

**Universidade de São Paulo**  
**Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**  
**Centro de Energia Nuclear na Agricultura**  
**Laboratório de Biologia Celular e Molecular**

**Genes funcionais do ciclo biogeoquímico do metano em áreas de  
floresta e pastagem na Amazônia**

**Jéssica Adriele Mandro**

Monografia apresentada para obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

**Piracicaba**  
**2018**



**Jéssica Adrielle Mandro**  
**Graduanda no curso de Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas pela**  
**ESALQ/USP**

**Genes funcionais do ciclo biogeoquímico do metano em áreas de floresta e  
pastagem na Amazônia**

Orientadora:  
Profa. Dra. **TSAI SIU MUI**

Monografia apresentada para obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

**Piracicaba**  
**2018**



## **Dedicatória**

*Dedico este trabalho aos meus pais queridos, Nivaldo e Leonice, por serem pessoas excelentes, por me incentivarem a nunca desistir, por todo o amor incondicional, por confiarem em mim.*



## **Agradecimentos**

Agradeço, primeiramente, a Deus, por esse momento, por todas as coisas que vivi e por todos os ensinamentos da vida.

Aos meus pais queridos, Nivaldo e Leonice, que me mostraram sempre o melhor caminho a seguir e moldaram o meu ser, desde pequenina, da forma mais bonita: com muito amor verdadeiro. Agradeço a vocês, pai e mãe, por toda ajuda, paciência, carinho e dificuldades que enfrentaram para que eu pudesse sonhar e ser capaz. Eu sou o que sou por tê-los, por isso, a minha vida eu devo a vocês.

Ao meu querido irmão, Júnior, por ter me ajudado em diversas etapas da graduação, sempre me fazendo rir e me deixando mais feliz com a sua presença.

Ao meu amor, Vinícius, por ser uma das pessoas mais maravilhosas que conheço, por estar sempre ao meu lado, me ajudando, cuidando de mim e me levantando nos momentos mais difíceis. Agradeço por ter tornado a graduação mais leve, por ter estudado tantas provas comigo, por ter enfrentado tantos problemas ao meu lado. Nessa nova etapa de nossas vidas, agradeço, principalmente, por me demonstrar tanto amor, fazer-me mais forte e feliz.

Eu amo vocês imensamente.

À minha orientadora, querida Profa. Dra. Tsai Siu Mui, por ter acreditado em mim, nos meus sonhos e ter me proporcionado a chance de poder realizá-los. Agradeço por todos os ensinamentos, conselhos, ajuda, preocupações e cuidados que teve comigo. Sua orientação foi extremamente importante para o meu desenvolvimento acadêmico e pessoal.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Aline, Andressa, Júlia, Fernanda, Mariley, Alexandre, Luís, Lucas W., Miriam, Bia, Leandro F., Leandro L., Fabi e Caio, por todo incentivo e carinho que sempre tiveram comigo.

A todos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular.

Todos vocês foram muito importantes para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu aprimoramento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de Iniciação Científica concedida (Processo 2015/23758-1).





*“Há uma grandeza nessa noção da vida, com seus vários poderes, tendo sido originada por um sopro do Criador em algumas poucas formas ou em apenas uma; e que, 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**



## RESUMO

### **Genes funcionais do ciclo biogeoquímico do metano em áreas de floresta e pastagem na Amazônia**

A Bacia Amazônica é recoberta pela maior floresta tropical existente, na qual aproximadamente 15% de sua cobertura original foi substituída por áreas destinadas a suprir a crescente demanda por alimentos, em um processo que altera as propriedades físicas, químicas e biológicas originais do solo. A diversidade do solo é constituída, principalmente, por microrganismos dos domínios *Archaea* e *Bacteria*, necessários ao funcionamento dos ecossistemas terrestres pelo seu papel na ciclagem de nutrientes e nos ciclos biogeoquímicos. Contudo, o uso antrópico do solo tem o potencial de alterar a estrutura e funcionamento da microbiota e, consequentemente, esses processos. Dentre eles, o fluxo de gás metano ( $\text{CH}_4$ ), o segundo gás mais importante do efeito estufa, do solo para a atmosfera apresenta grande importância por estar diretamente relacionado aos atributos da comunidade microbiana do solo. Seu fluxo é regulado por microrganismos metanogênicos, arqueias produtoras de metano; e metanotróficos, bactérias consumidoras desse gás, que diferenciam-se de acordo com suas características ecológicas e bioquímicas únicas. Nesse contexto, a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR), que permite o cálculo da quantidade inicial de genes de interesse em amostras ambientais, pode ser utilizada para detectar, quantificar e monitorar temporalmente as comunidades de organismos metanogênicos, pela análise do gene *mcrA*, e metanotróficos, pelo genes *pmoA* e *mmoX*. Assim, o objetivo do projeto de pesquisa é determinar o efeito do uso do solo sobre a abundância de comunidades de *Archaea* e *Bacteria*, com ênfase em genes funcionais associados ao ciclo do metano, em áreas de floresta, floresta secundária e pastagem no estado do Pará, na Amazônia Oriental.

**Palavras-chave:** Ciclo biogeoquímico do metano. Ecologia microbiana. Mudança de uso do solo. PCR quantitativo em tempo real.



## ABSTRACT

### **Functional genes of the biogeochemical cycle of methane in areas of forest and pasture in the Amazon**

The Amazon Basin is covered by the largest existing rainforest, in which approximately 15% of its original cover was replaced by areas for supply the growing demand for food, in a process that changes the physical, chemical and biological soil characteristics. The soil diversity is mainly composed of microorganisms of domains *Archaea* and *Bacteria*, required for the functioning of terrestrial ecosystems for their role in nutrient cycling and biogeochemical cycles. However, the anthropic use of soil have the potential to alter the microbiota structure and function and, consequently, these processes. Among them, the flow of methane (CH<sub>4</sub>), the second most important greenhouse gas, from the soil to the atmosphere presents high importance because it is directly related to the attributes of soil microbial community. Its flow is mainly controlled by methanogens, methane-producing archaea; and methanotrophic, bacteria that consume the same gas, which differ according to their unique ecological and biochemical characteristics. In this context, the quantitative real-time PCR (qPCR), which allows the calculation of the initial quantity of genes of interest in environmental samples, can be used to detect, quantify and temporally monitor the communities of methanogenic organisms, through the analysis of *mcrA* gene, and methanotrophic, through the analysis of *pmoA* and *mmoX* genes. The objective of the research project is to determine the land-use effect on the abundance of *Archaea* and *Bacteria* communities, with emphasis on functional genes related to biogeochemical cycling of methane in forest, secondary forest and pasture areas in the state of Pará, in the eastern Amazon.

**Keywords:** Biogeochemical cycle of methane. Microbial ecology. Change of land use. Quantitative real time PCR;



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. Revisão de literatura.....	18
2.1 Bioma Amazônia e processos de mudança do uso da terra.....	18
2.2 Solo e microbiota associada.....	19
2.3 Microrganismos metanogênicos e metanotróficos.....	20
2.4 PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	22
3. Objetivos.....	23
3.1 Objetivos gerais.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4. Material e métodos.....	24
4.1 Coleta e processamento das amostras de solo.....	24
4.2 Caracterização das propriedades físico-químicas das amostras de solo.....	25
4.3 Extração do DNA total das amostras de solo.....	25
4.4 Quantificação do DNA genômico extraído.....	26
4.5. PCR quantitativo em tempo real dos genes.....	27
4.5.1 Construção de curvas padronizadas para a técnica de PCR quantitativo em tempo real.....	27
4.5.1.1 Construção de curvas padronizadas para o gene 16S rRNA de <i>Bacteria</i> .....	27
4.5.1.2 Construção de curvas padronizadas para gene 16S rRNA de <i>Archaea</i> .....	28
4.5.1.3 Construção de curvas padronizadas para o gene <i>mcrA</i> .....	28
4.5.1.4 Construção de curvas padronizadas para o gene <i>pmoA</i> .....	29
4.5.1.5 Construção de curvas padronizadas para o gene <i>mmoX</i> .....	30
4.5.2 PCR quantitativo em tempo real dos genes estudados.....	31
4.5.2.1 PCR quantitativo em tempo real do gene 16S rRNA de <i>Bacteria</i> .....	31
4.5.2.2 PCR quantitativo em tempo real do gene 16S rRNA de <i>Archaea</i> .....	31
4.5.2.3 PCR quantitativo em tempo real do gene <i>mcrA</i> .....	32
4.5.2.4 PCR quantitativo em tempo real do gene <i>pmoA</i> .....	32
4.5.2.5 PCR quantitativo em tempo real do gene <i>mmoX</i> .....	33
4.6 Análises estatísticas.....	33
4.6.1 Análises estatísticas dos dados físico-químicos.....	33
4.6.2 Processamento dos dados de PCR quantitativo em tempo real e análises estatísticas.....	34

5. Resultados e discussão.....	34
5.1 Coleta e processamento das amostras de solo.....	34
5.2 Caracterização das propriedades físico-químicas das amostras de solo.....	34
5.3 Extração do DNA total das amostras de solo.....	36
5.4 Quantificação do DNA genômico extraído.....	37
5.5 PCR quantitativo em tempo real dos genes.....	39
5.5.1 PCR quantitativo em tempo real do gene 16S rRNA de <i>Bacteria</i> .....	39
5.5.2 PCR quantitativo em tempo real do gene 16S rRNA de <i>Archaea</i> .....	39
5.5.3 PCR quantitativo em tempo real do gene <i>mcrA</i> .....	39
5.5.4 PCR quantitativo em tempo real do gene <i>pmoA</i> .....	40
5.5.5 PCR quantitativo em tempo real do gene <i>mmoX</i> .....	40
5.6 Análises estatísticas.....	40
5.6.1 Análises estatísticas dos dados físico-químicos.....	40
5.6.2 Processamento dos dados de PCR quantitativo em tempo real e análises estatísticas.....	41
5.6.2.1 Quantificações dos genes por qPCR.....	42
5.6.3 Coeficiente de correlação.....	45
5.6.3.1 Nitrogênio.....	47
5.6.3.2 pH.....	48
5.6.3.3 Densidade do solo.....	49
5.6.4 Abundância dos genes.....	50
5.6.4.1 Abundância de bactérias e arqueias.....	50
5.6.4.2 Abundância de microrganismos metanotróficos e metanogênicos.....	50
5.6.5. Discussão.....	51
6. Considerações finais.....	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57





## 1. INTRODUÇÃO

A Bacia Amazônica é recoberta pela maior floresta tropical existente, na qual aproximadamente 15% de sua cobertura original foi substituída por áreas destinadas à agropecuária (NEPSTAD et al., 1999; SOARES-FILHO et al., 2006). Os processos de mudança de uso do solo originam-se da necessidade de suprir a crescente demanda mundial por alimentos (NEPSTAD et al., 1999; SOARES-FILHO et al., 2006). Contudo, estes processos alteram as propriedades físico-químicas originais do solo e, conseqüentemente, a sua diversidade (WANG et al., 2012), constituída principalmente por microrganismos dos domínios *Archaea* e *Bacteria* (TORSVIK; GOKSØYR; DAAE, 1990). Ambos os grupos respondem rapidamente a esses processos, de forma a compor uma importante ferramenta para a análise da qualidade desses ambientes e propiciar parâmetros comparativos entre os mesmos (GARCÍA-ORENES et al., 2013; JOHNSON; LEE; SCOW, 2003).

A microbiota do solo, além de ser substancialmente grande e diversa, é intrinsicamente necessária aos demais ecossistemas terrestres, pois está intimamente associada à ciclagem de nutrientes e aos ciclos biogeoquímicos (JOHNSON; LEE; SCOW, 2003; KENNEDY; PAPENDICK, 1995). Contudo, o uso antrópico do solo tem o potencial de alterar o fluxo de gases do solo pelo seu efeito na estrutura e funcionamento da microbiota (ARONSON; ALLISON; HELLIKER, 2013). Desse modo, é de grande importância o estudo dos seus efeitos sobre os grupos microbianos que atuam dentro dos ciclos biogeoquímicos, no qual se destaca o ciclo do metano ( $\text{CH}_4$ ), o segundo mais importante gás do efeito estufa, com potencial de aquecimento 25 vezes maior do que o gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) (LELIEVELD et al., 1998).

O intercâmbio de metano do solo com a atmosfera e, conseqüentemente, a sua quantidade na mesma, é regulado por dois grupos de microrganismos: metanogênicos, microrganismos produtores de metano pertencentes ao domínio *Archaea*; e metanotróficos, microrganismos consumidores desse mesmo gás pertencentes ao domínio *Bacteria* (ARONSON; ALLISON; HELLIKER, 2013; GARCIA; PATEL; OLLIVIER, 2000; HANSON; HANSON, 1996). Dados indicam que, de todo o gás liberado para a atmosfera, cerca de 80% tem origem em processos biológicos (ALVALÁ; KIRCHHOFF; PAVÃO, 1999). O seu estudo é também de grande importância, pois a habilidade de ambos esses grupos em produzir ou consumir metano é considerada filogeneticamente conservada (MARTINY; TRESEDER; PUSCH, 2013),

e, assim, o estudo do seu ciclo é considerado mais relacionado com as características da comunidade microbiana como um todo do que qualquer outro processo biogeoquímico (SCHIMMEL; GULLEDGE, 1998).

A ocorrência e abundância de grupos microbianos de interesse presentes no solo podem ser analisadas com o uso da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Diferentemente da PCR tradicional, em que os produtos gerados podem apenas ser quantificados após o seu término (GINZINGER, 2002; HIGUCHI et al., 1993), a técnica de qPCR, metodologia derivada da PCR tradicional, utiliza corantes intercalantes, *primers* ou sondas fluorescentes que hibridizam com a sequência de interesse (GAŠPARIČ et al., 2010), de forma a permitir a amplificação e a quantificação dos produtos formados ao final de cada ciclo pela fluorescência emitida (GINZINGER, 2002). Nesse sentido, a técnica de qPCR permite o cálculo da quantidade inicial de genes de interesse em amostras ambientais de maneira rápida e precisa (GACHON; MINGAM; CHARRIER, 2004; GINZINGER, 2002; NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004) e, assim, possibilita monitorar temporalmente grupos taxonômicos e/ou funcionais de interesse (SMITH; OSBORN, 2009).

Os microrganismos dos domínios *Archaea* e *Bacteria* são comumente detectados e quantificados pelo gene 16S rRNA, segmento de DNA altamente conservado encontrado em todos os seus representantes (KIRK et al., 2004). Especificamente, os organismos metanogênicos podem ser detectados e quantificados pelo gene *mcrA* (RILEY et al., 2002); e os metanotróficos, pelos genes *pmoA* e *mmoX* (MCDONALD et al., 2008; MIGUEZ et al., 1997; LUESKEN et al., 2011). O uso da técnica de qPCR pode permitir a análise da abundância desses genes no solo e, consequentemente, possibilitar inferências a respeito do seu fluxo do gás metano. Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo determinar o efeito do uso do solo sobre a abundância de comunidades de *Archaea* e *Bacteria*, com ênfase em genes funcionais associados ao ciclo biogeoquímico do metano em áreas de floresta primária, floresta secundária e pastagem no estado do Pará, na Amazônia Oriental.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Bioma Amazônia e processos de mudança do uso da terra**

O bioma Amazônia é caracterizado pelo conjunto de ecossistemas florestais da Bacia Amazônica. Tal bioma possui, aproximadamente, 6.9 milhões de quilômetros quadrados distribuídos por nove países, sendo eles: Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela. O Brasil, neste contexto, possui cerca 5 milhões de quilômetros quadrados, constituindo a chamada Amazônia Legal ou Amazônia brasileira (RAISG, 2009).

As Florestas Tropicais, assim como a Floresta Amazônica, compreendem cerca de 7% da superfície terrestre do planeta e abrigam uma grande diversidade de espécies de plantas e animais (DIRZO; RAVEN, 2003). A Floresta Amazônica, nesse sentido, é considerada a maior floresta tropical do mundo, compreendendo, aproximadamente, 25% das espécies de plantas e animais terrestres conhecidas (VERCHOT, 2010; RODRIGUES et al., 2013). No entanto, estima-se que, aproximadamente, 15% de sua cobertura vegetal já tenha sido substituída por áreas destinadas à agropecuária (NEPSTAD et al., 1999; SOARES-FILHO et al., 2006).

Os processos de mudança de uso do solo originam-se da necessidade de suprir a crescente demanda mundial por alimentos (NEPSTAD et al., 1999; SOARES-FILHO et al., 2006). Na região amazônica, o desmatamento associado às mudanças do uso da terra e a manejos pode ser dividido em categorias de causas diretas ou próximas e causas subjacentes. Como demonstrado nos trabalhos de GEIST e LAMBIN (2001 e 2002), citado por RIVERO (2009), as categorias diretas de desmatamento, sustentadas por processos e demandas econômicas, incluem a expansão de pastagens e de áreas agricultáveis, estando ligadas às atividades de pecuária e à implementação de agricultura em larga escala e de corte e queima, respectivamente; além de extração da madeira e a expansão da infraestrutura. Já as causas subjacentes estão relacionadas a fatores associados à urbanização e ao aumento populacional. Todos esses fatores, que levam ao desmatamento e às mudanças do uso do solo, têm enorme influência nos ciclos biogeoquímicos dos solos tropicais (RIVERO et al., 2009).

A área de estudo deste trabalho foi a Floresta Nacional do Tapajós, localizada no estado do Pará, na Amazônia Oriental, sendo o Pará um dos estados com as maiores taxas de desmatamento da Amazônia brasileira (INPE, 2017). Assim, destaca-se a

importância dos estudos sobre as influências das mudanças antrópicas de uso do solo sobre as comunidades microbianas presentes nestes solos, com ênfase em solos amazônicos.

## **2.2 Solo e microbiota associada**

Os solos representam um recurso natural muito complexo, demonstrando um número quase infinito de combinações entre as suas características físicas, químicas e biológicas (FAO, 2018). Segundo o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (EMBRAPA, 2006), o solo é formado por um conjunto de corpos naturais, constituídos por partes sólidas, líquidas e gasosas, sendo tridimensionais, dinâmicos e constituídos por materiais minerais e orgânicos que ocupam a maior parte do manto superficial das extensões continentais do nosso planeta, além de conter matéria viva e estar sujeito a processos de alterações antrópicas.

Considerando este ambiente complexo, os solos podem ser considerados um dos ecossistemas mais diversos e importantes existentes no planeta (ROGER-ESTRADE et al., 2010). Tal diversidade está relacionada, principalmente, aos microrganismos presentes nestes solos, os quais representam a maior fonte de diversidade biológica nestes ambientes. (TORSVIK; GOKSØYR; DAAE, 1990).

A microbiota do solo, constituída principalmente por microrganismos dos domínios *Archaea* e *Bacteria* (TORSVIK; GOKSØYR; DAAE, 1990), desempenham processos fundamentais aos demais ecossistemas terrestres, na medida em que estão associados à ciclagem e à disponibilidade de nutrientes, estruturação do solo e também aos ciclos biogeoquímicos (JOHNSON; LEE; SCOW, 2003; KENNEDY; PAPENDICK, 1995).

A partir da literatura, sabe-se que a microbiota pode ser influenciada pelas condições e propriedades do solo, como pH, temperatura, umidade, aeração, compactação e disponibilidade de nutrientes. Contudo, as mudanças de uso do solo podem provocar severas alterações em suas propriedades físico-químicas originais e, desta forma, afetar tanto a estrutura das comunidades microbianas quanto os processos por elas realizados (LAUBER et al., 2008), além de provocar a diminuição da qualidade e da fertilidade dos solos (FOLEY et al., 2005) e influenciar as emissões de gases do efeito estufa (GEE).

Neste sentido, ambos os grupos microbianos mais diversos do solo, *Archaea* e *Bacteria*, respondem rapidamente a esses processos de alteração do uso do solo (GARBEVA; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004), de forma a compor uma importante ferramenta para a análise da qualidade desses ambientes e propiciar parâmetros comparativos entre os mesmos (GARCÍA-ORENES et al., 2013; JOHNSON; LEE; SCOW, 2003).

### **2.3 Microrganismos metanogênicos e metanotróficos**

Tendo em vista que os microrganismos do solo desempenham papéis importantíssimos para a manutenção dos demais ecossistemas terrestres, por suas atuações diretas na ciclagem de nutrientes, nos ciclos biogeoquímicos e nas demais atividades anteriormente citadas, estudos têm demonstrado que as comunidades microbianas afetadas pelo processo de mudança do uso da terra (GARCÍA-ORENES et al., 2013; JOHNSON; LEE; SCOW, 2003) têm sua estrutura e o seu funcionamento alterados, bem como os processos por elas mediados. Como exemplo, as alterações nas emissões e consumos dos gases do efeito estufa (GEE) mediados por grupos de microrganismos do solo (ARONSON; ALLISON; HELLIKER, 2013).

Assim, é de grande importância o estudo dos efeitos das mudanças do uso do solo sobre os grupos microbianos que atuam dentro dos ciclos biogeoquímicos. Neste contexto, destaca-se o ciclo biogeoquímico do metano ( $\text{CH}_4$ ), o segundo gás mais importante do efeito estufa, com potencial de aquecimento 25 vezes maior do que o do gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) (LELIEVELD et al., 1998), somado às suas emissões representarem mais de 70% do total de GEE emitidos mundialmente. Dessa forma, o gás metano mostra-se como um importante contribuinte ao efeito estufa e ao aquecimento global (IPCC, 2007).

O intercâmbio de metano do solo com a atmosfera e, consequentemente, a sua quantidade na mesma, é regulado por dois grupos de microrganismos: metanogênicos, microrganismos produtores de metano, pertencentes ao domínio *Archaea*; e metanotróficos, microrganismos consumidores desse mesmo gás, pertencentes ao domínio *Bacteria* (ARONSON; ALLISON; HELLIKER, 2013; GARCIA; PATEL; OLLIVIER, 2000; HANSON; HANSON, 1996). Dados indicam que, de todo o gás liberado para a atmosfera, cerca de 80% tem origem em processos biológicos (ALVALÁ; KIRCHHOFF; PAVÃO, 1999). O seu estudo é também de grande

importância, pois a habilidade de ambos esses grupos em produzir ou consumir metano é considerada filogeneticamente conservada (MARTINY; TRESEDER; PUSCH, 2013), e, assim, o estudo do seu ciclo é considerado mais relacionado com as características da comunidade microbiana como um todo do que qualquer outro processo biogeoquímico (SCHIMMEL; GULLEDGE, 1998).

As arqueias metanogênicas são capazes de produzir metano a partir de seu metabolismo em condições anaeróbicas, sendo encontradas em diversos ambientes e estando associadas à decomposição da matéria orgânica e/ou de atividades geoquímicas (ZINDER, 1993), podendo ser classificadas de acordo com o substrato e vias requeridas para a produção do metano (GARCIA; PATEL; OLLIVIER, 2000; HANSON; HANSON, 1996). Por outro lado, as bactérias metanotróficas, são reconhecidas pela habilidade de utilizar unicamente o metano como fonte de carbono para o seu metabolismo energético (WISE et al., 1999). A habilidade desse grupo em metabolizar o metano ocorre devido à presença das enzimas metano monoxigenases (MMO), enzimas responsáveis pela oxidação do metano, sendo reconhecidas na forma solúvel e particulada. As bactérias metanotróficas são denominadas do tipo II quando detentoras das enzimas metano monoxigenase solúvel (sMMO), sendo detectadas pelo gene marcador molecular *mmoX* (AUMAN; LIDSTROM, 2002); ou denominados do tipo I, quando detentoras da metano monoxigenase particulada (pMMO), que oxida metano em metanol, sendo detectadas pelo gene marcador molecular *pmoA* (TUOMIVIRTA et al., 2009).

Atualmente, os microrganismos dos domínios *Archaea* e *Bacteria* são comumente detectados e quantificados pelo gene 16S rRNA, segmento de DNA altamente conservado encontrado em todos os seus representantes (KIRK et al., 2004). O gene *mcrA* tem sido utilizado como marcador para detectar e quantificar os microrganismos metanogênicos (RILEY et al. 2002), uma vez que codifica uma subunidade alfa da coenzima metil-coenzima M redutase, uma coenzima essencial na metanogênese e exclusiva de arqueias metanogênicas (ARONSON et al., 2013). Enquanto isso, os genes *pmoA* e *mmoX* têm sido utilizados para detectar os microrganismos metanotróficos, que apresentam a enzima metano monoxigenase (MMO) em forma particulada (pMMO) ou solúvel (sMMO), respectivamente (MCDONALD et al., 2008; MIGUEZ et al., 1997; LUESKEN et al., 2011).

A avaliação do impacto dos diferentes usos da terra e manejos pode determinar quais as alterações que podem ocorrer na microbiota do solo, principalmente nos grupos

responsáveis biologicamente pelos processos de interesse, como a produção e consumo de GEE. Em adição, as funções exercidas pelas comunidades no solo e o conhecimento das suas interações com outros componentes da biodiversidade, como tipos de solos tropicais e mudanças de uso da terra, são importantes para o entendimento da dinâmica da ciclagem do metano em solos amazônicos. Assim, estudos sobre os efeitos das mudanças do uso da terra sobre as comunidades microbianas mostram-se muito importantes, na medida em que podem revelar formas de diminuir seus impactos ou até mesmo mitigá-los.

## **2.4 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)**

A técnica de PCR permite a geração exponencial de sequências de DNA a partir de sequências molde presentes em uma amostra. No entanto, a técnica de PCR convencional pode gerar produtos de interesse de forma variável entre as reações, demonstrando-se como uma metodologia insegura para estudos que envolvam o estabelecimento das quantidades iniciais das amostras, na medida em que, pela técnica de PCR convencional, os produtos de interesse são gerados após o término das reações, onde só assim poderão ser quantificados (GINZINGER, 2002).

Diferentemente da PCR tradicional, em que os produtos gerados podem apenas ser quantificados após o seu término (GINZINGER, 2002; HIGUCHI et al., 1993), a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR), metodologia derivada da PCR tradicional, utiliza corantes intercalantes, *primers* ou sondas fluorescentes que hibridizam com a sequência de interesse (GAŠPARIČ et al., 2010), de forma a permitir a amplificação e a quantificação dos produtos formados ao final de cada ciclo pela fluorescência emitida (GINZINGER, 2002). A determinação da quantidade inicial de sequências de interesse em uma amostra pode ser realizada de forma relativa ou absoluta. Para a determinação relativa, utiliza-se um gene de referência para o estabelecimento de comparação com a sequência de interesse (PFAFFAL, 2001); já para a determinação absoluta, utilizada neste trabalho, a quantificação é realizada por meio de uma curva padrão estabelecida com quantidades diferenciadas do gene de interesse (SMITH; OSBORN, 2009).

Neste sentido, os microrganismos dos domínios *Archaea* e *Bacteria* são comumente detectados e quantificados, por qPCR, por meio do gene 16S rRNA, segmento de DNA altamente conservado encontrado em todos os seus representantes



(KIRK et al., 2004). Especificamente, os organismos metanogênicos podem ser detectados e quantificados pelo gene marcador molecular *mcrA* (RILEY et al. 2002); e os metanotróficos, pelos genes marcadores moleculares *pmoA* e *mmoX* (MCDONALD et al., 2008; MIGUEZ et al., 1997; LUESKEN et al., 2011). Assim, pela técnica de qPCR permitir o cálculo da quantidade inicial de genes de interesse em amostras ambientais de maneira rápida e precisa (GACHON; MINGAM; CHARRIER, 2004; GINZINGER, 2002; NOVAIS; PIRES-ALVES; 2004), possibilita-se o monitoramento temporal de grupos taxonômicos e/ou funcionais de interesse (SMITH; OSBORN, 2009).

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivos gerais**

Determinar o efeito do uso do solo sobre a abundância de comunidades de *Archaea* e *Bacteria*, com ênfase em genes funcionais associados ao ciclo biogeoquímico do metano em áreas de floresta primária, floresta secundária e pastagem, no estado do Pará, na Amazônia Oriental.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Quantificar os genes 16S rRNA de *Archaea* e *Bacteria* pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR), em solos sob diferentes usos no período seco e chuvoso;
2. Quantificar os genes associados ao ciclo biogeoquímico do metano de microrganismos metanotróficos (*pmoA* e *mmoX*) e metanogênicos (*mcrA*), em solos sob diferentes usos no período seco e chuvoso;
3. Correlacionar a abundância dos genes analisados com o uso e as características físico-químicas das áreas de estudo, assim como o período de amostragem (seco ou chuvoso).

## 4. Material e métodos

### 4.1 Coleta e processamento das amostras de solo

O projeto de pesquisa foi conduzido na Floresta Nacional dos Tapajós (“km 67”, 54°58’W, 2°51’S) e seus adjacentes, localizada na Amazônia Oriental. A região possui a temperatura anual média de 26 °C e a precipitação anual de 2.150 mm. O Pará é um dos estados com uma das maiores taxas de desmatamento da Amazônia Brasileira (FERREIRA; VENTICINQUE; ALMEIDA, 2005). A Floresta Nacional dos Tapajós e seus adjacentes apresentam diferentes áreas cobertas por floresta primária, secundária e pastagens com diferentes idades.

A coleta de solo foi realizada em duas diferentes campanhas para a análise sazonal da microbiota: no período chuvoso (julho) e no período seco (novembro) do ano de 2015. A amostragem foi realizada em duas florestas primárias, duas florestas secundárias, com mais de 15 anos cada uma, e duas pastagens, com 10 e 20 anos, sendo que as áreas foram denominadas, apenas para fins de reconhecimento e diferenciação, como Floresta Primária 2 e Floresta Primária 5; Floresta Secundária 2 e Floresta Secundária 4; Pastagem 2 e Pastagem 3. Assim, a coleta foi realizada nas áreas de Florestas Primárias 2 (2° 51.306’ S 54° 57.453’ W) e 5 (3° 17.787’ S 54° 57.806’ W), nas áreas de Florestas Secundárias 2 (3° 15.466’ S, 54° 53.320’ W) e 4 (3° 15.799’ S 54° 53.600’ W) e nas áreas de Pastagens 2 (com 10 anos, 3°18.832’S, 54°54.585’W) e 3 (com 20 anos, 3°07.881’S, 54°57.469’W).

Em cada área, a coleta foi realizada em um transecto de cinco pontos, separados por 50 metros cada. Em cada ponto, a camada de serapilheira foi retirada. O solo foi coletado em cinco subpontos na camada entre 0 a 10 cm. Após a coleta, o material foi transportado para o Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). O solo de cada subponto de um mesmo ponto foi homogeneizado e separado em duas partes. A primeira, foi congelada a -80 °C em ultra freezer e posteriormente utilizada para extrair o DNA total do solo, enquanto a segunda foi armazenada em câmara fria a 4 °C para posterior caracterização das propriedades físico-químicas das amostras.

## 4.2 Caracterização das propriedades físico-químicas das amostras de solo

O solo coletado de cada ponto foi enviado para o Laboratório de Análises Químicas do Departamento de Ciência do Solo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP) para a determinação das propriedades químicas pH em  $\text{CaCl}_2$  0,01 mol/L, fósforo (P) pelo método colorimétrico extraído com resina trocadora de íons, enxofre (S) pela determinação por turbidimetria e extração com fosfato de cálcio 0,01 mol/L, potássio (K) pela extração com resina trocadora de íons e determinação em espectrofotômetro de emissão atômica, cálcio (Ca) e magnésio (Mg) pela extração com resina trocadora de íons e determinação em espectrofotômetro de absorção atômica, alumínio trocável (Al) pelo método colorimétrico extraído com cloreto de potássio 1 mol/L, acidez potencial (H+Al) extraído com tampão SMP (Manual de análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. IAC, 2001), boro (B) pela extração com água quente e determinação por 7 colorimetria, cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e ferro (Fe) pela extração com DTPA e determinação por espectrofotometria de absorção atômica (Manual de análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. IAC, 2001), nitrogênio (N) total extraído pelo método de Kjeldahl; para os cálculos soma de bases trocáveis (SB), capacidade de troca de cátions (CTC); saturação da CTC por bases (V) e saturação por alumínio (m); para a determinação das propriedades físicas areia total, silte, argila.

## 4.3 Extração do DNA total das amostras de solo

O DNA total do solo de cada ponto foi extraído em duplicata com o *PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit* (MoBio Laboratories), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Para isso, foram adicionadas 250 mg do solo de cada amostra em tubos de 2 mL com microesferas de vidro (*Glass Bead Tubes* 0,1 mm). Em cada tubo, foram adicionados 750  $\mu\text{L}$  de *Bead Solution*. Os tubos foram invertidos fracamente. A seguir, foram acrescentados 60  $\mu\text{L}$  da Solução C1 em cada tubo. Os tubos foram invertidos, agitados na velocidade máxima por 15 minutos no *MoBio Vortex* (MoBio Laboratories) e centrifugados a  $10.000 \times g$  por 3 minutos na centrífuga *Eppendorf 5417C* (Eppendorf), utilizada em todas as etapas subsequentes. O sobrenadante de cada tubo foi transferido para um tubo de 1,5 mL (*Collection Tube*), ao qual foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  da Solução C2. Os tubos foram vortexados por 5

segundos, incubados a 4 °C por 5 minutos e centrifugados a  $10.000 \times g$  por 1 minuto. Foram transferidos 600  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cada amostra para outro tubo e adicionados 200  $\mu\text{L}$  da Solução C3. Os tubos foram vortexados, incubados a 4 °C por 5 minutos e centrifugados a  $10.000 \times g$  por 1 minuto. Depois, foram transferidos 750  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cada amostra para outro tubo e adicionados 1200  $\mu\text{L}$  da Solução C4. Os tubos foram vortexados por 5 segundos. Foram transferidos 675  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cada tubo para uma coluna com filtro (*Spin Filter*), inserida em outro tubo. Os tubos foram centrifugados a  $10.000 \times g$  por 1 minuto e o líquido de cada tubo foi descartado. Mais 675  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cada tubo foram transferidos para a mesma coluna utilizada anteriormente. Os tubos foram centrifugados a  $10.000 \times g$  por 1 minuto e o líquido restante de cada tubo foi descartado. O procedimento foi repetido novamente até o término do sobrenadante de cada tubo. Após essa etapa, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  da Solução C5 em cada tubo. Os tubos foram centrifugados a  $10.000 \times g$  por 30 segundos e o sobrenadante foi descartado. Os tubos foram novamente centrifugados a  $10.000 \times g$  por 1 minuto. Cada coluna foi transferida para um novo tubo, no qual foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da Solução C6. Por fim, os tubos foram centrifugados a  $10.000 \times g$  por 30 segundos.

#### 4.4 Quantificação do DNA genômico extraído

A qualidade das amostras de DNA que foram extraídas foi inicialmente conferida em eletroforese por gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, em tampão TSB (do inglês *Sodium Borate Buffer*) (BRODY; KERN, 2004). Para o gel, foram utilizados 5  $\mu\text{L}$  de DNA adicionados de 3  $\mu\text{L}$  de *Loading Buffer* por amostra. Nos dois primeiros poços de cada gel foram utilizados 2  $\mu\text{L}$  dos marcadores de peso molecular de *Low mass* e 100pb. Após, o gel foi submetido a um campo elétrico de 100 V por aproximadamente 45 minutos e, posteriormente, foto-documentado. A qualidade e quantidade das amostras também foram analisadas em espectrofotômetro *Nanodrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific) com densidade ótica de 260 nm. Para esta análise foram utilizados 2  $\mu\text{L}$  do reagente C6 do *PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit* (MoBio Laboratories), sendo este o branco, e 2  $\mu\text{L}$  de cada amostra para a quantificação e determinação da qualidade do DNA.

## 4.5 PCR quantitativo em tempo real dos genes

### 4.5.1 Construção de curvas padronizadas para a técnica de PCR quantitativo em tempo real

#### 4.5.1.1 Construção de curvas padronizadas para o gene 16S rRNA de *Bacteria*

Foram desenvolvidas curvas padronizadas do gene 16S rRNA de *Bacteria*, para a quantificação da comunidade microbiana do domínio *Bacteria*, a partir de isolado obtido no DSMZ (German collection of microorganisms and cell cultures). Para a construção da curva, realizou-se a amplificação do gene 16S rRNA de *Bacteria*, por PCR convencional, utilizando os seguintes conjuntos de *primers*: 926f (5'-AACTCAAAGGAATTGACGG-3') (LANE, 1991) e 1062r (5'-CTCACRRCACGAGCTGAC-3') (ALLEN et al., 2005). O PCR de cada amostra foi preparado contendo 2,5 µL de 10X PCR Buffer; 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM; 0,5 µL de dNTP; 1 µL de cada *primer* 5 pmol/µL, 0,35 µL de BSA 20 mg/mL (Thermo Fisher Scientific), 0,20 U *Platinum Taq DNA Polymerase* (Life Technologies); 1 µL de DNA e H<sub>2</sub>O ultrapura esterilizada para completar 25 µL. Foram utilizadas as seguintes condições de amplificação no termociclador *Gene Amp PCR System 9700* (Life Technologies): 95°C por 15 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 60 °C por 15 segundos e 72°C por 20 segundos. A qualidade do produto amplificado foi inicialmente conferida em eletroforese por gel de agarose 1%, corado com GelRed™, em tampão TSB (do inglês *Sodium Borate Buffer*) (BRODY; KERN, 2004). Para o gel, foram utilizados 5 µL de DNA adicionados de 3 µL de *Loading Buffer* por amostra. Nos dois primeiros poços de cada gel foram utilizados 2 µL dos marcadores de peso molecular de *Low mass* e 100pb. Após, o gel foi submetido a um campo elétrico de 100 V por aproximadamente 45 minutos e, posteriormente, foto-documentado. A qualidade e quantidade do produto também foram analisadas em espectrofotômetro *Nanodrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific) com densidade ótica de 260 nm. Para esta análise, foram utilizados 2 µL do reagente C6 do *PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit* (MoBio Laboratories), sendo este o branco e 2 µL de cada amostra para a quantificação e determinação da qualidade. Utilizando o produto amplificado foram desenvolvidas curvas com 10<sup>5</sup> a 10<sup>9</sup> cópias do gene 16S rRNA de *Bacteria* para quantificação absoluta das amostras.

#### 4.5.1.2 Construção de curvas padronizadas para gene 16S rRNA de *Archaea*

Foram desenvolvidas curvas padronizadas do gene 16S rRNA de *Archaea*, para a quantificação da comunidade microbiana do domínio *Archaea*, por meio da amplificação do gene 16S rRNA *Archaea*, a partir de isolado ambiental obtido no laboratório. Para a construção da curva, realizou-se a amplificação do gene 16S rRNA de *Archaea*, utilizando os seguintes conjuntos de *primers*: Arc787F (5'-ATTAGATACCCSBGTAGTCC -3') e Arc1059R (5'-GCCATGCACCCWCCTCT -3') (YU et al., 2005). O PCR de cada amostra foi preparado contendo 2,5 µL de 10X PCR Buffer; 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM; 0,5 µL de dNTP; 1 µL de cada *primer* 5 pmol/µL, 0,25 µL de BSA 20 mg/mL (Thermo Fisher Scientific), 0,20 U *Platinum Taq DNA Polymerase* (Life Technologies); 1 µL de DNA e H<sub>2</sub>O ultrapura esterilizada para completar 25 µL. Foram utilizadas as seguintes condições de amplificação no termociclador *Gene Amp PCR System 9700* (Life Technologies): 95 °C por 10 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos e 72 °C por 50 segundos. A qualidade do produto amplificado foi inicialmente conferida em eletroforese por gel de agarose 1%, corado com GelRed™, em tampão TSB (do inglês *Sodium Borate Buffer*) (BRODY; KERN, 2004). Para o gel, foram utilizados 5 µL de DNA adicionados de 3 µL de *Loading Buffer* por amostra. Nos dois primeiros poços de cada gel foram utilizados 2 µL dos marcadores de peso molecular de *Low mass* e 100pb. Após, o gel foi submetido a um campo elétrico de 100 V por aproximadamente 45 minutos e, posteriormente, foto-documentado. A qualidade e quantidade do produto também foram analisadas em espectrofotômetro *Nanodrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific) com densidade ótica de 260 nm. Para esta análise foram utilizados 2 µL do reagente C6 do *PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit* (MoBio Laboratories), sendo este o branco e 2 µL de cada amostra para a quantificação e determinação da qualidade. Utilizando o produto amplificado foram desenvolvidas curvas com 10<sup>3</sup> a 10<sup>7</sup> cópias do gene 16S rRNA de *Archaea* para quantificação absoluta das amostras.

#### 4.5.1.3 Construção de curvas padronizadas para o gene *mcrA*

Foram desenvolvidas curvas padronizadas do gene *mcrA*, para a quantificação dos microrganismos metanogênicos a partir de isolado obtido no DSMZ (German collection of microorganisms and cell cultures). Para a construção da curva, realizou-se

a amplificação, por PCR convencional, do gene *mcrA* utilizando o seguinte conjunto de *primers*: Mlas-F (5'-GGYGGTGTMGDDTTCACMCARTA-3') (ANGEL; CLAUS e CONRAD, 2012) e *mcrA*-R (5'-CGTTCATBGCGTAGTTVGGRTAGT -3') (STEIMBERG e REGAN, 2008). O PCR de cada amostra foi preparado contendo 2,5 µL de 10X PCR Buffer; 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM; 0,5 µL de dNTP; 1 µL de cada *primer* 5 pmol/µL, 0,25 µL de BSA 20 mg/mL (Thermo Fisher Scientific), 0,20 U *Platinum Taq DNA Polymerase* (Life Technologies); 1 µL de DNA e H<sub>2</sub>O ultrapura esterilizada para completar 25 µL. Foram utilizadas as seguintes condições de amplificação no termociclador *Gene Amp PCR System 9700* (Life Technologies): 95 °C por 10 minutos; 45 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 45 segundos e 72 °C por 30 segundos. A qualidade do produto amplificado foi inicialmente conferida em eletroforese por gel de agarose 1%, corado com GelRed™, em tampão TSB (do inglês *Sodium Borate Buffer*) (BRODY; KERN, 2004). Para o gel, foram utilizados 5 µL de DNA adicionados de 3 µL de *Loading Buffer* por amostra. Nos dois primeiros poços de cada gel foram utilizados 2 µL dos marcadores de peso molecular de *Low mass* e 100pb. Após, o gel foi submetido a um campo elétrico de 100 V por aproximadamente 45 minutos e, posteriormente, foto-documentado. A qualidade e quantidade do produto também foram analisadas em espectrofotômetro *Nanodrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific) com densidade ótica de 260 nm. Para esta análise foram utilizados 2 µL do reagente C6 do *PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit* (MoBio Laboratories), sendo este o branco e 2 µL de cada amostra para a quantificação e determinação da qualidade. Utilizando o produto amplificado foram desenvolvidas curvas com 10<sup>1</sup> a 10<sup>7</sup> cópias do gene *mcrA* para quantificação absoluta das amostras.

#### 4.5.1.4 Construção de curvas padronizadas para o gene *pmoA*

Foram desenvolvidas curvas padronizadas do gene *pmoA*, para a quantificação dos microrganismos metanotróficos, a partir de isolado obtido no DSMZ (German collection of microorganisms and cell cultures). Para a construção da curva realizou-se a amplificação, por PCR convencional, do gene *pmoA* utilizando o seguinte conjunto de *primers*: A189F (GGNGACTGGGACTTCTGG) (HOLMES et al., 1999) e MB661r (CCGGMGCAACGTCYTAAAC) (COSTELLO; LIDSTROM, 1999). O PCR de cada amostra foi preparado contendo 2,5 µL de 10X PCR Buffer; 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM; 0,5 µL de dNTP; 1 µL de cada *primer* 5 pmol/µL, 0,25 µL de BSA 20 mg/mL (Termo

Fisher Scientific), 0,20 U *Platinum Taq DNA Polymerase* (Life Technologies); 1 µL de DNA e H<sub>2</sub>O ultrapura esterilizada para completar 25 µL. Foram utilizadas as seguintes condições de amplificação no termociclador *Gene Amp PCR System 9700* (Life Technologies): 95 °C por 10 minutos; 45 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos. A qualidade do produto amplificado foi inicialmente conferida em eletroforese por gel de agarose 1%, corado com GelRed™, em tampão TSB (do inglês *Sodium Borate Buffer*) (BRODY; KERN, 2004). Para o gel, foram utilizados 5 µL de DNA adicionados de 3 µL de *Loading Buffer* por amostra. Nos dois primeiros poços de cada gel foram utilizados 2 µL dos marcadores de peso molecular de *Low mass* e 100pb. Após, o gel foi submetido a um campo elétrico de 100 V por aproximadamente 45 minutos e, posteriormente, foto-documentado. A qualidade e quantidade do produto também foram analisadas em espectrofotômetro *Nanodrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific) com densidade ótica de 260 nm. Para esta análise foram utilizados 2 µL do reagente C6 do *PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit* (MoBio Laboratories), sendo este o branco e 2 µL de cada amostra para a quantificação e determinação da qualidade. Utilizando o produto amplificado foram desenvolvidas curvas com 1 a 10<sup>5</sup> cópias do gene *pmoA* para quantificação absoluta das amostras.

#### 4.5.1.5 Construção de curvas padronizadas para o gene *mmoX*

Foram desenvolvidas curvas padronizadas do gene *mmoX*, para a quantificação dos microrganismos metanotróficos, a partir de isolado obtido no DSMZ (German collection of microorganisms and cell cultures). Para a construção da curva realizou-se a amplificação, por PCR convencional, do gene *mmoX* utilizando o seguinte conjunto de *primers*: *mmoX1* (5'- CGGTCCGCTGTGGAAGGGCATGAAGCGCGT-3') e *mmoX2* (5'- GGCTCGACCTTGAAGTTGGAGCCATACTCG -3') (MIGUEZ et al., 1997). A PCR de cada amostra foi preparada contendo 2,5 µL de 10X PCR Buffer; 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM; 0,5 µL de dNTP; 1 µL de cada *primer* 5 pmol/µL, 0,35 µL de BSA 20 mg/mL (Thermo Fisher Scientific), 0,20 U *Platinum Taq DNA Polymerase* (Life Technologies); 1 µL de DNA e H<sub>2</sub>O ultrapura esterilizada para completar 25 µL. Foram utilizadas as seguintes condições de amplificação no termociclador *Gene Amp PCR System 9700* (Life Technologies): 95 °C por 10 minutos; 45 ciclos de 95 °C por 10 segundos, 66°C por 20 segundos e 72 °C por 30 segundos. A qualidade do produto amplificado foi inicialmente conferida em eletroforese por gel de agarose 1%, corado



com GelRed™, em tampão TSB (do inglês *Sodium Borate Buffer*) (BRODY; KERN, 2004). Para o gel, foram utilizados 5 µL de DNA adicionados de 3 µL de *Loading Buffer* por amostra. Nos dois primeiros poços de cada gel foram utilizados 2 µL dos marcadores de peso molecular de *Low mass* e 100pb. Após, o gel foi submetido a um campo elétrico de 100 V por aproximadamente 45 minutos e, posteriormente, fotodocumentado. A qualidade e quantidade do produto também foram analisadas em espectrofotômetro *Nanodrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific) com densidade ótica de 260 nm. Para esta análise foram utilizados 2 µL do reagente C6 do *PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit* (MoBio Laboratories), sendo este o branco e 2 µL de cada amostra para a quantificação e determinação da qualidade. Utilizando o produto amplificado foram desenvolvidas curvas com 1 a 10<sup>4</sup> cópias do gene *mmoX* para quantificação absoluta das amostras.

#### **4.5.2 PCR quantitativo em tempo real dos genes estudados**

##### **4.5.2.1 PCR quantitativo em tempo real do gene 16S rRNA de *Bacteria***

O gene 16S rRNA de *Bacteria* foi quantificado em triplicata pela técnica de PCR quantitativo em tempo real no equipamento *StepOne Plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). A técnica de qPCR foi realizada contendo 5 µL do *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Life Technologies™), 5 pmol de cada *primer*, 0,2 µL de BSA a 20 mg/mL (Thermo Fisher Scientific), 1,8 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura esterilizada e 1 µL de DNA a 10 ng/µL, gerando o volume final de 10 µL. Para este gene, foram utilizados os conjuntos de *primers* 926f (5'-AACTCAAAGGAATTGACGG-3') (LANE, 1991) e 1062r (5'- CTCACRRCACGAGCTGAC-3') (ALLEN et al., 2005). O programa utilizado no termociclador foi de 95 °C por 15 minutos; 40 ciclos de 95°C por 45 segundos, 60 °C por 15 segundos, 72°C por 20 segundos. Ao final foi incluída uma curva de *melting* com 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e 95 °C por 15 segundos com leitura de dados a cada 0,7 °C.

##### **4.5.2.2 PCR quantitativo em tempo real do gene 16S rRNA de *Archaea***

O gene 16S rRNA de *Archaea* foi quantificado em triplicata pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) no equipamento *StepOne Plus Real-Time PCR*

*System* (Applied Biosystems). A técnica de qPCR foi realizada contendo 5 µl do *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Life Technologies™), 5 pmol de cada *primer*, 0,2 µl de BSA a 20 mg/mL (Thermo Fisher Scientific), 1,8 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura esterilizada e 1 µl de DNA a 10 ng/µL, gerando o volume final de 10 µL. Para este gene, foram utilizados os conjuntos de *primers* Arc787F (5'- ATTAGATACCCSBGTAGTCC -3') e Arc1059R (5'- GCCATGCACCWCCTCT -3') (YU et al., 2005). O programa utilizado no termociclador foi de 95 °C por 10 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72 °C por 50 segundos. Ao final foi incluída uma curva de *melting* com 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e 95 °C por 15 segundos com leitura de dados a cada 0,7 °C.

#### 4.5.2.3 PCR quantitativo em tempo real do gene *mcrA*

O gene *mcrA* foi quantificado em triplicata pela técnica de PCR quantitativo em tempo real no equipamento *StepOne Plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). A técnica de qPCR foi realizada contendo 5 µl do *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Life Technologies™), 5 pmol de cada *primer*, 0,2 µl de BSA a 20 mg/mL (Thermo Fisher Scientific), 1,8 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura esterilizada e 1 µl de DNA a 10 ng/µL, gerando o volume final de 10 µL. Para este gene, foram utilizados os conjuntos de *primers* Mlas-F (5'-GGYGGTGTMGDDTTCACMCARTA-3') (ANGEL; CLAUS e CONRAD, 2012) e *mcrA-R* (5'-CGTTCATBGCGTAGTTVGGRTAGT-3') (STEIMBERG e REGAN, 2008). O programa utilizado no termociclador foi de 95 °C por 10 minutos; 45 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 45 segundos e 72 °C por 30 segundos. Ao final foi incluída uma curva de *melting* com 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e 95 °C por 15 segundos com leitura de dados a cada 0,5 °C.

#### 4.5.2.4 PCR quantitativo em tempo real do gene *pmoA*

O gene *pmoA* foi quantificado em triplicata pela técnica de PCR quantitativo em tempo real no equipamento *StepOne Plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). A técnica de qPCR foi realizada contendo 5 µl do *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Life Technologies™), 5 pmol de cada *primer*, 0,2 µl de BSA a 20 mg/mL (Thermo Fisher Scientific), 1,8 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura esterilizada e 1 µl de DNA a 10 ng/µL, gerando o volume final de 10 µL. Para este gene, foram utilizados os conjuntos de

*primers* A189F (GGNGACTGGGACTTCTGG) (HOLMES et al., 1999) e MB661r (CCGGMGCAACGTCYTAAAC) (COSTELLO; LIDSTROM, 1999). O programa utilizado no termociclador foi de 95 °C por 10 minutos; 45 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos. Ao final foi incluída uma curva de *melting* com 95 °C por 15 segundos, 58 °C por 1 minuto e 95 °C por 15 segundos com leitura de dados a cada 0,5 °C.

#### 4.5.2.5 PCR quantitativo em tempo real do gene *mmoX*

O gene *mmoX* de cada amostra foi quantificado em triplicata pela técnica de PCR quantitativo em tempo real no equipamento *StepOne Plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). A técnica de qPCR foi realizada contendo 5 µl do *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Life Technologies™), 5 pmol de cada *primer*, 0,2 µl de 11 BSA a 20 mg/mL (Thermo Fisher Scientific), 1,8 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura esterilizada e 1 µl de DNA a 10 ng/µL, gerando o volume final de 10 µL. Para este gene, foram utilizados os conjuntos de *primers* *mmoX1* (5'-CGGTCCGCTGTGGAAGGGCATGAAGCGCGT-3') e *mmoX2* (5'-GGCTCGACCTTGAACCTGGAGCCATACTCG-3') (MIGUEZ et al., 1997). O programa utilizado no termociclador foi de 95 °C por 10 minutos; 45 ciclos de 95 °C por 10 segundos, 66°C por 20 segundos e 72 °C por 30 segundos. Ao final foi incluída uma curva de *melting* com 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e 95 °C por 15 segundos com leitura de dados a cada 0,5 °C.

## 4.6 Análises estatísticas

### 4.6.1 Análises estatísticas dos dados físico-químicos

Os dados físico-químicos obtidos entre as diferentes áreas e diferentes épocas de amostragem foram testados quanto a sua normalidade, pelo teste de *Shapiro-Wilk*, e quanto a sua homogeneidade de variâncias no software *SigmaPlot* (San Jose, CA, USA). Uma vez que os dados seguiram os pressupostos dos testes não-paramétricos, foi realizado o teste de *Kruskal-Wallis*, a 5% de significância, utilizando a ferramenta estatística *ActionStat* (São Carlos, SP, BR). Realizou-se uma Análise de Componentes Principais (PCA) utilizando a ferramenta *ActionStat*.

#### **4.6.2 Processamento dos dados de PCR quantitativo em tempo real e análises estatísticas**

Os dados obtidos por meio da técnica de qPCR foram analisados no programa *StepOne Software v2.3* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) quanto a sua especificidade e eficiência. Os dados de abundância de cada amostra foram exportados para uma planilha *Excel* (Microsoft), onde foram transformados em número de cópias por nanograma de DNA. Os dados foram testados quanto a sua normalidade pelo teste de *Shapiro-Wilk* e sua homogeneidade de variâncias no software *SigmaPlot* (San Jose, CA, USA). Uma vez que os dados seguiram os pressupostos dos testes não-paramétricos, foi realizado o teste de *Kruskal-Wallis*, a 5% de significância, na ferramenta estatística *ActionStat* (São Carlos, SP, BR). As correlações entre os dados foram realizadas a partir do teste de *Spearman*, no software *SigmaPlot* (San Jose, CA, USA).

### **5. Resultados e discussão**

#### **5.1 Coleta e processamento das amostras de solo**

A coleta foi realizada em duas campanhas, no ano de 2015, em duas áreas de Florestas Primárias, duas Florestas Secundárias e duas Pastagens de diferentes idades, como citado anteriormente. As áreas sob o mesmo uso de solo foram utilizadas como réplicas biológicas neste estudo.

#### **5.2 Caracterização das propriedades físico-químicas das amostras de solo**

As propriedades físico-químicas do solo de cada área difeririam de acordo com os diferentes usos do solo (florestas primárias e secundárias e pastagens). As propriedades físicas do solo das amostras de cada área (Tabela 1) não difeririam entre as coletas, mas entre uma área para outra. As propriedades químicas do solo das amostras de cada área difeririam entre a primeira e a segunda coleta, como pode ser observado na Tabela 2. Assim, pode-se observar que as propriedades físico-químicas apresentaram padrões semelhantes entre as áreas sob o mesmo uso do solo, o que confirmou a escolha dessas áreas como réplicas biológicas no estudo.

**Tabela 1.** Propriedades físicas do solo das amostras de florestas primárias, florestas, secundárias e pastagens referentes à primeira coleta.

Atributos do solo			Coleta 1 e 2					
			FP2	FP5	FS2	FS4	P2	P3
Umidade atual	Anel+SU	Peso (g)	82,90	99,42	100,40	88,71	100,26	103,85
	SU	Peso (g)	66,61	76,37	78,07	71,46	80,73	80,71
	q	cm <sup>3</sup> .cm <sup>-3</sup>	0,43	0,25	0,25	0,22	0,32	0,17
Macroporosidade	Potencial	cm	60,00	60,00	60,00	60,00	60,00	60,00
	Anel+SU	Peso (g)	84,95	102,72	101,12	92,32	105,04	111,28
	SU	Peso (g)	68,66	79,66	78,78	75,07	85,51	88,14
	q	cm <sup>3</sup> .cm <sup>-3</sup>	0,47	0,31	0,26	0,29	0,42	0,30
	q	%	46,90	30,80	26,34	28,64	41,50	30,48
Capacidade de retenção de água	Potencial	cm	330,00	330,00	330,00	330,00	330,00	330,00
	Anel+SU	Peso (g)	83,04	100,69	97,67	90,29	103,90	107,93
	SU	Peso (g)	66,75	77,63	75,34	73,04	84,37	84,78
	q	cm <sup>3</sup> .cm <sup>-3</sup>	0,43	0,27	0,19	0,25	0,39	0,24
	q	%	43,34	27,04	18,97	24,88	39,36	24,24
	SS+A+P+E	Peso (g)	59,87	86,10	88,47	76,87	83,00	94,90
	A+P+E	Peso (g)	16,29	23,06	22,34	17,25	19,53	23,14
	SS	Peso (g)	43,58	63,04	66,14	59,62	63,47	71,76
	Altura	(mm)	30,11	30,06	26,67	30,07	29,98	30,11
	Diametro	(mm)	47,54	47,80	47,67	47,81	47,49	47,63
	V anel	(mm <sup>3</sup> )	53449,74	53942,66	47668,77	53987,33	53112,56	53653,84
	V anel	(cm <sup>3</sup> )	53,45	53,94	47,67	53,99	53,11	53,65
	Dens. solo	(g.cm <sup>-3</sup> )	0,82	1,17	1,37	1,10	1,20	1,34
	Porosidade Total	cm <sup>3</sup> .cm <sup>-3</sup>	0,65	0,52	0,47	0,56	0,50	0,45
		%	64,53	52,47	46,80	55,73	50,47	45,48
	Microporosidade	cm <sup>3</sup> .cm <sup>-3</sup>	0,18	0,22	0,20	0,27	0,09	0,15
		%	17,63	21,67	20,46	27,09	8,97	15,00
	N-total	mg.kg <sup>-1</sup>	2384,40	3060,40	1499,40	3760,40	3889,20	2128,00

Floresta Primária 2 (FP2), Floresta Primária 5 (FP5), Floresta Secundária 2 (FS2); Floresta Secundária 4 (FS4); Pastagem 2 (P2), Pastagem 3 (P3).

**Tabela 2.** Propriedades químicas do solo das amostras de florestas primárias, florestas secundárias e pastagens referentes à segunda coleta.

Atributos do solo		Coleta 1						Coleta 2					
		FP2	FP5	FS2	FS4	P2	P3	FP2	FP5	FS2	FS4	P2	P3
pH CaCl <sub>2</sub>		3,56	3,38	3,82	4,08	4,70	5,12	3,42	3,64	3,70	3,96	4,72	4,98
M.O. Colorimétrica	g.dm <sup>-3</sup>	54,00	32,20	22,60	46,40	31,20	29,60	66,40	27,80	27,80	52,00	34,20	47,60
P	mg.dm <sup>-3</sup>	8,00	6,20	3,40	5,40	6,20	5,20	2,00	2,00	1,33	2,50	4,20	11,00
S Fosfato de cálcio 0,01 mol L <sup>-1</sup>	mg.dm <sup>-3</sup>	11,00	5,80	5,00	6,60	4,25	6,40	15,20	9,00	4,40	7,00	5,60	8,80
K	mmolc.dm <sup>-3</sup>	0,76	0,52	0,54	0,74	1,56	0,98	0,84	0,40	0,28	0,64	1,62	3,02
Ca	mmolc.dm <sup>-3</sup>	3,20	1,00	1,00	4,80	19,80	18,00	2,43	<3	<3	4,00	19,00	21,00
Mg	mmolc.dm <sup>-3</sup>	2,20	2,00	<1	3,80	5,20	9,20	3,00	2,00	2,00	5,20	6,40	13,60
Al KCl 1 mol.L <sup>-1</sup>	mmolc.dm <sup>-3</sup>	28,00	19,40	10,00	18,00	4,00	<1	31,00	10,80	8,00	11,40	3,67	2,00
H+Al SMP	mmolc.dm <sup>-3</sup>	118,60	80,40	40,80	73,80	32,20	21,80	242,60	105,00	92,60	116,20	47,60	42,00
SB	mmolc.dm <sup>-3</sup>	6,16	2,52	2,34	9,34	26,56	28,18	6,00	3,20	3,08	8,84	27,02	37,62
CTC	mmolc.dm <sup>-3</sup>	134,76	82,84	43,14	83,14	58,70	49,98	248,60	108,20	95,68	125,04	74,62	79,62
V	%	5,00	3,20	5,80	12,40	44,00	55,80	2,40	3,20	3,40	7,40	36,60	46,20
m	%	80,80	88,60	79,80	64,40	13,20	3,80	80,20	76,40	69,40	56,60	11,20	4,60
B água quente	mg.dm <sup>-3</sup>	0,65	0,348	0,316	0,315	0,48	0,624	0,65	0,348	0,222	0,36	0,304	0,24
Cu DTPA	mg.dm <sup>-3</sup>	0,36	0,12	0,2	3,42	0,5	0,46	0,36	0,12	0,44	0,14	0,26	1,92
Fe DTPA	mg.dm <sup>-3</sup>	234,6	173,6	69,6	109,8	59	85,8	234,6	173,6	192,8	100,6	54	73,2
Mn DTPA	mg.dm <sup>-3</sup>	2,9	0,66	4,24	9,66	21,86	11,8	2,9	0,66	0,675	11,22	2,54	13,74
Zn DTPA	mg.dm <sup>-3</sup>	5,52	0,26	0,52	0,68	2,44	0,9	5,52	0,26	0,56	0,54	0,72	2,34

Floresta Primária 2 (FP2), Floresta Primária 5 (FP5), Floresta Secundária 2 (FS2); Floresta Secundária 4 (FS4); Pastagem 2 (P2), Pastagem 3 (P3); pH em CaCl<sub>2</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup>; M.O colorimétrica, fósforo (P), enxofre (S), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), alumínio trocável (Al), acidez potencial (H+Al), SB: Soma de bases trocáveis; CTC: Capacidade de troca de cátions; V: Saturação da CTC por bases; m: Saturação por Alumínio; Boro (B), cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e ferro (Fe); (<) menor do que o Limite de Quantificação.

### 5.3 Extração do DNA total das amostras de solo

Para que o DNA total extraído das amostras de solo apresentasse condições satisfatórias, tanto de qualidade como quantidade, algumas otimizações foram necessárias. Dessa maneira, foram realizados diversos testes para o estabelecimento de um protocolo de extração que resultasse em um DNA de quantidade adequada e alta qualidade. Os maiores problemas encontrados foram devido à textura argilosa e a alta quantidade de matéria orgânica presente nos solos amazônicos. Nesse sentido, o protocolo original do *PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit* foi alterado nos seguintes passos:

- Tempo no *MoBio Vortex* de 10 para 15 minutos;
- Tempo na centrífuga após o *MoBio Vortex* de 30 segundos para 3 minutos.

Com essas otimizações no protocolo de extração, o DNA total extraído apresentou qualidade e quantidade adequada para a realização das análises microbiológicas posteriores.

#### **5.4 Quantificação do DNA genômico extraído**

O DNA total do solo foi extraído em duplicata, de acordo com as condições apresentadas no tópico 4.3 deste presente trabalho, para cada uma das amostras das áreas de estudo. Todas as amostras apresentaram valores entre 1,8 a 2,0 do parâmetro 260/280, medidos em *Nanodrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific). Quanto a quantidade, as amostras extraídas apresentaram de 6,54 a 119,60 ng/μL de DNA.

Na Tabela 3 encontram-se as concentrações de DNA (ng/μl) e os respectivos valores do parâmetro 260/280, analisadas em espectrofotômetro *Nanodrop 2000c*, para cada uma das amostras. A concentração de DNA das amostras variou de acordo com a área e com os diferentes usos do solo, além de apresentar uma variação entre as coletas realizadas (julho e novembro de 2015).

**Tabela 3.** Concentração de DNA e o parâmetro 260/280 de cada amostra.

Coleta	Uso do solo	Nome da área	Concentração (ng/μL)	260/280
Coleta 1	Floresta	Primária 2	33,7	2,16
			119,6	1,67
			33,43	1,8
			29,3	2
			35,03	2,17
		Primária 5	44,43	2,07
			44,8	2,02
			48,97	2,05
			35,87	2,1
			27,2	2,18
	Floresta	Secundária 2	12,97	1,9
			13,77	1,98
			11,9	2,05
			6,54	2,29
			7,6	2,55
		Secundária 4	25,27	1,87
			35,3	1,91
			56,6	1,87
			28,3	1,9
			19,4	1,94
	Pastagem	Pastagem 2	98,47	1,92
			56,37	1,92
			28,3	2,02
			25,67	2,06
			25,77	2
		Pastagem 3	36,57	2
			38,1	1,98
			38,9	1,97
			40,87	1,87
			23,9	2,12
Coleta 2	Floresta	Primária 2	60,97	1,94
			133,77	1,68
			89,73	1,87
			67,87	1,84
			82,67	1,89
		Primária 5	17,13	2,16
			51,73	1,88
			29,23	2,06
			25	2,01
			31,27	1,91
	Floresta	Secundária 2	18,2	1,99
			9,37	2,09
			17,64	1,98
			16,4	1,92
			7,3	2,21
		Secundária 4	31,9	1,89
			27,3	1,94
			54,74	1,9
			37,6	1,88
			27,87	1,91
	Pastagem	Pastagem 2	22,1	1,87
			61,5	1,83
			22,63	1,89
			23,5	2,06
			21,13	1,95
		Pastagem 3	71,63	1,9
			92,93	1,91
			65,9	1,9
			54,4	1,85
			38,13	1,91



## 5.5 PCR quantitativo em tempo real dos genes

### 5.5.1 PCR quantitativo em tempo real do gene 16S rRNA de *Bacteria*

O PCR quantitativo em tempo real para o gene 16S rRNA de *Bacteria* foi realizado para determinar o efeito das mudanças do usos do solo, bem como dos períodos de sazonalidade (úmido e seco), sob a abundância de microrganismos do domínio *Bacteria*. Para esta análise, utilizou-se a curva padronizada nas quantidades de  $10^5$  a  $10^9$  cópias do gene 16S rRNA de *Bacteria* para quantificação absoluta das amostras e uma amostra sem DNA ambiental, utilizada como controle negativo. Todas as placas realizadas apresentaram eficiência de qualidade, variando entre 86% a 96%, e baixa taxa de erro,  $R^2$  maior que 0,99.

### 5.5.2 PCR quantitativo em tempo real do gene 16S rRNA de *Archaea*

O PCR quantitativo em tempo real para o gene 16S rRNA de *Archaea* foi realizado para determinar o efeito das mudanças do usos do solo, bem como dos períodos de sazonalidade (úmido e seco), sob a abundância de microrganismos do domínio *Archaea*. Para esta análise, utilizou-se a curva padronizada nas quantidades de  $10^3$  a  $10^7$  cópias do gene 16S rRNA de *Archaea* para quantificação absoluta das amostras e uma amostra sem DNA ambiental, utilizada como controle negativo. Todas as placas realizadas apresentaram eficiência de qualidade, variando entre 90% a 110%, e baixa taxa de erro,  $R^2$  maior que 0,99.

### 5.5.3 PCR quantitativo em tempo real do gene *mcrA*

O PCR quantitativo em tempo real para o gene *mcrA* foi realizado para determinar o efeito das mudanças do usos do solo, bem como dos períodos de sazonalidade (úmido e seco), sob a abundância de microrganismos metanogênicos. Para esta análise, utilizou-se a curva padronizada nas quantidades de  $10^1$  a  $10^7$  cópias do gene *mcrA* para quantificação absoluta das amostras e uma amostra sem DNA ambiental, utilizada como controle negativo. Todas as placas realizadas apresentaram eficiência de qualidade, variando entre 90% a 110%, e baixa taxa de erro,  $R^2$  maior que 0,99.

#### 5.5.4 PCR quantitativo em tempo real do gene *pmoA*

O PCR quantitativo em tempo real para o gene *pmoA* foi realizado para determinar o efeito das mudanças do usos do solo, bem como dos períodos de sazonalidade (úmido e seco), sob a abundância de microrganismos metanotróficos. Para esta análise, utilizou-se a curva padronizada nas quantidades de 1 a  $10^5$  cópias do gene *pmoA* para quantificação absoluta das amostras e uma amostra sem DNA ambiental, utilizada como controle negativo. Todas as placas realizadas apresentaram eficiência de qualidade, variando entre 86% a 96%, e baixa taxa de erro,  $R^2$  maior que 0,99.

#### 5.5.5 PCR quantitativo em tempo real do gene *mmoX*

O PCR quantitativo em tempo real para o gene *mmoX* foi realizado para determinar o efeito das mudanças do usos do solo, bem como dos períodos de sazonalidade (úmido e seco), sob a abundância de microrganismos metanotróficos. Para esta análise, utilizou-se a curva padronizada nas quantidades de 1 a  $10^4$  cópias do gene *mmoX* para quantificação absoluta das amostras e uma amostra sem DNA ambiental, utilizada como controle negativo. Todas as placas realizadas apresentaram eficiência de qualidade, variando entre 90% a 110%, e baixa taxa de erro,  $R^2$  maior que 0,99.

### 5.6 Análises estatísticas

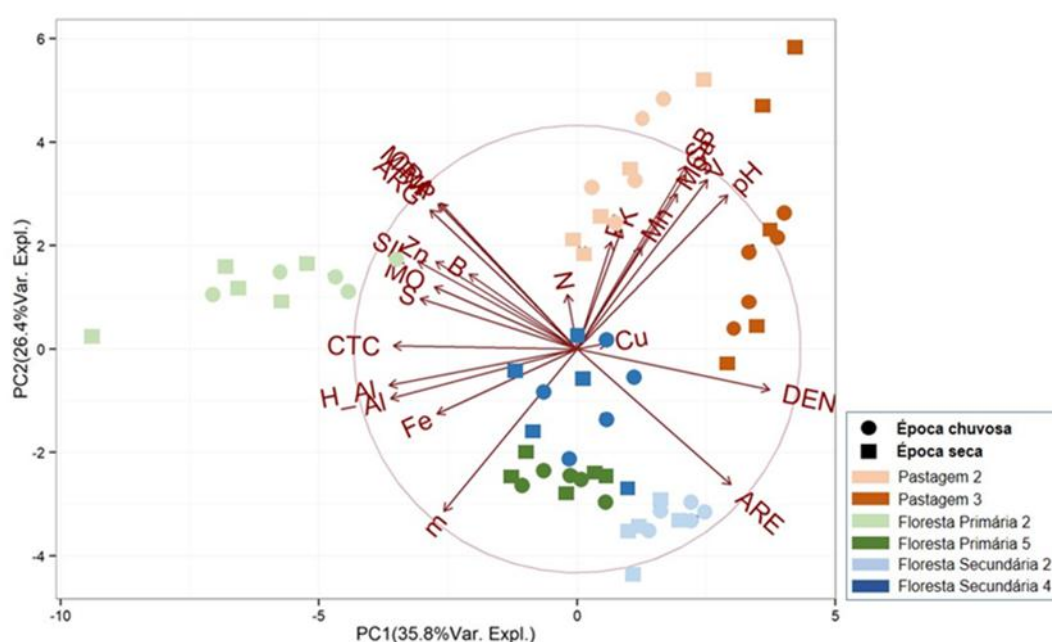
#### 5.6.1 Análises estatísticas dos dados físico-químicos

Os dados físico-químicos obtidos entre as diferentes áreas e diferentes épocas de amostragem foram testados quanto a sua normalidade pelo teste de *Shapiro-Wilk* e quanto a sua homogeneidade de variâncias no software *SigmaPlot* (San Jose, CA, USA). Uma vez que os dados seguiram os pressupostos dos testes não-paramétricos, foi realizado o teste de *Kruskal-Wallis* a 5% de significância, na ferramenta estatística *ActionStat* (São Carlos, SP, BR). Realizou-se, para as áreas sob diferentes usos do solo e dados físico-químicos demonstrados, uma Análise de Componentes Principais (PCA), utilizando a ferramenta *ActionStat*.

As amostras das áreas de pastagem apresentaram características físico-químicas diferenciadas das amostras provenientes de áreas de florestas, tanto primárias como

secundárias (Figura 1), demonstrando relações com parâmetros físico-químicos do solo, como densidade, pH, nitrogênio, entre outros. Deste modo, é demonstrado que a conversão de florestas às pastagens tem o potencial de alterar as características físicas e químicas do solo, tornando tais parâmetros muito distintos em áreas de pastagens quando comparados às áreas florestadas.

**Figura 1.** PCA das características físico-químicas das áreas utilizadas.



### 5.6.2 Processamento dos dados de PCR quantitativo em tempo real e análises estatísticas

Os dados obtidos por meio da técnica de qPCR foram analisados no programa *StepOne Software v2.3* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) quanto à sua especificidade e eficiência. Os dados de abundância de cada amostra foram exportados para uma planilha *Excel* (Microsoft), onde foram transformados em número de cópias por nanograma de DNA. Os dados foram testados quanto a sua normalidade pelo teste de *Shapiro-Wilk* e sua homogeneidade de variâncias no software *SigmaPlot* (San Jose, CA, USA). Uma vez que os dados seguiram os pressupostos dos testes não-paramétricos, foi realizado o teste de *Kruskal-Wallis* a 5% de significância na

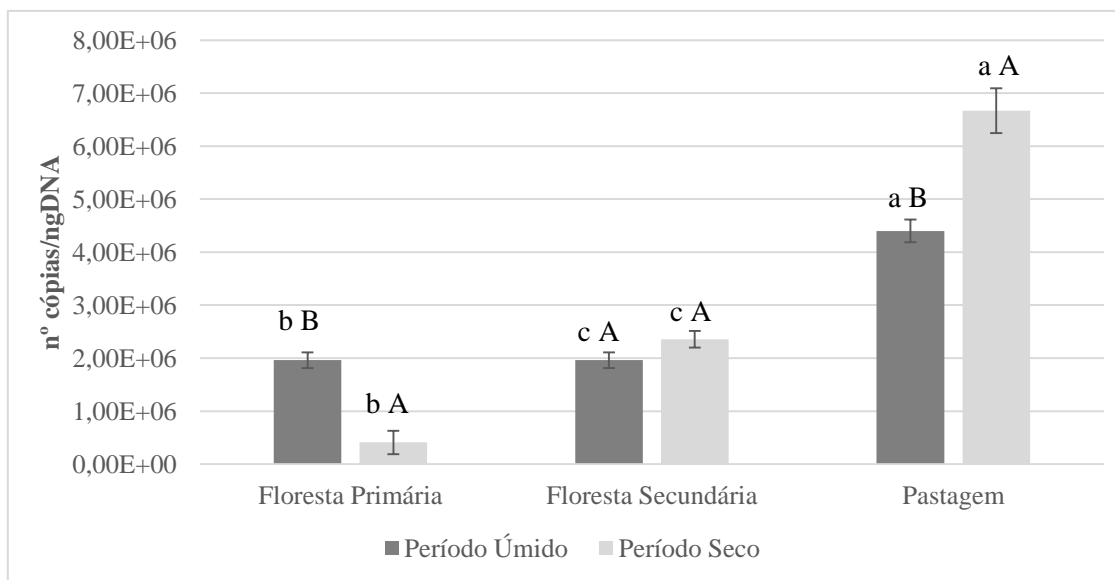
ferramenta estatística *ActionStat* (São Carlos, SP, BR). As correlações entre os dados foram realizadas a partir do teste de *Spearman*, no software *SigmaPlot* (San Jose, CA, USA).

### 5.6.2.1 Quantificações dos genes por qPCR

A partir das quantificações, por qPCR, realizada para os genes 16S rRNA de *Bacteria*, 16S rRNA de *Archaea*, *mcrA*, *pmoA* e *mmoX*, pode-se verificar a abundância dos mesmos sob os diferentes usos do solo e períodos de sazonalidade.

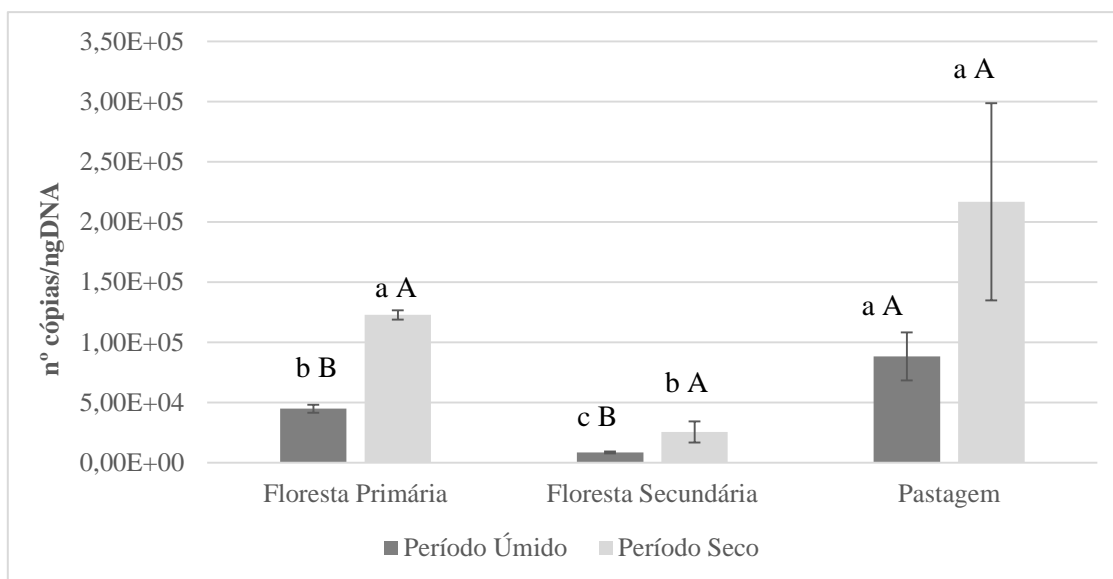
Nos gráficos abaixo, estão representados os resultados de abundância, em número de cópias por nanograma de DNA, obtidos para cada gene nas diferentes áreas e períodos de coleta. O período úmido refere-se à primeira coleta, a qual foi realizada em julho de 2015. Já o período seco refere-se à segunda coleta, que foi realizada em novembro de 2015.

**Gráfico 1.** Abundância do gene 16S rRNA de *Bacteria* em áreas de pastagens, florestas primárias e florestas secundárias para os dois períodos de coleta.



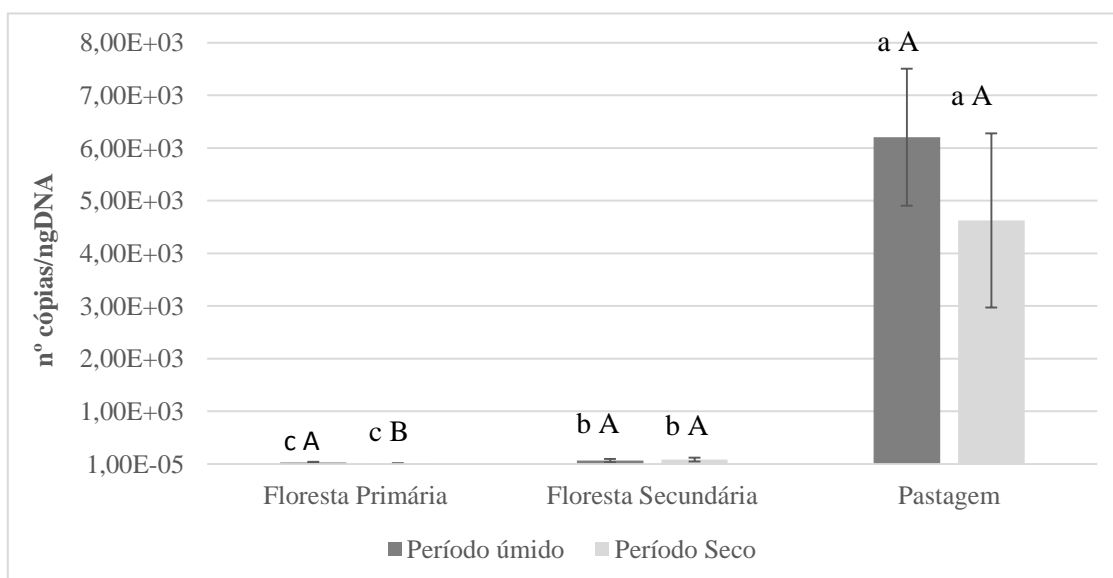
Coleta 1 (julho de 2015, período úmido); Coleta 2 (novembro de 2015, período seco); As barras de erro representam o erro padrão da média. Letras minúsculas representam a comparação entre as áreas no mesmo período de amostragem e letras maiúsculas representam a comparação dos períodos de amostragem em cada área. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade.

**Gráfico 2.** Abundância do gene 16S rRNA de *Archaea* em áreas de pastagens, florestas primárias e florestas secundárias para os dois períodos de coleta.



Coleta 1 (julho de 2015, período úmido); Coleta 2 (novembro de 2015, período seco); As barras de erro representam o erro padrão da média. Letras minúsculas representam a comparação entre as áreas no mesmo período de amostragem e letras maiúsculas representam a comparação dos períodos de amostragem em cada área. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade.

**Gráfico 3.** Abundância do gene *mcrA* em áreas de pastagens, florestas primárias e florestas secundárias para os dois períodos de coleta.



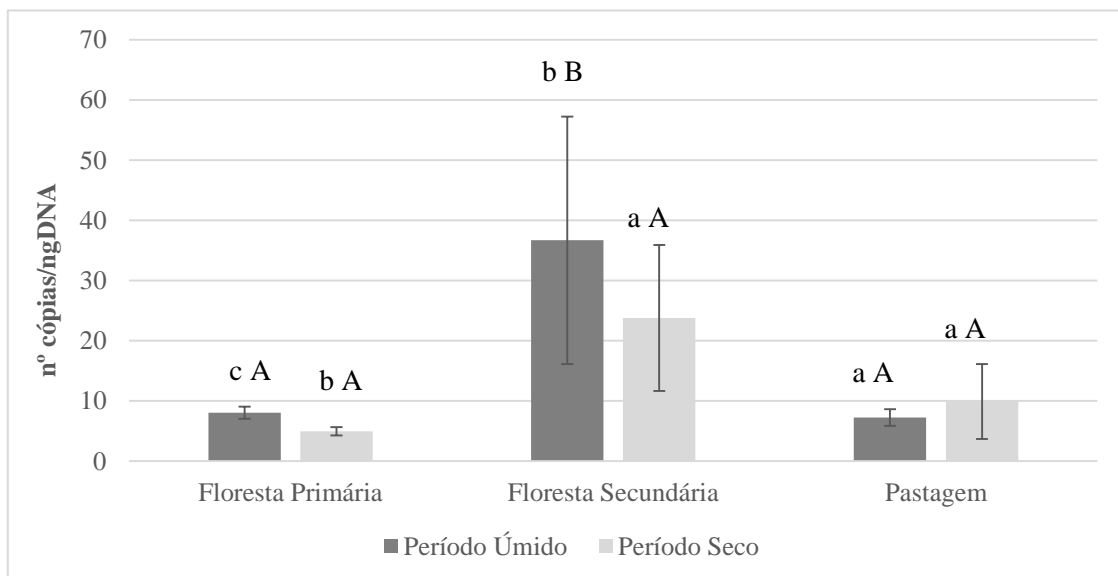
Coleta 1 (julho de 2015, período úmido); Coleta 2 (novembro de 2015, período seco); As barras de erro representam o erro padrão da média. Letras minúsculas representam a comparação entre as áreas no mesmo período de amostragem e letras maiúsculas representam a comparação dos períodos de amostragem em cada área. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade.

**Gráfico 4.** Abundância do gene *pmoA* em áreas de pastagens, florestas primárias e florestas secundárias para os dois períodos de coleta.



Coleta 1 (julho de 2015, período úmido); Coleta 2 (novembro de 2015, período seco); As barras de erro representam o erro padrão da média. Letras minúsculas representam a comparação entre as áreas no mesmo período de amostragem e letras maiúsculas representam a comparação dos períodos de amostragem em cada área. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade.

**Gráfico 5.** Abundância do gene *mmoX* em áreas de pastagens, florestas primárias e florestas secundárias para os dois períodos de coleta.



Coleta 1 (julho de 2015, período úmido); Coleta 2 (novembro de 2015, período seco); As barras de erro representam o erro padrão da média. Letras minúsculas representam a comparação entre as áreas no mesmo período de amostragem e letras maiúsculas representam a comparação dos períodos de amostragem em cada área. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade.

**Tabela 4.** Resultados das quantificações, por qPCRs, em número de cópias por nanograma de DNA, dos genes para todas as áreas estudadas nas duas coletas: julho de 2015 (período úmido) e novembro de 2015 (período seco).

Coletas	Áreas	16S rRNA de <i>Bacteria</i>	16S rRNA de <i>Archaea</i>	<i>mcrA</i>	<i>mmoX</i>	<i>pmoA</i>
<b>Coleta 1 (julho 2015)</b>	<b>Pastagem 2</b>	3,96E+06	9,77E+04	4,00E+03	7,30E+00	7,09E+02
	<b>Pastagem 3</b>	4,84E+06	7,87E+04	8,41E+03	7,15E+00	3,98E+03
	<b>Floresta Primária 2</b>	1,76E+06	4,84E+04	4,35E+01	8,46E+00	3,96E+01
	<b>Floresta Primária 5</b>	2,16E+06	4,11E+04	7,38E+00	7,57E+00	4,80E+01
	<b>Floresta Secundária 2</b>	2,58E+06	9,55E+03	1,64E+01	1,02E+01	6,10E+01
	<b>Floresta Secundária 4</b>	5,11E+06	7,41E+03	1,31E+02	6,31E+01	5,24E+01
<b>Coleta 2 (novembro 2015)</b>	<b>Pastagem 2</b>	6,35E+06	3,56E+05	2,39E+03	1,59E+01	2,61E+02
	<b>Pastagem 3</b>	6,99E+06	7,77E+04	6,86E+03	3,82E+00	6,37E+02
	<b>Floresta Primária 2</b>	3,76E+06	1,15E+05	2,02E+00	5,51E+00	4,24E+01
	<b>Floresta Primária 5</b>	4,45E+06	1,30E+05	1,32E+01	4,35E+00	6,07E+01
	<b>Floresta Secundária 2</b>	2,01E+06	1,49E+04	1,90E+01	1,17E+01	1,81E+02
	<b>Floresta Secundária 4</b>	2,70E+06	3,60E+04	1,43E+02	3,58E+01	1,44E+02

### 5.6.3 Coeficiente de correlação

Na Tabela 5, estão representados os coeficientes de correlação entre as variáveis analisadas. Os valores de correlação positivos entre duas variáveis que apresentem valor-*p* menores que 0,05 indicam que estas variáveis tendem a aumentar conjuntamente. As correlações negativas e com valor-*p* menores que 0,05 indicam que uma das variáveis tende a diminuir enquanto a outra tende a aumentar. Quando o valor-*p* apresentado é maior que 0,05, as correlações não foram estatisticamente significativas.

**Tabela 5.** Coeficientes de correlação para as variáveis analisadas.

	<b>16S rRNA <i>Bacteria</i></b>	<b>16S rRNA <i>Archaea</i></b>	<b><i>mcrA</i></b>	<b><i>pmoA</i></b>	<b><i>mmoX</i></b>
<b>16S <i>Bacteria</i></b>	-	-	-	-	-
<b>16S <i>Archaea</i></b>	0,417*	-	-	-	-
<b><i>mcrA</i></b>	0,447*	0,009	-	-	-
<b><i>pmoA</i></b>	0,404*	0,134	0,766*	-	-
<b><i>mmoX</i></b>	-0,227	-0,425*	-0,0351	-0,124	-
<b>pH</b>	0,606*	0,104	0,714*	0,756*	-0,076
<b>MO</b>	0,067	0,042	-0,051	-0,222	0,006
<b>N</b>	0,296*	0,276*	0,041	0,008	0,013
<b>P</b>	0,075	-0,041	0,255*	-0,024	0,081
<b>S</b>	0,131	0,330*	-0,280*	-0,410*	-0,116
<b>K</b>	0,492	0,349*	0,473*	0,300*	-0,095
<b>Ca</b>	0,608*	0,389*	0,630*	0,621*	-0,258*
<b>Mg</b>	0,654*	0,351*	0,611*	0,607*	-0,232
<b>Al</b>	-0,545*	-0,210	-0,675*	-0,834*	0,221
<b>H+Al</b>	-0,391*	0,014	-0,543*	-0,575*	0,054
<b>SB</b>	0,622*	0,336*	0,632*	0,551*	-0,186
<b>CTC</b>	-0,241	0,234	-0,426*	-0,404*	-0,030
<b>V</b>	0,590*	0,080	0,713*	0,658*	-0,055
<b>M</b>	-0,653*	-0,236	-0,696*	-0,739*	0,175
<b>B</b>	-0,114	0,311*	-0,128	-0,177	0,095
<b>Cu</b>	0,275*	-0,101	0,415*	0,285*	0,036
<b>Fe</b>	-0,343*	0,009	-0,458*	-0,588*	0,021
<b>Mn</b>	0,386*	-0,026	0,608*	0,445*	0,047
<b>Zn</b>	0,171	0,212	0,272*	0,108	-0,190
<b>AREIA</b>	-0,034	-0,422*	0,159	0,307*	0,129
<b>SILTE</b>	-0,028	0,226	-0,166	-0,329*	-0,013
<b>ARGILA</b>	0,056	0,444*	-0,142	-0,297*	-0,167
<b>MACROP</b>	0,083	0,496*	-0,117	-0,216	-0,212
<b>MICROP</b>	-0,321*	-0,388*	-0,338*	-0,347*	0,215
<b>CAP. RET. ÁGUA</b>	0,13	0,526*	-0,060	-0,183	-0,163
<b>DENSIDADE</b>	0,166	-0,204	0,372*	0,490*	-0,028

Legenda: \* Significativo à 0,05.

Os processos de mudança do uso do solo têm o potencial de alterar os parâmetros físico-químicos do solo, e conseqüentemente a estrutura e a diversidade da comunidade microbiana associada a esse solo. Alguns parâmetros físico-químicos do



solo, como nitrogênio total, pH e densidade, que apresentaram correlações com as quantificações dos genes analisados nesse trabalho, serão abordados a seguir a partir de levantamento bibliográfico de literatura presente sobre o tema.

### 5.6.3.1 Nitrogênio

Nas análises de correlação, o nitrogênio total do solo demonstrou correlação positiva com as quantificações dos genes 16S rRNA de *Bacteria* e 16S rRNA de *Archaea*, obtidas por meio de qPCR, sendo os coeficientes de correlação de 0,296 e 0,276, respectivamente, com valor- $p < 0,05$ .

O Nitrogênio é um elemento vital para qualquer organismo vivo, pois é essencial para a formação de biomoléculas, dentre as quais se destacam as proteínas e os ácidos nucleicos (CARDOSO; ANDREOTE, 2016). Este elemento, sendo considerado um substrato para o crescimento ou para respiração, pode afetar a estrutura das comunidades microbianas, na medida em que estas podem competir pelo nitrogênio do solo (CLEGG, 2006). Em solos de pastagens, as comunidades microbianas podem estar associadas ao aumento nas concentrações de carbono, nitrogênio e magnésio (RODRIGUES et al., 2013).

O enriquecimento de nitrogênio no solo, por meio de adubações nitrogenadas, pode estar relacionado com a diminuição da diversidade das comunidades microbianas associadas a estes solos (DONG, Y-H et al., 2016). A partir da literatura, pode-se verificar que o aumento de nitrogênio no solo diminuiu o número de cópias do gene 16S rRNA de *Bacteria* (ZHOU, 2017), sugerindo uma diminuição desta comunidade. Contudo, estudos têm demonstrado que em pastagens, as comunidades microbianas podem estar associadas ao aumento das concentrações de nitrogênio presentes (RODRIGUES et al., 2013).

Apesar do nitrogênio não ter demonstrado correlação com as quantificações dos genes associados à metanotrofia (*pmoA* e *mmoX*), como pode ser observado na Tabela 6, é demonstrado na literatura que altos níveis de adubação nitrogenada que podem ser empregados em pastagens e florestas manejadas, os quais aumentam a disponibilidade do nitrogênio no solo, têm o potencial de reduzir a metanotrofia (HUTSCH, 1996), cuja comunidade pode ser verificada pelos genes descritos acima. Estudos têm demonstrado que o aumento das concentrações de nitrogênio no solo, a partir de adubações, pode favorecer a comunidade metanogênica (*mcrA*) presente no solo (LIU; WU, 2017).

Assim, é sugerido que as respostas da microbiota ao enriquecimento de nitrogênio podem ser específicas de cada solo (DONG et al., 2016), o que pode estar relacionada com as demais características físico-químicas do solo, bem como os períodos de sazonalidade.

#### 5.6.3.2 pH

Como demonstrado na Tabela 5, a variável pH demonstrou correlação positiva (com valor- $p < 0,05$ ) com as quantificações dos genes 16S rRNA *Bacteria*, *mcrA* e *pmoA*. No entanto, as correlações não foram estatisticamente significativas com os genes *mmoX* e 16S rRNA de *Archaea*.

O pH é um importante parâmetro físico-químico do solo com potencial de influenciar a estrutura e a diversidade das comunidades microbianas presentes neste ambiente. (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Desse modo, os processos naturais e antropogênicos contribuem para as variações de pH no solo, ocasionando modificações na microbiota (LAUBER et al., 2009), bem como em sua funcionalidade (PROSSER; NICOL, 2012). Neste sentido, o pH do solo modula a solubilidade dos minerais e, conseqüentemente, a disponibilidade de nutrientes à microbiota do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), o que pode ser considerado um importante fator relacionado à abundância destes microrganismos.

Os solos de floresta possuem valores de pH menores e valores de alumínio maiores do que os apresentados pelas pastagens (RODRIGUES et al., 2013), o que pode estar relacionado com as queimadas na vegetação para implementação das pastagens, gerando enormes quantidades de cinzas que contribuiriam para o aumento dos valores de pH (FERNANDES et al., 2002), o que poderia alterar a estrutura dessas comunidades.

Em trabalhos descritos na literatura, demonstra-se que a diversidade bacteriana é maior em valores de pH próximos a neutro. No entanto, diversos grupos podem ser favorecidos em valores de pH mais ácido (WU et al., 2017).

Evidencia-se que os processos relacionados ao consumo do metano sejam alterados pelo pH, na medida em que este pode modular o funcionamento da microbiota metanotrófica (KING et al., 2000). Como os valores de pH das pastagens tendem a ser maiores que os das florestas, tal fator poderia estar relacionado à maior quantificação do gene *pmoA* em solos de pastagens do que nos solos das florestas, sendo o pH um fator

contribuinte a este processo, pois é evidenciado que um grande número de bactérias metanotróficas são encontradas em ambientes com pH mais próximos a neutro, sendo que a atividade metanotrófica pode ser inibida em valores de pH mais ácidos (HUTSCH, 1996). Isto também aplica-se às quantificações apresentadas pelos microrganismos metanogênicos, as quais foram maiores em pastagens. A partir da literatura, também pode-se encontrar dados que demonstram que os valores de pH considerados ótimos para as arqueias metanogênicas são aqueles próximos a neutro e, como ocorre na metanotrofia, a atividade de metanogênese também pode ser inibida em valores mais baixos de pH (WANG et al., 1993).

### 5.6.3.3 Densidade do solo

Como demonstrado na Tabela 5, a variável densidade demonstrou correlação positiva (com valor- $p < 0,05$ ) com as quantificações dos genes *mcrA* e *pmoA*. No entanto, as correlações não foram estatisticamente significativas com os genes *mmoX* e 16S rRNA de *Archaea* e 16S rRNA de *Bacteria*.

A densidade é um fator que está relacionado com a porosidade do solo, de forma que solos com maiores densidades podem apresentar porosidades menores (VERCHOT et al., 2000). É relatado na literatura que solos de pastagem apresentam valores de densidade maiores que os solos de florestas primárias, enquanto as florestas secundárias apresentam valores de densidade próximos aos valores encontrados nas florestas primárias (VERCHOT et al., 2000).

Neste sentido, verificou-se que os valores de densidade dos solos estudados apresentaram correlações positivas com as quantificações dos genes *mcrA* (gene marcador funcional de metanogênicas) e *pmoA* (gene marcador funcional de metanotróficos). Os dois genes apresentaram maiores quantificações em solos de pastagens do que em solos de florestas. Na literatura, é evidenciado que a densidade e a porosidade possuem grande influência sobre a metanotrofia (TATE et al., 2006), o que pode sugerir a maior quantificação do gene marcador de metanotróficos nessa área. Além disso, como os solos de pastagens podem ser mais densos e compactados do que os solos florestais, tal compactação contribuiria para a formação de um ambiente anóxico, ideal para as metanogênicas (FREY et al., 2011; ŠIBANCA et al., 2014), o que também poderia sugerir a maior quantificação deste gene nos solos de pastagens.

## 5.6.4 Abundância dos genes

### 5.6.4.1 Abundância de bactérias e arqueias

Como pode ser verificado no Gráfico 1, os resultados obtidos pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR), para o gene 16S rRNA de *Bacteria*, demonstraram quantificações diferenciadas para o gene de acordo com os usos do solo e com os períodos de sazonalidade. No período úmido (julho), pode-se verificar a maior abundância do gene em solos de pastagens e em solos das florestas secundárias. No período seco (novembro), a maior abundância do gene foi encontrada em solos de pastagens. Dentre as épocas de sazonalidade, os solos no período seco demonstraram maiores quantificações do gene 16S rRNA de *Bacteria*. No Gráfico 2 estão representadas as quantificações obtidas para o gene 16S rRNA de *Archaea*, por meio de qPCR, para os solos sob diferentes usos e quanto aos períodos de sazonalidade. Verificou-se que, tanto no período úmido como no período seco houve maior abundância do gene em solos de pastagens. Porém, comparando-se os dois períodos, houve maior abundância do gene 16S rRNA de *Archaea* na época seca.

Estes resultados demonstram que os períodos de sazonalidade e os diferentes usos do solo têm o potencial de alterar a abundância das comunidades microbianas de *Bacteria* e *Archaea*. Diversos estudos têm demonstrado que as comunidades microbianas respondem fortemente à conversão da floresta amazônica em áreas de pastagem. É evidenciado que, após a conversão de florestas a pastagens, pode ocorrer um aumento da abundância das comunidades microbianas presentes nesses solos. No entanto, após a conversão, estas comunidades tornam-se mais semelhantes através do espaço, levando a uma homogeneização da microbiota (RODRIGUES et al., 2013). Neste sentido, tal fator poderia explicar as maiores abundâncias dos genes 16S rRNA de *Bacteria* e 16S rRNA de *Archaea* encontrados nos solos das pastagens.

### 5.6.4.2 Abundância de microrganismos metanotróficos e metanogênicos

O gene funcional *mcrA* (marcador molecular de microrganismos metanogênicos) apresentou maior abundância em solos de pastagens do que nos solos de floresta, tanto no período úmido como no período seco, como pode ser observado no Gráfico 3. No entanto, no período úmido, as quantificações demonstraram maiores

abundâncias do gene. As quantificações dos genes funcionais *pmoA* e *mmoX* (marcadores moleculares de microrganismos metanotróficos) demonstraram que as áreas de pastagens, florestas primárias e secundárias estudadas, apresentam abundâncias distintas para estes genes funcionais.

A abundância do gene *pmoA* foi maior em solos de pastagem, tanto na época seca como na época úmida, sendo que, nesta última, a abundância apresentada para este gene foi maior. O gene *mmoX* apresentou maiores quantificações em solos de florestas secundárias, seguida por pastagens e florestas primárias, nos dois períodos analisados e, de forma semelhante ao gene *pmoA*, a sua abundância foi maior no período úmido. Estes resultados demonstram que os períodos de sazonalidade e os diferentes usos do solo têm o potencial de alterar a abundância das comunidades metanogênicas e metanotróficas.

A relação de proporção entre os genes *mcrA* e *pmoA* (Tabela 6) demonstra que o número de cópias do gene *mcrA* é sempre maior do que o do gene *pmoA* nas pastagens, sendo que, nas florestas primárias, a relação se inverte, ou seja, o número de cópias do gene *pmoA* é maior do que o de *mcrA*. Quanto às florestas secundárias, há mais números de cópias do gene *mcrA* em relação ao gene *pmoA* no período úmido, já no período seco ocorre o contrário com essas áreas.

**Tabela 6:** Relação entre os genes *mcrA* e *pmoA* nas áreas e épocas de coleta

Áreas	Período úmido		Período seco	
	<i>mcrA</i>	<i>pmoA</i>	<i>mcrA</i>	<i>pmoA</i>
Florestas Primárias	0,58	: 1	0,15	: 1
Florestas Secundárias	1,14	: 1	0,50	: 1
Pastagens	2,65	: 1	9,91	: 1

### 5.6.5. Discussão

As áreas de pastagem apresentaram maiores abundâncias dos genes 16S rRNA de *Bacteria* e 16S rRNA de *Archaea*, *mcrA* e *pmoA*. Dentre as duas áreas de pastagem utilizadas para o estudo (pastagem 2, com 10 anos, 3°18.832'S, 54°54.585'W, e pastagem 3, com 20 anos, 3°07.881'S, 54°57.469'W), a pastagem 3 apresentou as maiores abundâncias, quanto a quantificação, para os genes 16S rRNA de *Bacteria*,

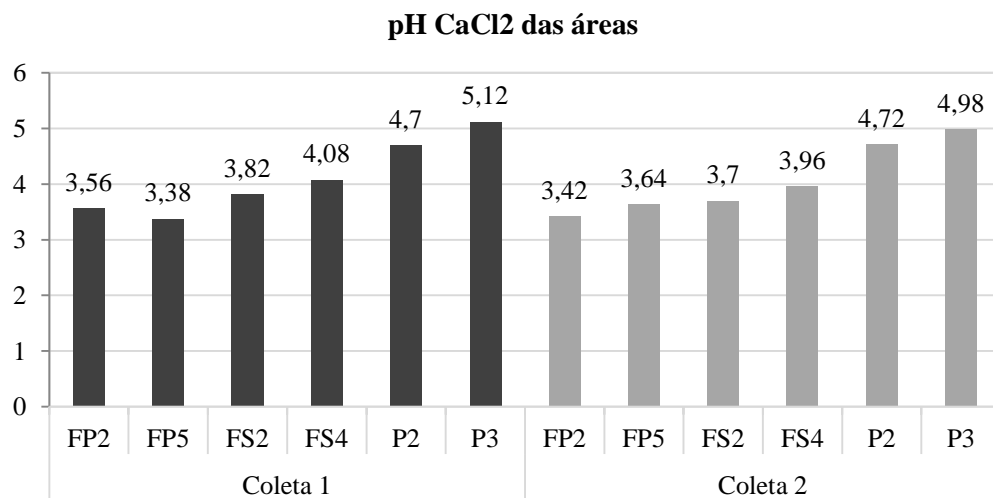
*mcrA* e *pmoA* nas duas épocas analisadas (período úmido e seco). Esta pastagem apresenta os maiores valores de pH dentre as áreas estudadas, como pode ser observado no Gráfico 6 apresentado abaixo. Como citado anteriormente, a partir de estudos presentes na literatura, esperava-se que as pastagens apresentassem valores mais elevados de pH, comparados aos valores das florestas, o que foi confirmado para as áreas estudadas. Neste sentido, a maior abundância encontrada para os genes marcadores moleculares de metanotróficos (*pmoA*) e de metanogênicos (*mcrA*), bem como a do gene 16S rRNA de *Bacteria*, pode estar associada, dentre inúmeros fatores, ao pH mais elevado encontrado nestas pastagens. O pH mais elevado, neste sentido poderia favorecer o desenvolvimento das comunidades microbianas, bem como os processos relacionados à metanotrofia e metanogênese, como foi evidenciado anteriormente a partir da literatura e pelas correlações positivas apresentadas pelos genes em questão com o pH (tópico 5.6.3.2).

É citado na literatura que o aumento dos níveis de nitrogênio no solo diminui o número de cópias do gene 16S rRNA de *Bacteria* (ZHOU et al., 2017). Como citado anteriormente, os valores de nitrogênio das áreas estudadas apresentaram correlação positiva com as quantificações dos genes 16S rRNA de *Bacteria* e 16S rRNA de *Archaea*. Desta forma, a abundância do gene 16S rRNA de *Bacteria*, na pastagem 3, também pode estar relacionada aos níveis de nitrogênio diminuídos nesta área, como demonstrado no Gráfico 7 abaixo. No entanto, também é demonstrado que, em pastagens, as comunidades microbianas podem estar associadas ao aumento das concentrações de nitrogênio (RODRIGUES et al., 2013), o que poderia demonstrar a abundância do gene 16S rRNA de *Bacteria* na pastagem 2, na qual é demonstrado um aumento nas quantidades de nitrogênio presentes (Gráfico 7).

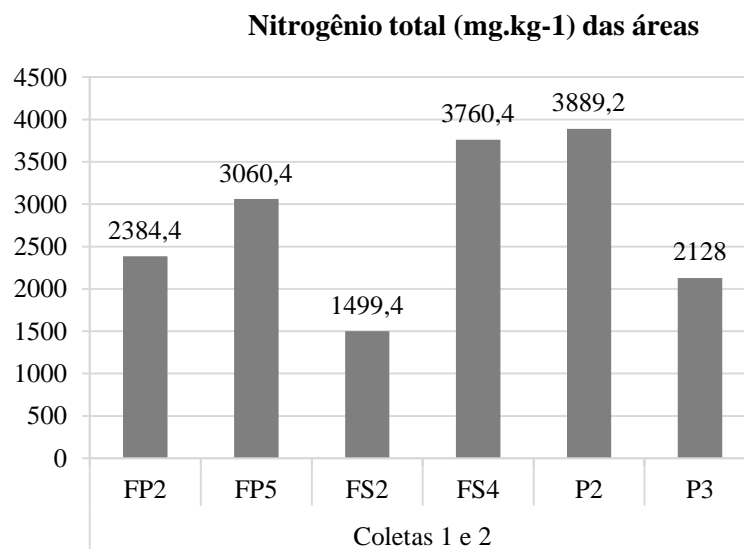
Verificou-se que a pastagem 3 e a floresta secundária 2 (3° 15.466' S, 54° 53.320' W) possuem altos valores de densidade, sendo este valor maior na floresta secundária, como pode ser observado no Gráfico 8, mas entre a média das áreas, a densidade foi maior nas pastagens. A densidade do solo, como citado anteriormente, foi um parâmetro que apresentou correlação positiva com as quantificações dos genes *mcrA* e *pmoA*. As arqueias metanogênicas, microrganismos anaeróbios, podem ser encontradas de forma mais abundante em pastagens e em solos utilizados pela agropecuária, uma vez que estes solos tendem a ser mais compactados, com menos porosidade do que os solos florestais. E tal compactação, ocasionada pelo manejo de animais e/ou implementos agrícolas, contribuiria para a formação de um ambiente

anóxico, ideal para as metanogênicas (FREY et al., 2011; ŠIBANCA et al., 2014). Isto explicaria, em parte, a maior abundância, quanto à quantificação do gene *mcrA*, destas arqueias encontradas em solos de pastagem em relação aos solos de floresta. Além disso, os excrementos dos animais incorporados ao solo podem fornecer uma fonte nutricional a mais aos microrganismos metanogênicos, na medida em que são materiais que apresentam decomposição mais fácil do que os encontrados nas florestas, além disso, os excrementos podem contribuir na incorporação de microrganismos metanogênicos ao solo, uma vez que tais microrganismos também são encontrados no trato digestório dos bovinos (GATTINGER et al., 2007; PREM et al., 2014).

Esperou-se, a partir da literatura, encontrar maiores quantificações de microrganismos metanotróficos, por meio dos genes *pmoA* e *mmoX*, também em solos de pastagens. Tal proposição deveu-se ao fato de que essas comunidades poderiam ser encontradas de forma associada, uma vez que as arqueias metanogênicas produzem metano que, potencialmente, poderia ser consumido pelas bactérias metanotróficas. E, como metanogênicas foram quantificadas de forma mais representativa em solos de pastagens, as bactérias metanotróficas consumidoras de metano poderiam também ser encontradas em solos em pastagens (NÜSSLEIN; LAMMEL et al., 2015). Esta suposição pode ser confirmada apenas para metanotróficos portadores do gene *pmoA*, por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real, pois encontrou-se maiores quantificações deste em solos de pastagens. Isto revelou que os microrganismos metanotróficos, consumidores do metano, também podem ser encontrados de forma significativa em solos de pastagens. Porém, a proporção de metanotróficos, portadores do gene *pmoA*, foi maior em solos de floresta do que em solos de pastagem, demonstrando a importância de mais estudos sobre os mecanismos de ação dessas comunidades no ambiente. Desta forma, tais áreas apresentam potenciais distintos para a produção e consumo do gás metano, sendo o potencial de produção maior em pastagens, e o potencial de consumo maior em florestas.

**Gráfico 6.** pH das áreas estudadas referentes às duas coletas.

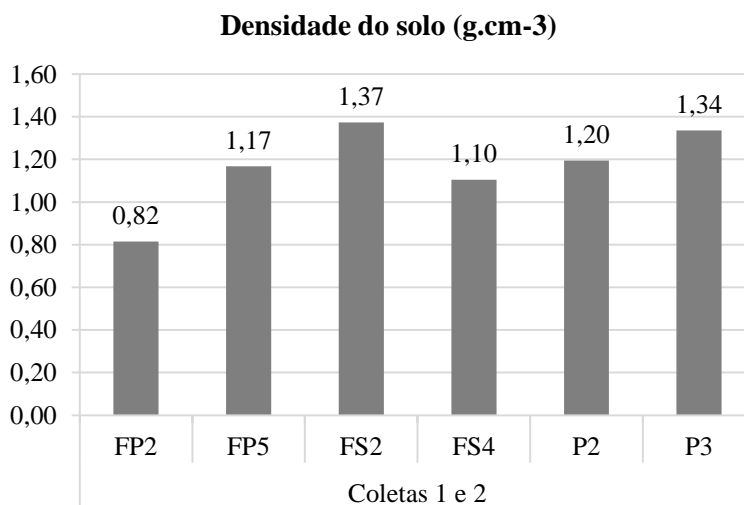
Floresta Primária 2 (FP2), Floresta Primária 5 (FP5), Floresta Secundária 2 (FS2); Floresta Secundária 4 (FS4); Pastagem 2 (P2), Pastagem 3 (P3); Coleta 1 (julho de 2015, período úmido); Coleta 2 (novembro de 2015, período seco);

**Gráfico 7.** Nitrogênio total das áreas estudadas referentes às duas coletas.

Floresta Primária 2 (FP2), Floresta Primária 5 (FP5), Floresta Secundária 2 (FS2); Floresta Secundária 4 (FS4); Pastagem 2 (P2), Pastagem 3 (P3); Coleta 1 (julho de 2015, período úmido); Coleta 2 (novembro de 2015, período seco);



**Gráfico 8.** Densidade do solo das áreas estudadas referentes às duas coletas.



Floresta Primária 2 (FP2), Floresta Primária 5 (FP5), Floresta Secundária 2 (FS2); Floresta Secundária 4 (FS4); Pastagem 2 (P2), Pastagem 3 (P3); Coleta 1 (julho de 2015, período úmido); Coleta 2 (novembro de 2015, período seco);

## 6. Considerações finais

Os dados obtidos pela técnica de qPCR confirmaram a hipótese inicial deste trabalho, demonstrando que os diferentes usos do solo avaliados (pastagens, florestas primárias e florestas secundárias), apresentam potenciais distintos para a produção e o consumo do gás metano, evidenciado por meio dos resultados das quantificações, pelo número de cópias de cada gene avaliado, em cada área e período de estudo.

Verificou-se, por meio dos resultados, que as mudanças do uso da terra têm grande potencial de alterar a abundância das comunidades microbianas associadas ao ciclo biogeoquímico do metano. Os processos de alteração destas comunidades se devem, principalmente, às mudanças das propriedades físicas e químicas destes solos, que ocorrem após a conversão do seu uso, além do efeito do período de sazonalidade. Com isso, ocorrem alterações nos processos mediados por essas comunidades, como a alteração no ciclo biogeoquímico do metano e, consequentemente, no intercâmbio do gás do solo com a atmosfera.

Assim, pode-se notar que as áreas convertidas em pastagens apresentam um maior potencial na produção do gás metano, pois apresentam maior abundância de microrganismos do domínio *Archaea* e *Bacteria*, comparado às áreas de floresta, com grande número de cópias do gene *mcrA* (marcador de metanogênicos) em relação ao número de cópias do gene *pmoA*, em ambos os períodos de sazonalidade: período seco e período úmido.

As áreas de florestas primárias apresentaram um número mais elevado de cópias do gene *pmoA* (marcador de metanotróficos) em relação ao gene *mcrA*, em ambos os períodos de sazonalidade, quando comparadas com as áreas de florestas secundárias e pastagens, demonstrando que as áreas de florestas primárias apresentam potencial de consumo de metano, por meio da ação da microbiota metanotrófica.

Já as áreas de florestas secundárias apresentaram um padrão similar ao das florestas primárias de baixo número de cópias do gene *mcrA*, enquanto apresentaram maior número de cópias do gene *mmoX*, indicando o potencial da restauração florestal como estratégia para o sequestro do metano.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, A. E.; BOOTH, M. G.; VERITY, P. G.; FRISCHER, M. E. Influence of nitrate availability on the distribution and abundance of heterotrophic bacterial nitrate assimilation genes in the Barents Sea during summer. **Aquatic Microbial Ecology**, Oldendorf, v. 39, n. 3, p. 247-255, 2005.
- ALVALÁ, P. C.; KIRCHHOFF, V. W. J. H.; PAVÃO, H. G.; Metano na atmosfera - Produção de metano em regiões de queimadas e áreas alagadas. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 7, p. 40-43, 1999.
- ANGEL, R.; CLAUS, P.; CONRAD, R. Methanogenic archaea are globally ubiquitous in aerated soils and become active under wet anoxic conditions. **The ISME Journal**, London, v. 6, p. 847-862, 2012.
- ARONSON, E. L.; ALLISON, S. D.; HELLIKER, B. R. Environmental impacts on the diversity of methane-cycling microbes and their resultant function. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 225, p. 1-15, 2013.
- AUMAN, A. J.; LIDSTROM, M. E. Analysis of sMMO-containing type I methanotrophs in Lake Washington sediment. **Environmental Microbiology**, v. 4, p. 517-524, 2002.
- BRODY, J. R.; KERN, S. E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, London, v. 36, p. 214-216, 2004.
- CARDOSO, E. J. B. N.; ADREOTE, F. D. Microbiologia do solo [Recurso eletrônico], 2ª Edição, p. 1- 221. Piracicaba: ESALQ, 2016.
- CLEGG, C. Impact of cattle grazing and inorganic fertilizer additions to managed grasslands on the microbial community composition of soils. **Applied Soil Ecology**, 31:73- 82, 2006.
- 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, n. 11, p. 5066-5074, 1999.
- DIRZO, R.; RAVEN, P. H. Global state of biodiversity and loss. **Annual Review of Environment and Resources**, United States, v. 28, p. 137-167, 2003.
- DONG, Y-H.; LI, J-G.; SHEN, M-C.; HOU, J-F.; LI, L.; WU, J-X. Effect of different levels of nitrogen on rhizosphere bacterial community structure in intensive monoculture of greenhouse lettuce. **Scientific Reports - Nature**, London, v.6, n. 25305, p. 1-9, 2016.
- EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. 2.ed. Brasília, DF, 2006. 286p. Disponível em: <file:///C:/Users/Usuareio/Downloads/sistema-brasileiro-de-classificacao-dos-solos2006.pdf>. Acesso em 13 de Out. de 2018.
- FAO. FAO soils portal. Disponível em: <<http://www.fao.org/soils-portal/soil-survey/soil-classification/en/>>. Acesso em: 10 de Out. de 2018.

FEARNSIDE, P. M.; BARBOSA, R. I. Soil carbon changes from conversion of forest to pasture in Brazilian Amazonia. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 108, n. 1-2, p. 147-166, 1998.

FERNANDES, S. S. P.; BERNOUX, M.; CERRI, C. C.; FEIGL, B. J.; PICCOLO, M. C. Seasonal variation of soil chemical properties and CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> fluxes in unfertilized and P-fertilized pastures in an Ultisol of the Brazilian Amazon. **Geoderma**, v. 107, p. 227-241, 2002.

FERREIRA, L. V.; VENTICINQUE, E.; ALMEIDA, S. O desmatamento na Amazônia e a importância das áreas protegidas. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 19, n. 53, 2005.

FREY, B.; NIKLAUS, P. A.; KREMER, J.; LÜSCHER, P.; ZIMMERMANN, S. Heavy-machinery traffic impacts methane emissions as well as methanogen abundance and community structure in oxic forest soils. **Applied Environmental Microbiology**, v.77, n. 17, p. 6060–6068, 2011.

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**, v. 309, p. 570-574, 2005.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: What relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 402, p. 1445-1454, 2004.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 243-270, 2004.

GARCIA, J. L.; PATEL, B. K. C.; OLLIVIER, B. Taxonomic, phylogenetic and ecological diversity of methanogenic archaea. **Anaerobe**, London, v. 6, n. 4, p. 205-226, 2000.

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, p. 1-9, 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.

GEIST, H.; LAMBIN, E. What drives tropical deforestation? A meta analysis of proximate and underlying causes of deforestation based on subnational case study evidence. LUC International Project Office, Louvain-la-neuve - Belgium, 2001.

GEIST, H. J.; LAMBIN, E. F. Proximate Causes and Underlying Driving Forces of Tropical Deforestation. **BioScience**, v. 52, p. 143-150, 2002.

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, Copenhagen, v. 30, n. 6, p. 503-512, 2002.

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

HECKENBERGER, M. J. J.; RUSSELL, C.; TONEY, J. R.; SCHMIDT, M. J. The legacy of cultural landscapes in the Brazilian Amazon: implications for biodiversity. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 362, n. 1478, p. 197-208, 2007.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: Real-Time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, New York, v. 11, n. 9, p. 1026-1030, 1993.

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

HUTSCH, B. Methane oxidation in soils of two long-term fertilization experiments in Germany. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, n. 6, p. 773-82, 1996.

INPE-Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. **Monitoramento da Floresta Amazônica Brasileira por Satélite**. Disponível em: <<http://www.obt.inpe.br/OBT/assuntos/programas/amazonia/prodes>>. Acesso em: 06 de Nov. de 2018.

INPE-Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. **Projeto PRODES do INPE estima 4.848 km<sup>2</sup> de desmatamento na Amazônia em 2014**. Disponível em: [http://www.inpe.br/noticias/noticia.php?Cod\\_Noticia=3781](http://www.inpe.br/noticias/noticia.php?Cod_Noticia=3781)>. Acesso em 2 de set. de 2015.

IPCC, 2007: Climate Change 2007: Working Group I: The Physical Science Basis: Methane. IPCC Fourth Assessment Report: Climate Change. Disponível em: <[http://www.ipcc.ch/publications\\_and\\_data/ar4/wg1/en/ch7s7-4-1.html](http://www.ipcc.ch/publications_and_data/ar4/wg1/en/ch7s7-4-1.html)>. Acesso em 08 de Out. de 2014.

JOHNSON, M. J.; LEE, K. Y.; SCOW, K. M. DNA fingerprinting reveals links among agricultural crops, soil properties, and the composition of soil microbial communities. **Geoderma**, Amsterdam, v. 114, n. 3-4, p. 279-303, 2003.

KENNEDY, A. C.; PAPENDICK, R. I. Microbial characteristics of soil quality. **Journal of Soil and Water Conservation**, Ankeny, v. 50, n. 3, p. 243-248, 1995.

KING, G. M.; BENSTEAD, J. The effect of soil acidification on atmospheric methane uptake by a Maine forest soil. **Microbiology Ecology**, v. 34, p. 207-212, 2000.

KIRK, J. L.; BEAUDETTEA, L. A.; HARTB, M.; MOUTOGLISC, P.; KLIRONOMOSB, J. N.; LEEA, H.; TREVORSA, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 169-188, 2004.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: Wiley, 1991. p. 115-175.

LAUBER, C. L.; HAMADY, M.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n. 15, p. 5111-5120, 2009.

LAUBER, C. L.; STRICKLAND, M. S.; BRADFORD, M. A.; FIERER, N. 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.

LELIEVELD, J.; CRUTZEN, P. J.; DENTENER, F. J. Changing concentration, lifetime and climate forcing of atmospheric methane. **Tellus B: Chemical and Physical Meteorology**, v. 50, p. 128-150, 1998.

LIU H.; WU, X.; LI, Z.; WANG, Q.; LIU, D.; LIU, G. Responses of soil methanogens, methanotrophs, and methane fluxes to land-use conversion and fertilization in a hilly red soil region of southern China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 8731–8743, 2017.

LUESKEN, F. A.; ZHU, B.; VAN ALLEN, T. A.; BUTLER, M. K.; DIAZ, M. R.; 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, n.11, p. 3877-3880, 2011.

MARTINY, A. C.; TRESEDER, K.; PUSCH, G. Phylogenetic conservatism of functional traits in microorganisms. **ISME Journal**, London, v. 7, n. 4, p. 830-838, 2013.

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.

MIGUEZ, C. B. et al. Detection and isolation of methanotrophic bacteria possessing soluble methane monooxygenase (sMMO) genes using the polymerase chain reaction (PCR). **Microbial Ecology**, New York, v. 33, p. 21–31, 1997.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2. ed. **Lavras: Ed. UFLA**, 2006. 626 p.

NAKAMURA, F. M.; Bioprospecção de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos isoladas de biocarvão de Terra Preta de Índio da Amazônia Central. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

NEPSTAD, D.C.; VERSSIMO, A.; ALENCAR, A.; NOBRE, C.; LIMA, E.; LEFEBVRE, P.; SCHLESINGER, P.; POTTER, C.; MOUTINHO, P.; MENDOZA, E.; COCHRANE, M.; BROOKS, V. Large-scale impoverishment of Amazonian forests by logging and fire. **Nature**, London, v. 398, p. 505-508, 1999.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Anápolis, n. 33, p. 10-13, 2003.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 9, 2001.

PROSSER, J.I. Autotrophic nitrification in bacteria. **Advances in Microbial Physiology**, Oxford, v. 30, p. 125-181, 1989.

RAISG - Rede Amazônica de Informação Socioambiental Georreferenciada. **Áreas Protegidas e Territórios Indígenas, Amazônia 2009**. Disponível em: <<https://www.amazoniasocioambiental.org/pt-br/publicacao/amazonia-2009-areas-protegidas-e-territorios-indigenas/>>. Acesso em: 09 de Nov. de 2018.

RILEY, P. W.; LUTON, P. E.; WAYNE, J. M.; SHARP, R. J. The mcrA gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. **Microbiology**, v. 148, p. 3521-3530, 2002.

RIVERO, S.; ALMEIDA, O.; ÁVILA, S.; OLIVEIRA, W. Pecuária e desmatamento: uma análise das principais causas diretas do desmatamento na Amazônia. **Nova Economia**, Belo Horizonte, v. 12, n.1, p. 41-66, 2009.

RODRIGUES, J.L.M.; PELLIZARI, V.; MUELLER, R.; BAEK, K.; JESUS, E da C.; PAULA, F.; MIRZA, B.; HAMAOUJI Jr, G.S.; TSAI, S.M.; FEIGL, B.; TIEDJE, J.M.; BOHANNAN, B.J.M.; NUSSLEIN, K. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 110, n. 3, p. 988–993, 2013.

ROGER-ESTRADE, J.; ANGER, C.; BERTRAND, M.; RICHARD, G. Tillage and soil ecology: Partners for sustainable agriculture. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 11, n. 1, p. 33-40, 2010.

SCHIMEL, J. P.; GULLEDGE, J. Microbial community structure and global trace gases. **Global Change Biology**, Oxford, v. 4, n. 7, p. 745-758, 1998.

ŠIBANCA, N.; DUMBRELL, A. J., MANDIC-MULE, I.; MACEKA, I. Impacts of naturally elevated soil CO<sub>2</sub> concentrations on communities of soil archaea and bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 68, p. 348–356, 2014.

SMITH, C. J.; OSBORN, A. M. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR) - based approaches in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 67, n. 1, p. 6-20, 2009.

STEINBERG, L. M.; REGAN, J. M. Phylogenetic comparison of the methanogenic communities from an acidic, oligotrophic fen and an anaerobic digester treating municipal wastewater sludge. **Applied an Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 21, p. 6663–6671, 2008.

SOARES-FILHO, B. S., NEPSTAD, D. C., CURRAN, L. M., CERQUEIRA, G. C., GARCIA, R. A., RAMOS, C. A., VOLL, E., MCDONALD, A., LEFEBVRE, P., SCHLESINGER, P. Modelling conservation in the Amazon basin. **Nature**, London, v. 440, p. 520-523, 2006.

TATE, K. R.; ROSS, D. J.; SCOTT, N. A.; RODDA, N. J.; TOWNSEND, J. A.; ARNOLD, G. C. Post-harvest patterns of carbon dioxide production, methane uptake and nitrous oxide production in a *Pinus radiata* D. Don Plantation. **Forest Ecology and Management**, v. 228, p. 40-50, 2006.

TUOMINVIRTA, T.T.; YRJÄLÄ, K.; FRITZE, H. Quantitative PCR of *pmoA* using a novel reverse primer correlates with potential methane oxidation in Finnish fen. **Research in Microbiology**, v. 160, p. 751-756, 2009.

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

VENTURINI, A. M. Efeito do uso do solo e da rizosfera de cana-de-açúcar na estrutura e abundância de comunidades de *Bacteria* e do filo *Verrucomicrobia*. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

VERCHOT, L.V. Impacts of forest conversion to agriculture on microbial communities and microbial function. In: **Soil biology and Agriculture in the Tropics**, London, p. 45-64, 2010.

WANG, B-Z.; ZHANG, C-X.; LIU, J-L.; ZENG, X-W.; LI, F-R.; WU, Y-C.; LIN, X-G.; XIONG, Z-Q.; XU, J.; JIA, Z-J. Microbial community changes along a land-use gradient of desert soil origin. **Pedosphere**, Beijing, v. 22, n. 5, p. 593-603, 2012.

WISE, M. G.; MCARTHUR, J. V.; SHIMKETS, L.J. Methanotroph diversity in landfill soil: Isolation of novel type I and type II methanotrophs whose presence was suggested by culture independent 16S ribosomal DNA analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 4887- 4897, 1999.

WU, Y.; ZENG, J.; ZHU, Q.; ZHANG, Z.; LIN, X. pH is the primary determinant of the bacterial community structure in agricultural soils impacted by polycyclic aromatic hydrocarbon pollution. **Scientific Reports – Nature**, London, v. 7, p. 1-7, 2017.

YU, Y.; LEE, C.; HWANG, S. Analysis of community structures in anaerobic processes using quantitative real-time PCR method. **Water Science Technology**, Oxford, v. 52, p. 85-91, 2005.

ZINDER, S.H. Physiological ecology of methanogens. In: FERRY, J.G. (Ed). New York: Chapman & Hall, p. 128-206, 1993.

ZHOU, J.; JIANG, X.; WEI, D.; ZHAO, B.; MA, M.; CHEN, S.; CAO, F.; SHEN, D.; GUAN, D.; LI, J. Consistent effects of nitrogen fertilization on soil bacterial communities in black soils for two crop seasons in China. **Scientific Reports - Nature**, London, v.7 n. 3267, p.1-10, 2017.