determinados (CANNAVAN, 2007).

As ferramentas moleculares vêm contribuindo nos estudos das comunidades microbianas do solo, porém as técnicas de enriquecimento e cultivo ainda são essenciais para o conhecimento das capacidades metabólicas das características fenotípicas dos microrganismos, sendo necessária uma interação entre os enfoques para a construção de um quadro que represente o ambiente (MUYZER; SMALLA, 1998).

Os grandes avanços no campo da biologia molecular (extração de DNA, amplificação por PCR, clonagem de DNA e sequenciamento de DNA) permitiram o desenvolvimento de técnicas que não requerem o isolamento e cultivo de microrganismos, principalmente no estudo das bactérias, favorecendo a avaliação desses microrganismos em amostras ambientais (TIEDJE et al., 1999), permitindo a comparação de diferentes comunidades de microrganismos derivados de diferentes ambientes (MARSH, 1999). Através desses estudos independentes de cultivo tem-se levantado que um grama de solo pode conter 10 bilhões de microrganismos, representando milhares de espécies (AMANN, 2001).

A partir da ferramenta de PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*), que permite amplificar sequências de nucleotídeos de forma rápida e segura (MULLIS, 1990) foi desenvolvida grande parte das técnicas utilizadas no estudo de Ecologia Microbiana como biblioteca de genes, sequenciamento de DNA, pirosequenciamento, PCR quantitativo em tempo real, análise de *fingerprint*, entre outras.

A sequência a ser amplificada no PCR é definida por pequenos fragmentos, chamados de *primers*, capazes de hibridizar com a sequência de interesse (BIRKENMEYER; MUSHAHWAR, 1991).

Os estudos da comunidade bacteriana geralmente se iniciam com a amplificação do gene 16S rRNA. Para acessar um grupo específico de microrganismos pode-se estudar genes funcionais ao invés de 16S rRNA possibilitando alcançar a diversidade com potencial funcional no ambiente a ser investigado, uma vez que a extração de DNA total e análise com *primers* de PCR nos informa quais os organismos ali presentes. Ademais, o estudo de genes funcionais, permite o melhor entendimento e papel dos microrganismos no ciclo de compostos biogeoquimicamente importantes, como no presente estudo, o metano. (McDONALD et al., 2005)

Para o estudo dos microrganismos envolvidos na atividade metanotrófica utilizamos o gene *pmoA*, que codifica a subunidade alfa da metano mono-oxigenase particulada (pMMO) é altamente conservado e, por isso, tem sido amplamente utilizado para a detecção desses organismos (McDONALD et al., 2008; LUESKEN et al., 2011).

Uma técnica molecular utilizada para o estudo da comunidade microbiana é a PCR quantitativo em tempo real (qPCR), a qual permite realizar a quantificação precisa de sequências de interesse em amostras ambientais (HIGUCHI et al., 1993), proporcionando um melhor entendimento da influência de diferentes ambientes, tipo de vegetação e da rizosfera na população microbiana.

Baseada na detecção em tempo real da concentração de ácidos nucléicos através da intensidade de fluorescência gerada após cada ciclo de acordo com o acúmulo de produtos da PCR durante cada ciclo de amplificação. (ANKLAM et al., 2002; RAEYMAEKERS, 2000), a detecção é possibilitada pelo uso de corantes intercalantes, iniciadores ou sondas fluorescentes que hibridizam com a sequência

de interesse (GAŠPARIČ et al., 2009). Para a detecção da fluorescência, independente do sistema utilizado, a técnica necessita de termocicladores equipados com sistema ótico capazes de capturar a fluorescência emitida em cada ciclo e computadores com *softwares* para análise dos dados. (NOVAIS; PIRES-ALVES; SILVA, 2004).

Essa técnica permite que os dados sejam gerados com maior rapidez, pois os processos de amplificação, detecção e quantificação de DNA são realizados em uma etapa. A quantificação dos ácidos nucléicos é realizada durante a fase exponencial da reação, sendo determinado o Cycle Threshold (C_T), o qual representa o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial. Neste ponto, determina-se a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência, sendo o valor de C_T da amostra de interesse comparado com os valores de C_T de amostras contendo quantidades conhecidas do mesmo gene (padrões externos), possibilitando a determinação do número de cópias presente na amostra inicialmente (NOVAIS; PIRES-ALVES; SILVA, 2004).

2.3 Materiais e Métodos

2.3.1 Área de Estudo

A Estação Experimental do Caldeirão (03°26'S, 60°23'W), localizada na EMBRAPA Amazônia Ocidental (CPAA-AM), em Iranduba – AM, à aproximadamente 22 km de Manaus, compreendendo uma área de 208,14 ha onde são conduzidas pesquisas com grãos, hortaliças, mandioca, silvicultura e piscicultura. O clima da região é classificado como tropical chuvoso e úmido. O solo adjacente é classificado como Argissolo Amarelo Tb distrófico. (NEVES-JUNIOR, 2008)

A vegetação natural é de floresta tropical úmida com precipitação anual de 2530 mm (1971 - 1997) sendo o valor máximo sazonal entre dezembro e maio, e a temperatura média anual é de 25,8°C (1987 - 1997), com umidade relativa de 85% (CORREIA; LIEBEREI, 1998).

O sítio de Terra Preta da Amazônia (TPA) sob floresta secundária (capoeira) (03°15'11"S - 60°13'43"W) apresenta vegetação não é perturbada há mais de 40 anos (Figura 4). O sítio sob cultivo (03°15'09"S - 60°13'42"W) (Figura 5), principalmente de mandioca, compreende uma área de TPA onde se desenvolve intensa atividade agrícola há pelo menos 30 anos, sendo que essas áreas encontram-se adjacente uma a outra.

Foram estudadas áreas de solo adjacente com as mesmas condições da TPA, sob floresta secundária (capoeira) não perturbada há mais de 40 anos e solo adjacente sob cultivo de tucumã, sendo essas áreas adjacentes uma a outra e próximas às áreas de Terra Preta da Amazônia.

Figura 4 - (a) Sítio de TPA sob floresta secundária (capoeira) na Estação experimental do Caldeirão (Iranduba, AM). (b) detalhe do perfil de TPA sob capoeira.

Fotos: Mariana Germano

Figura 5 - (a) Sítio de TPA sob cultivo de mandioca (cultivada) na Estação Experimental do Caldeirão (Iranduba, AM). (b) detalhe do perfil de TPA sob cultivo

Fotos: Mariana Germano.

2.3.2 Amostragem

A campanha de coleta foi realizada em Novembro de 2013, sendo amostradas quatro áreas: Terra Preta da Amazônia sob floresta secundária (capoeira) (TPA Floresta); Terra Preta da Amazônia sob cultivo de mandioca (TPA Cultivada); Solo Adjacente sob floresta secundária (capoeira) (ADJ Floresta) e Solo Adjacente sob cultivo de tucumã (ADJ Cultivado).

As amostras foram coletadas em tubos PVC, nas profundidades de 0 a 15 cm, sendo coletadas três repetições por área, com quatro tubos cada, ao longo de um transecto com distância de 10 a 15 metros entre os pontos.

Após a coleta, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente para a menor perturbação visando à conservação da comunidade microbiana e enviada para o Laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA/USP), a fim de iniciar as análises de caracterização químicas e moleculares. Uma alíquota foi enviada para o Laboratório de Análises Químicas do Departamento de Ciência do Solo, da Escola

Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), para a análise das propriedades químicas.

2.3.3 Caracterização química do solo

De cada uma das amostras compostas, alíquotas de solo (300 g) foram coletadas e enviadas ao Laboratório de Análises de Solo da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) para determinação dos seguintes atributos: matéria orgânica (MO), teores totais de N-NH_4^+ e N-NO_3^- , pH, teores de fósforo (P) e de cátions trocáveis (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Al^{3+}), acidez potencial (H^+ + Al^{3+}), capacidade de troca catiônica (CTC), soma de bases (SB), saturação por bases (V) e textura (teores de areia, silte e argila).

2.3.4 Experimento de microcosmo

Os microcosmos foram montados utilizando o solo amostrado na Estação Experimental Caldeirão (Iranduba – AM). O conteúdo dos tubos de PVC coletados por ponto foi homogeneizado e posteriormente foram separadas as alíquotas utilizadas para a implantação do experimento.

Para cada um dos três pontos amostrados por área foram montados seis frascos, sendo que em cada um foi pesado 10g de solo e adicionado 15 ml de meio mínimo mineral NMS (Nitrate Mineral Salts Medium) (ANEXO A) em frascos de ampicilina de 160 ml (Figura 6). O meio NMS é um meio utilizado para o crescimento, enriquecimento e isolamento de bactérias metanotróficas (MARTINEAU; WHYTE; GREER, 2010), sendo amplamente usado para cultivo e isolamento destes microrganismos (BOWMAN, 2006) e nesse experimento foi adicionado para estimular a atividade metanotrófica e obter maior enriquecimento da comunidade envolvida na oxidação do metano. Os frascos foram fechados com batoques de butila e lacres metálicos.

Figura 6 – Frasco de ampilina de 160 ml, utilizado no experimento de microcosmo

Das seis repetições montadas por ponto amostrado, cinco tiveram sua atmosfera interna acertada em 10% de metano em ar atmosférico, sendo esse gás o substrato único de carbono e energia dos frascos. O outro frasco restante foi utilizado como controle para ausência de produção de CH_4 , sendo incluído em seu *headspace* apenas ar atmosférico. Todos os gases foram injetados nos frascos de maneira asséptica, passando por unidade filtrante com poros de $0,2\mu\text{m}$ (Millipore), sendo esta medida adotada para evitar a contaminação do sistema. O gás metano utilizado foi o Metano N45 da marca Air Liquide.

O experimento foi conduzido em estufa de crescimento de microrganismos a 28°C , submetido a agitação de 150rpm, no escuro.

Para o acompanhamento da atividade metanotrófica nos frascos foram realizadas coletas logo após a montagem de todos os frascos, sendo amostrados três mililitros do *headspace* de cada microcosmo.

Com o objetivo de favorecer o crescimento de bactérias metanotróficas em detrimento de outros microrganismos, foram realizados três refluxos da atmosfera interna dos frascos com intervalo de sete dias entre eles.

As coletas da primeira introdução de atmosfera no *headspace* dos frascos foram realizadas logo após a introdução do experimento, após quatro e sete dias da instalação, sendo a cada coleta era sacrificada uma repetição contendo metano, para a recuperação do DNA do solo em cada tempo do experimento. No sétimo dia

de experimento os frascos restantes, incluindo a repetição controle, tiveram suas atmosferas internas renovadas e quantificadas após a renovação do *headspace* e após sete dias, sendo então sacrificada mais uma repetição. Esse esquema foi repetido no décimo quarto dia de experimento. No total o experimento foi conduzido por 21 dias, quando a última repetição foi sacrificada, juntamente com o frasco controle de cada ponto (Figura 7).

Os frascos controles tiveram suas atmosferas amostradas e refeitas nos mesmos padrões das repetições com atmosfera acrescida de metano, porém foi sacrificado somente ao final do experimento.

REPETIÇÃO\ÁREA	TPA-FLO	TPA-CUL	ADJ-FLO	ADJ-CUL
t0	P1 P2 P3	P1 P2 P3	P1 P2 P3	P1 P2 P3
t4	P1 P2 P3	P1 P2 P3	P1 P2 P3	P1 P2 P3
t7	P1 P2 P3	P1 P2 P3	P1 P2 P3	P1 P2 P3
t14	P1 P2 P3	P1 P2 P3	P1 P2 P3	P1 P2 P3
t21	P1 P2 P3	P1 P2 P3	P1 P2 P3	P1 P2 P3
Controle(C)	P1 P2 P3	P1 P2 P3	P1 P2 P3	P1 P2 P3

Figura 7 – Esquema de montagem do experimento. t0, t4, t7, t14 e t21 indicam os dias de coleta de *headspace* e de solo. P1, P2 E P3 representam os pontos amostrados nas áreas. As setas indicam os refluxos de atmosfera interna nos frascos. Os frascos Controle (C) receberam os 3 refluxos de atmosfera interna, porém foram sacrificados somente ao final do experimento (t21)

Com a finalidade de recuperar o DNA do solo uma repetição de cada ponto contendo 10% de metano foi sacrificada, sendo os frascos abertos em fluxo laminar para evitar contaminação e o conteúdo transferido para tubos de polipropileno estéreis sendo centrifugados a 10.000rpm a 4° C por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e do pellet foi realizada a extração de DNA genômico.

A determinação das concentrações de CH₄ nas amostras foi realizada por cromatografia gasosa no Laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA/USP).

O equipamento utilizado foi um SRI 8610C GAS CHROMATOGRAPH (SRI Instruments). O equipamento utiliza como gás de arraste o N₂, sendo as análises realizadas a 81°C com duração de 3 minutos e meio, com tempo de retenção do metano por volta de 2 minutos.

2.3.5 Extração de DNA genômico total do solo

Para as extrações de DNA das amostras de solo, utilizou-se o PowerLyzer PowerSoil DNA Extraction™ (MoBIO Laboratories) e as instruções fornecidas pelo fabricante foram seguidas com algumas modificações, conforme descrito a seguir:

De cada amostra, foram adicionados 250 mg de solo em tubo de 2 mL contendo microesferas de vidro (Glass Tube 0,1 mm). Em seguida, foram pipetados 750 µL de Bead Solution e o tubo foi agitado brevemente. Foram acrescentados 60 µL da solução C1, o tubo foi invertido várias vezes e, então, preso ao adaptador do Vortex-Genie 2 (MoBIO Laboratories, Carlsbad, CA) e agitado por 15 min à velocidade máxima. Após a agitação, o tubo foi centrifugado a 10.000 × g por 3 min. Após essa etapa, 450 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, ao qual foram adicionados 250 µL da solução C2. Para homogeneização, o tubo foi vortexado por 5 s e posteriormente incubado a 4°C por 5 min. A seguir, centrifugou-se a 10.000 × g por 1 min e 600 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo. A solução C3 foi adicionada (200 µL) com breve agitação e a mistura foi novamente incubada a 4°C por 5 min. Logo depois, realizou-se a centrifugação a 10.000 × g por 1 min e 750 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo. Neste, foram colocados 1200 µL da solução C4 e procedeu-se uma breve agitação. Após essa etapa, foram carregados 675 µL da solução numa coluna com filtro, disposta sobre um novo tubo. O conjunto foi centrifugado a 10.000 × g por 1 min, o líquido filtrado pela coluna foi descartado, o restante da solução foi carregado na coluna e o processo foi repetido. Depois, adicionou-se 500 µL da solução C5 na coluna e centrifugou-se a 10.000 × g por 30 segundos. O líquido que passou pelo filtro foi descartado e o tubo foi novamente centrifugado com a coluna vazia por mais 1 minuto a 10.000 × g. Após essa etapa, a coluna foi transferida para um novo tubo do kit e foram adicionados 100 µL da solução C6 no centro da mesma. Com a

centrifugação por 30 segundos a $10.000 \times g$ foi possível obter, por fim, o DNA da amostra.

Para a confirmação da qualidade da extração, uma alíquota de 5 μ l do DNA obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) corado com GelRed™ (Uniscience) em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004). Como padrão molecular foi utilizado 2 μ l de Low mass DNA Ladder (Invitrogen Technology). O gel foi submetido a um campo elétrico de 100 V por aproximadamente 40 minutos e, em seguida, foto-documentado.

O DNA extraído foi também quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermocientific), adotando-se a relação de 1,0 de densidade ótica a 260 nm (DO260) como sendo igual a 50 ng de DNA. μ L⁻¹ (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATS, 1989).

2.3.6 qPCR dos genes 16S rRNA *Bacteria* e *pmoA*

As reações de PCR quantitativo (qPCR) foram realizadas no sistema *StepOne Plus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) para os genes: 16S rRNA de *Bacteria* e *pmoA* (metanotróficas), tendo as condições estabelecidas nos respectivos trabalhos de referência dos *primers* com modificações quando necessário (Tabela 1). Ao final da reação foi incluída uma curva de *melting* nas seguintes condições 95°C por 15 s, a temperatura de anelamento do *primer* por 1 min e aumentada gradativamente, com leitura dos dados, a cada 0,7°C até 95°C.

Tabela 1 – *Primers* utilizados nas reações de qPCR com seus respectivos programas de amplificação

Gene	Primer	Sequência	Fragmento (pb)	Referência	Programa de amplificação
16S <i>Bacteria</i>	U968F	GAACGCGCAAGAACCTTAC	419	Heuer et al. (1997)	95°C – 5 min; 40 ciclos, 95°C – 15s, 56°C – 30s, 72°C – 45s
	1387R	GGGCGGWGTGTACAAGGC		Marchesi et al. (1998)	
<i>pmoA</i>	A189F	GGNGACTGGGACTTCTGG	491	Holmes et al. (1995)	95°C – 5 min; 42 ciclos, 95°C – 15s, 58°C – 30s, 72°C – 45s
	Mb661R	CCGGMGCAACGTCYTTACC		Costello; Lidstrom (1999)	

As curvas padrões foram obtidas, realizando amplificações com um número conhecido de cópias do DNA padrão diluído em série (1:10) dos produtos do 16S rRNA *Bacteria* e do gene funcional *pmoA*. Cada curva foi construída com base em cinco diluições. Desta maneira, os dados da amplificação do DNA extraído de amostras ambientais foram interpolados, para determinar o número de cópias do gene de interesse na amostra avaliada. Também foi colocada uma amostra como referencial entre as placas de mesmo gene para posterior equalização dos dados.

Todas as reações foram preparadas para um volume final de 10 µL, contendo concentrações finais de: 1X *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (2x) (Fermentas); 0,5 µM de cada *primer*; 1µL DNA total extraído, e completado com água desionizada estéril. Os valores de Cts, do inglês *cycle threshold*, foram utilizados para normalizar os dados obtendo as quantidades de DNA passíveis de amplificação de cada amostra.

Todas as reações, tanto as feitas com o DNA extraído das amostras de solo como aquelas em que se empregaram as diluições referentes às curvas-padrão, foram realizadas em triplicata (réplicas técnicas). O mesmo foi feito para os controles negativos, nos quais se utilizou água como molde em vez de DNA.

2.3.7 Processamento de dados

Os dados obtidos pela técnica de qPCR foram analisados no programa *StepOne Software v2.3* (Applied Biosystems) quanto a sua especificidade e eficiência. Os dados em que a especificidade foi confirmada pela análise das curvas de melting e eficiência entre 80% e 110% foram exportados para uma planilha eletrônica no programa *Microsoft Excel* (Microsoft). Na planilha, os dados de abundância de cada amostra foram convertidos em número de cópias do gene por grama de solo.

Para análise dos resultados foi utilizado os *softwares* estatísticos SAS 9.3 (SAS Institute), no qual foi analisada a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias. A análise das variâncias foi feita e, quando

significativa, seguida do teste de Tukey, para dados que seguiram os pressupostos dos testes paramétricos, e do teste de Kruskal-Wallis, para os demais.

2.4 Resultados e Discussão

2.4.1 Caracterização química das amostras de solo

Analisando a caracterização química dos solos coletados (Tabela 2) nota-se que o solo TPA Floresta apresenta as concentrações de matéria orgânica e carbono orgânico com maior valor dentre os quatros solos analisados. Considerando os teores de CTC e V%, esse solo apresentou os maiores teores, o que pode ser explicado pela presença de carbono pirogênico derivado de pirólise parcial, a qual é responsável pela produção de grupos carboxílicos ligados diretamente às estruturas aromáticas recalcitrantes (NOVOTNY et al., 2007), sendo esses grupos contribuintes para a elevada acidez total (CTC) desses materiais, acarretando na elevada fertilidade dos solos de Terra Preta da Amazônia. Segundo RONQUIM (2010), esse solo é caracterizado como fértil, por apresentar valor de V% $\geq 50\%$. A presença do carvão pirogênico pode ser associada aos teores mais elevados de carbono orgânico no solo de TPA Floresta, uma vez que esses solos apresentam elevado estoque de carbono (BERNOUX et al., 1998) pelo fato de a matéria orgânica, também com teores elevados nesse solo, funcionarem como um grande reservatório de C no solo, promovendo o aumento do sequestro de carbono no solo (TEIXEIRA, 2007).

O teor de V% inferior a 50 % observado no solo ADJ Floresta, coincidem com as características dos solos da região amazônica, que em sua grande maioria apresentam baixa fertilidade natural e acidez elevada (VIEIRA, 1975; SANCHEZ, COCHRANE, 1980), sendo a baixa fertilidade associada à avançada idade geológica do solo dessa região (MEIRELLES FILHO, 2004).

Os teores de fósforo (P) mais elevados nos solos TPA Floresta e TPA Cultivado são considerados um dos elementos mais significativos da ocupação humana, sendo atribuídos às cinzas originárias de fogueiras, ossos de peixe e

outros animais, fezes, urina e cascos de tartarugas (SMITH, 1980). Os teores de Nitrogênio, Carbono e Cálcio também são componentes comuns à ocupação humana.

Os solos adjacentes refletem as características climáticas do ambiente tropical, onde a temperatura e pluviosidade elevada favorecem os processos de hidrólise e lixiviação (KÄMPF; KERN, 2005), o que pode ser observado pelos teores menores de alguns nutrientes nos solos ADJ Floresta e ADJ Cultivado.

Tabela 2 – Caracterização química dos Solos Terra Preta da Amazônia e Adjacente, coletados na Estação Experimental Caldeirão, em Iranduba – AM.

	pH	M. O.	C. O.	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC	V	m	B	Cu	Fe	Mn	Zn	P	S-SO ⁴
		g/dm ³		mmolc.dm ⁻³							%		mg.dm ⁻³						
TPA-FLORESTA	5,3	65,7	38,0	1,2	85,3	14,0	<1	40,3	100,7	141,2	71,3	0,0	0,2	0,6	191,3	12,2	6,7	91,0	<4
TPA-CULTIVADO	4,0	30,7	17,7	0,7	9,7	3,0	8,3	75,3	13,5	88,9	15,3	40,0	0,1	0,5	115,7	4,8	2,6	69,0	<4
ADJ-FLORESTA	3,6	33,3	19,3	0,6	4,3	1,0	16,0	88,7	6,1	94,9	6,0	73,0	0,2	<0,3	241,0	1,9	0,3	12,0	<4
ADJ-CULTIVADO	4,1	30,7	17,7	0,7	12,7	6,7	3,0	54,7	20,3	74,8	27,7	13,7	0,2	<0,3	250,3	1,8	0,6	7,3	14,0

TPA: Terra Preta da Amazônia; **ADJ:** Solo Adjacente. **M.O.:** matéria orgânica; **C.O.:** carbono orgânico; **H+Al:** acidez potencial; **SB:** soma de bases; **CTC:** capacidade de troca catiônica; **V:** saturação da CTC por bases; **m:** Saturação por Alumínio. Valores médios de três repetições amostrais de cada área.

2.4.2 Avaliação do consumo de metano

O acompanhamento da concentração de metano na atmosfera dos microcosmos via cromatografia gasosa revela que os solos de TPA Floresta, TPA Cultivada e ADJ Floresta apresentaram consumo elevado de metano a partir do sétimo dia de experimento, após a segunda injeção de atmosfera nos frascos.

Verifica-se que o solo TPA Floresta (Figura 8) apresentou maior atividade metanotrófica, o que pode ser associado aos seus altos teores de matéria orgânica e carbono orgânico. O microcosmo controle apresentou pequena produção de metano até o quarto dia de experimento, porém esse comportamento não foi observado novamente no decorrer do experimento. Esse foi o solo que apresentou maior teor de oxidação, assim como observado em outros estudos com solos de florestas tropicais (VERCHOT et al., 2000; VELDKAMP et al., 2008; ZHANG et al., 2008; DÖRR et al., 2010).

Figura 8 - Avaliação de consumo de metano nos microcosmos de Terra Preta Floresta. As setas indicam os refluxos da atmosfera interna dos frascos. As barras se referem ao desvio padrão

Para o solo TPA Cultivado (Figura 9) foi observada atividade metanotrófica a partir do sétimo dia de experimento (T7), porém o consumo não foi tão elevado quanto ao observado no solo TPA Floresta. Analisando as concentrações do microcosmo TPA Cultivado Controle nota-se atividade de produção de metano nas três injeções, no entanto, essa produção é pouco expressiva comparando a queda de concentração acentuada observada nos microcosmos com adição de metano.

Figura 9 - Avaliação de consumo de metano nos microcosmos de Terra Preta Cultivada. As setas indicam os refluxos da atmosfera interna dos frascos. As barras se referem ao desvio padrão

Os microcosmos de ADJ Floresta (Figura 10) com adição de 10% de metano na atmosfera apresentaram comportamento semelhante aos de TPA Cultivado, porém o microcosmo Controle (ADJ Floresta Controle) apresentou produção de metano somente na primeira injeção, sendo que na segunda injeção houve atividade metanotrófica e na terceira injeção a concentração desse gás se manteve praticamente constante.

Figura 10 - Avaliação de consumo de metano nos microcosmos de Adjacente Floresta. As setas indicam os refluxos da atmosfera interna dos frascos. As barras se referem ao desvio padrão

Diferentemente dos outros microcosmos, os que continham solo ADJ Cultivado (Figura 11) não apresentaram atividade metanotrófica elevada, sendo mais observada na terceira injeção, isto é, a partir do décimo quarto dia de

experimento. Seu microcosmo controle (ADJ Cultivado Controle) apresentou produção de metano nas duas primeiras injeções e consumo na terceira, portanto, esse foi o único solo que não respondeu expressivamente ao enriquecimento analisando os dados de cromatografia. Priemé et al. (1997) mostraram que as taxas de oxidação de CH_4 necessitam de mais de cem anos para atingir os níveis observados antes do início do cultivo, podendo justificar o comportamento observado nos frascos contendo solo adjacente cultivado, com conversão da mudança do solo há aproximadamente 30 anos.

Figura 11 - Avaliação de consumo de metano nos microcosmos de Adjacente Cultivado. As setas indicam os refluxos da atmosfera interna dos frascos. As barras se referem ao desvio padrão

2.4.3 Extração do DNA total do solo

Foram realizadas extrações de DNA total para todos os solos recuperados dos microcosmos sacrificados nos tempos t0, t4, t7, t14 e t21 e dos frascos controle (C). No total foram realizadas 72 extrações e os produtos quantificados em espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermocientific), com resultados apresentados na Figura 12. Observa-se que as amostras de solo TPA Floresta apresentaram maior rendimento e os ADJ Floresta e ADJ Cultivado compartilharam valores médios mais baixos na maioria dos tempos amostrados.

Figura 12 – Quantificação em Nanodrop 2000c das extrações de DNA total do solo logo após a instalação do experimento (t0) e nos dias quatro (t4), sete (t7), quatorze (t14) e vinte e um (t21) de incubação. As barras se referem ao desvio padrão

2.4.4 Análise comparativa de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para os genes 16S rRNA *Bacteria* e *pmoA*

Comparando as quantificações dos genes 16S rRNA *Bacteria* e *pmoA* utilizando as amostras de solo coletadas no tempo inicial do experimento (Figura 13), observa-se que em ambos o número de cópias do gene por grama de solo a área de Terra Preta da Amazônia com cobertura de Floresta (TPA-FLO) apresentaram maiores valores, ademais, quando comparadas as médias dos solos, estatisticamente, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), esse solo apresentou diferença estatística com relação aos outros solos para ambos os genes, constatou-se um gradiente entre os solos, TPA-FLO > TPA-CUL > ADJ-FLO > ADJ-CUL.

As quantificações do gene *pmoA* indicam que a comunidade metanotrófica foi influenciada pela cobertura vegetal e tipo de solo, assim como observado no estudo realizado por Lima; Muniz; Dumont (2014), modificando o gradiente em TPA-FLO > ADJ-FLO > TPA-CUL > ADJ-FLO.

Figura 13 – Quantificação em qPCR para os genes 16S rRNA *Bacteria* e *pmoA* nos solos Terra Preta da Amazônia e Adjacentes. **TPA-FLO**: Terra Preta da Amazônia Floresta, **TPA-CUL**: Terra Preta da Amazônia Cultivada; **ADJ-FLO**: Adjacente Floresta; **ADJ-CUL**: Adjacente Cultivado. Os dados foram obtidos no tempo inicial (t0) do experimento, representando as comunidades originais dos solos. Os valores representam as médias e as barras o desvio padrão. As médias encontradas em um mesmo dia de análise que diferiram significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) estão acompanhadas de letras diferentes

Analisando a alteração da comunidade ao longo do experimento, nota-se que para o solo de Terra Preta da Amazônia Floresta (TPA-FLO) (Figura 14) a comunidade bacteriana não sofreu diferenciação quando analisada estatisticamente através do teste de Tukey ($P < 0,05$). No entanto, analisando a quantificação do gene *pmoA*, observa-se que a comunidade sofreu alteração em resposta ao enriquecimento atmosférico com metano dos frascos a partir do sétimo dia (t7) de experimento. Comparando com a curva de consumo de metano observado via cromatografia gasosa, nota-se que o aumento na comunidade metanotrófica (gene *pmoA*) está associado a diminuição da concentração de metano na atmosférica dos frascos, sendo esse o solo que apresentou maior consumo de CH₄ e maior número de microrganismos responsáveis pela oxidação do metano tanto no tempo inicial do experimento (t0) como também no tempo final (t21).

Figura 14 – Quantificação em qPCR para os genes 16S rRNA *Bacteria* e *pmoA* no solo Terra Preta da Amazônia Floresta (**TPA-FLO**). Os dados foram obtidos nos tempos 0 (t0), 4 (t4), 7 (t7), 14 (t14) e 21 (t21) do experimento. Os valores representam as médias e as barras o desvio padrão. As médias encontradas em um mesmo dia de análise que diferiram significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) estão acompanhadas de letras diferentes

O solo de Terra Preta da Amazônia Cultivada também apresentou alteração da comunidade metanotrófica em resposta ao enriquecimento atmosférico com metano (Figura 15), sendo essa diferenciação observada na quantificação das amostras do décimo quarto dia de experimento (t14), porém o número de cópias do gene *pmoA* nos tempos finais do experimento, t14 e t21, apresentam quantificações menores que ao encontrado no solo TPA Floresta, indicando que a mudança na uso do solo afeta a abundância dessas comunidades.

Figura 15 – Quantificação em qPCR para os genes 16S rRNA *Bacteria* e *pmoA* no solo Terra Preta da Amazônia Cultivada (**TPA-CUL**). Os dados foram obtidos nos tempos 0 (t0), 4 (t4), 7 (t7), 14 (t14) e 21 (t21) do experimento. Os valores representam as médias e as barras o desvio padrão. As médias encontradas em um mesmo dia de análise que diferiram significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) estão acompanhadas de letras diferentes

A abundância da comunidade metanotrófica no solo Adjacente Floresta (ADJ-FLO) para o gene *pmoA*, apresentada na Figura 16, releva que essa comunidade respondeu diferentemente dos solos de TPA Floresta e TPA Cultivada, indicando que o tipo de solo influencia na abundância desses microrganismos. O mesmo comportamento observado nos solos TPA para o gene 16S rRNA Bacteria foi observado, não apresentando variação estatisticamente na quantificação desse gene em todos os tempos do experimento.

Figura 16 – Quantificação em qPCR para os genes 16S rRNA *Bacteria* e *pmoA* no solo e Adjacentes Floresta (**ADJ-FLO**). Os dados foram obtidos nos tempos 0 (t0), 4 (t4), 7 (t7), 14 (t14) e 21 (t21) do experimento. Os valores representam as médias e as barras o desvio padrão. As médias encontradas em um mesmo dia de análise que diferiram significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) estão acompanhadas de letras diferentes

As quantificações do gene 16S rRNA *Bacteria* do solo Adjacente Cultivado (ADJ-CUL) mostram que não houve alterações estatística nessa comunidade, o que também foi observado para o gene *pmoA*. Resultados que podem ser associados aos resultados observados na quantificação da concentração de metano na atmosfera dos frascos, onde não foi observado o comportamento de dreno de metano, podendo ser explicado pelo fato de que a conversão da cobertura vegetal de floresta para atividade agrícola afeta negativamente a taxa de oxidação de CH₄ (JENSEN; OLSEN, 1998).

Figura 17 – Quantificação em qPCR para os genes 16S rRNA *Bacteria* e *pmoA* no solo Adjacente Cultivado (**ADJ-CUL**). Os dados foram obtidos nos tempos 0 (t0), 4 (t4), 7 (t7), 14 (t14) e 21 (t21) do experimento. Os valores representam as médias e as barras o desvio padrão. As médias encontradas em um mesmo dia de análise que diferiram significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) estão acompanhadas de letras diferentes

Nos microcosmos controle de cada solo nota-se que a quantidade de cópias de ambos os genes permaneceu semelhante ao encontrado nas amostras de tempo inicial, indicando que sem a adição de metano na atmosfera a comunidade metanotrófica não seria estimulada somente com a adição de meio de cultivo NMS, utilizado para o cultivo e enriquecimento de bactérias metanotróficas (MARTINEAU; WHYTE; GREER, 2010).

3 CONCLUSÕES

O solo Terra Preta da Amazônia se mostrou um potencial dreno de CH₄ atmosférico. No geral, estes solos apresentaram maior abundância das comunidades bacterianas e metanotróficas, o que refletiu no maior consumo de metano.

Comparando as respostas dos solos com floresta (TPA Floresta e ADJ Floresta) e cultivados (TPA Cultivada e ADJ Cultivado), notou-se uma menor variação da abundância da comunidade metanotrófica presente nestes últimos, o que pode indicar que alteração do uso do solo afeta a capacidade do mesmo em retirar metano da atmosfera.

Os solos Adjacentes apresentaram resposta diferente dos solos de TPA, indicando que a história de formação, ocupação e uso do solo também influenciam na capacidade do solo em drenar o metano da atmosfera.

REFERÊNCIAS

- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington DC, v. 59, p.143-169, 1995.
- AMANN, R.I.; LUDWING, W. Ribosomal RNA-Targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **Microbiology Reviews**, New York, v. 24, p. 555-565, 2001.
- ANKLAM, E.; GADANI, F.; HEINZE, P.; PIJNENBURG, H.; VAN DEN EEDE, G. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 214, n. 1, p. 3-26, 2002.
- BARRETO, R.C.; MADARI, B.E.; MADDOCK, J.E.L.; MACHADO, P.L.O.A.; TORRES, T.; FRANCHINI, J.; COSTA, A.R. The impact of soil management on aggregation, carbon stabilization and carbon loss as CO₂ in the surface layer of a Rhodic Ferralsol in Southern Brazil. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 132, p. 243-251, 2009.
- BENSON, D.A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J. ; OSTELL, J.; WHEELER, D. L. GenBank. **Nucleic Acids Research**, London, v. 33, p. 34-38, 2005.
- BERNOUX, M.; CERRI, C.; ARROUAYS, D.; JOLIVET, C.; VOLKOFF, B. Bulk densities of Brazilian Amazon soils related to other soil properties. **Soil Science Society of America Journal**, Baltimore, v. 62, p 743-749, 1998.
- BIRKENMEYER, L.G.; MUSHAHWAR, I.K. DNA probe amplification methods. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 35, n. 2, p. 117-126, 1991.
- BOECKX, P.; VAN CLEEMPUT, O.; VILLARALVO, I. Methane emission from a landfill and the methane oxidising capacity of its covering soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 28, n. 10-11, p. 1397-1405, 1996.
- BOGNER, J.; SPOKAS, K.; BURTON, E.; SWEENEY, R.; CORONA, V. Landfills as atmospheric methane sources and sinks. **Chemosphere**, Oxford, v. 31, n. 9, p.4119-4130, 1995.
- BOWMAN, J. The methanotrophs - the families *Methylococcaceae* and *Methylocystaceae*. In: _____ **The prokaryotes**. Springer, New York, 2006. p. 266-289.
- BOWMAN, J.P.; SLY, L.I.; NICHOLS, P.D.; HAYWARD, A.C. 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**, Ames., v. 43, p. 735–753, 1993.
- BRODY, J.R.; KERN, S.E. Sodium boric acid: Atriz-less, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, New York, v. 36, p. 214-216, 2004.

CANNAVAN, F.S. **Diversidade das comunidades bacterianas em solos de terra preta antropogênica da Amazônia Central e Oriental**. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) - Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, 2007.

CHRISTOPHERSEN, M. Lateral gas transport in soil adjacent to an old landfill: factors governing emissions and methane oxidation. **Waste Management and Research**, London, v. 19, p. 126-143, 2001.

COLE, J.R.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; MCGARRELL, D.M.; TIEDJE, J.M. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. **Nucleic Acids Research**, London, v. 35(supl 1), D169-D172, 2007.

COPLEY, J. Ecology genes underground. **Nature**, London, v. 406, p.452-454, 2000.

CORREIA, F.W.S.; LIEBEREI, R. Agroclimatological information about the experimental Weld of the SHIFT-area, ENV 23, 42, 45, 52. In: SHIFT WORKSHOP, 3., 1998, Manaus. **Proceedings...** Manaus; Berlin: BMBF, 1998. p. 389-396.

COSTELLO, A.M.; LIDSTROM, M.E. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 5066-5074, 1999.

CURY, J.C. **Diversidade de Bacteria e Archaea em solos de mangue e marisma**. 2006. 147p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

DÖRR N.; GLASER B.; KOLB S. Methanotrophic communities in Brazilian ferralsols from naturally forested, afforested, and agricultural sites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 4, p. 1307-1310, 2010.

FALESI, I.C. **O estado atual dos conhecimentos sobre os solos da Amazônia Brasileira** (Parte I) Zoneamento Agrícola da Amazônia. **Boletim técnico IPEAN**, Belém, v. 54, p. 17-67, 1972.

FEIGL, B.J. ; FERNANDES, S.A.P. ; BERNOUX, M. ; PICCOLO, M.C. 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**, Amsterdam, v. 107, n. 3/4, p. 227-241, 2002.

FOLEY J.A.; DEFRIES, R.; ASNER G.P.; BARFORD, C.; BONAN, G.; CARPENTER, S.R.; CHAPIN, F.S.; COE, M.T.; DAILY, G.; GIBBS, H.K.; HELKOWSKI, J.H.; HOLLOWAY, T.; HOWARD, E.A.; KUCHARIK, C.J.; MONFREDA, C.; PATZ, J.A.; PRENTICE, I.C.; RAMANKUTTY, N.; SNYDER, P.K. Global Consequences of land use. **Science**, Washington, v. 309, p. 570-574, 2005.

GARCÍA-ORENES, F.; MORUGÁN-CORONADO, A.; ZORNOZA, R.; SCOW, K. Changes in Soil Microbial Community Structure Influenced by Agricultural Management Practices in a Mediterranean Agro-Ecosystem. **PloS one**, San Francisco, v. 8, n. 11, e80522, 2013.

GAŠPARIČ, M.B.; TENGS, T.; LA PAZ, J.L.; HOLST-JENSEN, A.; PLA, M.; ESTEVE, T.; ŽEL, J.; GRUDEN, K. Comparison of nine different real-time PCR

chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 396, n. 6, p. 2023-2029, 2010.

GLASER, B.; GUGGENBERGER, G.; HAUMAIER, L.; ZECH, W. Persistence of soil organic matter in archaeological soils (Terra Preta) of the Brazilian Amazon region. In: REES, R.M.; BALL, B.C.; CAMPBELL, C.D.; WATSON, C.A. (Ed). **Sustainable management of soil organic matter**. Wallingford: CAB International, 2000. p. 190-194.

GLASER, B.; HAUMAIER, L.; GUGGENBERGER, G.; ZECH, W. The "Terra Preta" phenomenon: a model for sustainable agriculture in the humid tropics. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 88, p. 37-41, 2001.

HANSON, R.S.; HANSON, T.E. Methanotrophic Bacteria. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 60, n.2, p. 439-471, 1996.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoresis separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Nature Biotechnology**, New York, v. 11, p. 1026-1030, 1993.

HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin v. 33, p 265-278, 2004.

HOLMES, A.J.; COSTELLO, A.; LIDSTROM, M.E.; MURREL, J.C. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 132, p. 203-208, 1995.

JENSEN, S.; OLSEN, R.A. Atmospheric methane consumption in adjacent arable and forest soil systems. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford. v. 30, n. 8, p. 1187-1193, 1998.

JESUS, E.C.; MARSH T.L.; TIEDJE J.M.; MOREIRA, F.M.S. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **The ISME journal**, London, v. 3, n. 9, p. 1004-1011, 2009.

KÄMPF, N.; KERN, D.C. O solo como registro da ocupação humana pré-histórica na Amazônia. **Tópicos em ciência do solo. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 4, p. 277-320, 2005.

KENNEDY, A.C.; SMITH, K. L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. **Plant and soil**, Dordrecht, v. 170, n. 1, p. 75-86, 1995.

KERN, D. C., KÄMPF, N. Antigos assentamentos indígenas na formação de solos com terra preta arqueológica na região de Oriximiná. Pará. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, Campinas, v. 13, p. 219-225, 1989.

KIGHTLEY, D.; NEDWELL, D.B. Capacity for methane oxidation in landfill cover soils measured in laboratory-scale soil microcosm. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 2, p. 592-601, 1995.

KLEINMAN, P.J.; PIMENTEL, D.; BRYANT, R.B. The ecological sustainability of slash-and-burn agriculture. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 52, p. 235-249, 1995.

LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.R.; BÜLL, R.C. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M.; SILVA, A.P.; CARDOSO, E.J.; (Org.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. v.4. p.43-84.

LE MER, J.; ROGER, P. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 37, p. 25-50, 2001.

LEHMANN, J.; DA SILVA JR, J.P.; STEINER, C.; NEHLS, T.; ZECH, W.; GLASER, B. Nutrient availability and leaching in an archaeological Anthrosol and a Ferralsol of the Central Amazon basin: fertilizer, manure and charcoal amendments. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 249, n. 2, p. 343-357, 2003.

LIANG, B.; LEHMANN, J.; SOHI, S.P.; THIES, J.E.; O'NEILL, B.; TRUJILLO, L.; LUIZÃO, F.J. Black carbon affects the cycling of non-black carbon in soil. **Organic Geochemistry**, Oxford, v. 41, n. 2, p. 206-213, 2010.

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**, Lausanne, v.5, p.550, 2014.

LUESKEN, F.A.; ZHU B.; VAN-ALEN T. A.; BUTLER, M.K.; RODRIGUEZ-DIAZ, M.; SONG, B.; OP-DEN-CAMP, H.J.M.; JETTEN, M.S.M.; ETTWIG, K.F. pmoA primers for detection of anaerobic methanotrophs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, p. 3877-3880, 2011.

MARCHESI, J.R.; SATO, T.; WEIGHTMAN, A.J.; MARTIN, T.A.; FRY, J.C.; HIOM, S.J.; DYMOCK, D.; WADE, W.G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 2, p. 795-799, 1998.

MARSH, T.L. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 2, n. 3, p. 323-327, 1999.

MARTINEAU, C.; WHYTE, L.; GREER, C. Stable Isotope Probing Analysis of the Diversity and Activity of Methanotrophic Bacteria in Soils from the Canadian High Arctic. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 17, p. 5773-5784, 2010.

McCANN, J.M.; WOODS, W.I.; MEYER, D.W. Organic matter and anthrosols in Amazonia: interpreting the Amerindian legacy. In: REES, R.M.; BALL, B.C.; CAMPBELL, C.D.; WATSON, C.A. (Ed.). **Sustainable management of soil organic matter**. Wallingford, UK: CAB International, 2001. p. 180-189.

McDONALD, I.R.; BODROSSY, L.; CHEN, Y.; MURRELL, J.C. Molecular ecology techniques for the study of aerobic methanotrophs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 5, p. 1305-1315, 2008.

McDONALD, I.R.; RADAJEWSKI, S.; MURRELL, J.C. Stable isotope probing of nucleic acids in methanotrophs and methylotrophs: A review. **Organic Geochemistry**, Oxford, 36, p. 779-787, 2005.

MEIRELLES-FILHO, J. **O livro de ouro da Amazônia**. Rio de Janeiro; Ediouro, 2004. 397p.

MULLIS, K.B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. **Annales de Biologie Clinique**, Paris, v. 48, n. 8, p. 579-582, 1990.

MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current opinion in microbiology**, London, v. 2, n. 3, p. 317-322, 1999.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 73, n. 1, p. 127-141, 1998.

NEVES-JUNIOR, A.F. **Qualidade física de solos com horizonte antrópico (Terra Preta Antropogênica) na Amazônia Central**. 2008. 94. Tese (Doutorado em Agronomia: Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F.F. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Anápolis, V.33, p. 10-13, 2004.

NOVOTNY, E.H.; DE AZEVEDO, E.R.; BONAGAMBA, T.J.; CUNHA, T.J.F.; MADARI, B.E.; BENITES, V.M.; HAYES, M.H.B. Studies of the Compositions of Humic Acids from Amazonian Dark Earth Soils. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 41, n. 2, p. 400-405, 2007.

PRIEMÉ A.; CHRISTENSEN S.; DOBBIE K. E.; SMITH K.A. Slow increase in rate of methane oxidation in soils with time following land use change from arable agriculture to woodland. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 1269–1273, 1997.

RAEYMAEKERS, L. Basic principles of quantitative PCR. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 15, n. 2, p. 115-122, 2000.

RANJARD, L; POLY, F; LATA, J-C; MOUGEL, C; THIOULOUSE, J; NAZARET, S. Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints: Biological and Methodological Variability. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 10, p. 4479-4487, 2001.

RONQUIM, C.C. **Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais**. Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2010. 26p. (Embrapa Monitoramento por Satélite, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 8)

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. p 1.25-1.30,

SANCHEZ, P.A.; COCHRANE, T.T. Soil constraints in relation to major farming systems in tropical America. **Priorities for Alleviating Soil-Related Constraints to Food Production in Tropics**. International Rice Research Institute, Los Baños, 1980. p. 107-139.

SCHMIDT, M.W.I.; NOACK, A.G. Black carbon in soils and sediments: analysis, distribution, implications, and current challenges. **Global Biochemical Cycles**, Washington, DC, v. 14, p. 777-793, 2000.

SKJEMSTAD, J.O.; CLARKE, P.; TAYLOR, J.A.; OADES, J.M.; MCCLURE, S.G. The chemistry and nature of protected carbon in soil. **Australian Journal of Soil Research**, Lismore, v. 34, p. 251-271, 1996.

SMITH, N.G.H. Anthrosols and human carrying capacity in Amazonia. **Annals of the Association of American Geographers**, Washington, v. 70, p. 553-566, 1980.

SOMBROEK, W.G. Amazon land forms and soils in relation to biological diversity. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 30, p. 81-100, 2000.

SOMBROEK, W.G.; RUIVO, M.L.; FEARNside, P.M.; GLASER, B.; LEHMANN, J. Amazonian Dark Earths as carbons stores and sinks. In: LEHMANN, J.; KERN, D. C.; GLASER, B.; WOODS, W.I. (Ed.). **Amazonia Dark Earths: origin, properties & management**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. 125-139p.

STREIT, W.R.; DANIEL, R.; JAEGER, K-E. Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, London, 15, p. 285-290, 2004.

SWIFT, R.S. Sequestration of carbon by soil. **Soil Science**, Baltimore, v. 166, p. 858-871, 2001.

TAMM, C.O. Nitrogen in terrestrial ecosystems: questions of productivity, vegetational changes, and ecosystem stability. **Nitrogen in terrestrial ecosystems: questions of productivity, vegetational changes, and ecosystem stability**, n. Ecological Studies Vol. 81 **Springer**, Berlin, 1991.

TEIXEIRA, W.G.O manejo de solos pelas populações pré-Colombianas na Amazônia Brasileira: vestígios deixados nas Terras Pretas de Índio e Terras Mulatas In: REUNIÃO AMAZÔNICA DE AGROECOLOGIA, 2007, Manaus. Agroecologia no contexto Amazônico: palestras, relatos de experiências. **Resumos...** Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental. 2007. p.47 – 55.

THANGARAJAN, R.; BOLAN, N.S.; TIAN, G.; NAIDU, R.; KUNHIKRISHNAN, A. Role of organic amendment application on greenhouse gas emission from soil. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 465, p. 72-96, 2013.

THE WORLD BANK. Indicator – Data. Disponível em: <<http://data.worldbank.org/indicator>>. Acesso em: 06 jan. 2014.

THEISEN, A.R.; ALI, M.H.; RADAJEWSKI, S.; DUMONT, M.G.; DUNFIELD, P.F.; McDONALD, I.R.; DEDYSH, S.N.; MIGUEZ, C.B.; MURRELL, J.C. Regulation of methane oxidation in the facultative methanotroph *Methylocella silvestris* BL2. *Mol Microbiol. Molecular Microbiology*, Oxford, v. 58, n. 3, p. 682-692, 2005.

TIEDJE, J.M.; ASUMING-BREMPONG, S.; NUSSLEIN, K.; MARSH, T.L.; FLYNN, S.J. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v. 13, p.109-122, 1999.

TORSVIK, V.; GOKSØYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 56, n. 3, p.782-787, 1990.

TRINGE, S.G.; RUBIN, E.M. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. *Nature Reviews Genetics*, London, v. 6, n. 11, p. 805-814, 2005.

TSAI, S.M.; CANNAVAN, F.S. ; SILVA Jr., J.P.; CHAVES, M.G.; PASSIANOTO, C. C.; BORGES, C.P. Diversidade bacteriana em Terra Preta Antropogênica baseada em seqüenciamento do gene 16S rRNA. Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 29, 2003. Ribeirão Preto. **Resumos...**São Paulo, 2003.

TSAI, S.M.; O'NEILL, B.; CANNAVAN, F.S.; SAITO, D; FALCÃO, N.P.S; KERN, D. C.; FROSSMAN, J.; THIES, J.. The microbial world of Terra Preta. In: WOODS, W.I.; TEIXEIRA, W.G.; LEHMANN, J.; STEINER, C.; REBELLATO, L. (Ed.) **Amazonian Dark Earths: Wim Sombroek's Vision**. Berlin: Springer Science, 2009.

VELDKAMP, E.; PURBOPUSPITO, J.;CORRE, M.D.; BRUMME, R.;MURDIYARSO, D. Land use change effects on trace gas fluxes in the forest margins of Central Sulawesi, Indonesia. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, Washington v.113(G2), p.2005–2012, 2008.

VERCHOT L, V.; DAVIDSON, E.A.; CATTÂNIO ,J.H.; ACKERMAN, I.L. Land-use change and biogeochemical controls of methane fluxes in soils of Eastern Amazonia. *Ecosystems*, New York, v. 3, n. 1, p. 41-56, 2000.

VIEIRA, L.S. **Manual da ciência do solo**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1975. 464p,

VISVANATHAN, C. Methanotrophic activities in tropical landfill cover soils: effects of temperature, moisture content and methane concentration. *Waste Management and Research*, London, v. 17, p. 313-323, 1999.

WARDLE, D.A.; ZACKRISSON, O.; NILSSON, M.C. The charcoal effect in Boreal forests: mechanisms and ecological consequences. *Oecologia*, Berlin, v. 115, p. 419-426, 1998.

ZEISS, C.A. Accelerated methane oxidation cover system to reduce greenhouse gas emissions from MSW landfills in cold, semi-arid regions. *Water, Air and Soil Pollution*, Dordrecht, v. 176, p. 285-306, 1996.

ZHANG, W.; MO, J.; ZHOU, G.; GUNDERSEN, P.; FANG, Y.; LU, X. Methane uptake responses to nitrogen deposition in three tropical forests in southern China. **Journal of geophysical research. Atmospheres** : JGR, Washington. v. 113, n. D11, 2008.

ANEXOS

ANEXO A

Meio de Cultura NMS (Nitrate mineral salts)

Reagentes	Quantidade
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0g
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,20g
Solução de Ferro Quelado*	2,0ml
KNO_3	1,0g
Solução Traço de Metais **	0,5ml
KH_2PO_4	0,272 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0,717 g
Água destilada deionizada	1,0 L

Ajustar o pH a 6.8. Autoclavar as soluções em frascos separados. Adicionar as soluções, já estéreis, misturando com movimentos suaves a cada adição.

* Solução de Ferro Quelado

Reagentes	Quantidade
Cloreto de Ferro III	0,5g
EDTA	0,2g
HCl concentrado	0,3ml
Água destilada deionizada	100,0ml

Em um frasco com tampa, misturar os reagentes a água Milli-Q, e esterilizar a solução por filtração através de sistema Millipore com membrana 22µm, e acondicionar em frasco envolvido com papel alumínio e a temperatura ambiente.

**** Solução Traço de Metais**

Reagentes	Quantidade
FeSO₄.7H₂O	20,0 mg
ZnSO₄. 7 H₂O	1,0 mg
H₃BO₃. 4 H₂O	3,0 mg
MnCl₂. 7 H₂O	0,3 mg
CoCl₂. 6 H₂O	2,0 mg
CaCl₂. 2 H₂O	0,1 mg
NiCl₂. 6 H₂O	0,2 mg
Na₂MoO₄. 2 H₂O	0,3 mg
Água Milli-Q	100mL

Em um frasco com tampa, misturar os reagentes a água Milli-Q, e esterilizar em autoclave. Acondicionar em frasco envolvido com papel alumínio e a temperatura ambiente.