

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

**Estrutura e diversidade de comunidades microbianas em solos sob diferentes
sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental**

Acácio Aparecido Navarrete

**Dissertação apresentada para obtenção
do título de Mestre em Ecologia Aplicada**

**Piracicaba
2009**

Acácio Aparecido Navarrete
Ecólogo

Estrutura e diversidade de comunidades microbianas em solos sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental

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

**Dissertação apresentada para obtenção
do título de Mestre em Ecologia Aplicada**

**Piracicaba
2009**

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

Navarrete, Acácio Aparecido

Estrutura e diversidade de comunidades microbianas em solos sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental / Acácio Aparecido Navarrete. - - Piracicaba, 2009.

119 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Centro de Energia Nuclear na Agricultura, 2009.

1. DNA 2. Ecologia microbiana - Técnicas moleculares 3. Ecologia molecular 4. Genes 5. Microbiologia do solo 6. Uso do solo - Amazônia Ocidental I. Título

CDD 631.46
N321e

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

Um agradecimento especial...

A todas as pessoas que passaram por minha vida,
àquelas que me acompanharam
e tornaram meus dias mais felizes.
Àquelas que me machucaram
e me fizeram aprender mais sobre mim mesmo.
Provocaram dor, mas me fizeram crescer.
Àquelas que aparentemente passaram
e não deixaram nada...
porque deixaram, fui eu que, no momento, não me apercebi disso...

Um agradecimento especial
a você,
que agora está aqui,
comigo,
mostrando que alguma coisa
sempre fica de nós...

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Siu Mui Tsai pela orientação, formação e entusiasmo empenhados num propósito que excedeu largamente a realização da pesquisa científica aqui apresentada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida.

À Profa. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira pela colaboração como coordenadora nacional do projeto TSBF-CIAT/GEF-UNEP, “Conservation and Sustainable Management of Below Ground Biodiversity - CSM-BGBD”, BiosBrasil.

Ao *Tropical Soil Biology and Fertility Institute* (TSBF) do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) pela coordenação do projeto CSM-BGBD, ao *Global Environmental Facility* (GEF) pelo co-financiamento e ao *United Nations Environment Program* (UNEP) pela implementação do projeto BiosBrasil.

À coordenação do PPG Interunidades em Ecologia Aplicada (ESALQ/CENA) pela oportunidade.

Aos membros do Comitê de Orientação: Luiz Antônio Martinelli (CENA-USP) e Ima Célia Guimarães Vieira (Museu Paraense Emilio Goeldi).

Ao Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Rio Claro, pela educação prévia à realização deste trabalho, durante os anos de Graduação.

Aos técnicos e responsáveis pelo Laboratório de Biologia Celular e Molecular, José Elias Gomes, Fábio Duarte e Wagner Picinini, pelo auxílio.

Às comunidades ribeirinhas *Nova Aliança* e *Guanabara II* por me receberem e permitir as atividades de campo.

Aos colegas e amigos (as) com os quais tanto aprendi: Ademir, Aline, André Marcon, Amanda, Caio, Camila, Dani, Ézio, Fabi, Fernanda, Jeanedy, Lucélia, Ludmila, Janaina, Majú, Mari, Mateus, Milena, Monita e Rodrigo (CENA)... Carlos, Deyse, Gisele, Shirley e Thiago (ESALQ)... Bruno, Maurício, Michele e Paulo (UFLA)... Elson (UFAM)... Jansen e Prof. Dr. Juvenil (UNB)... Ederson (CME-MSU)... ao amigo Lucas (CENA), companheiro de coleta e cúmplice nestes dois anos de mestrado...

Às missas de quarta feira por elevar-me à Deus.

À minha família pelo apoio.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO.....	9
Referências	21
2 ESTRUTURAS DE COMUNIDADES MICROBIANAS DO SOLO SOB DIFERENTES USOS DA TERRA NA AMAZÔNIA OCIDENTAL.....	29
RESUMO	29
ABSTRACT	30
2.1 Introdução.....	31
2.2 Desenvolvimento	34
2.2.1 Material e Métodos.....	34
2.2.1.1 Área de estudo e amostragem.....	34
2.2.1.2 Extração do DNA total do solo	38
2.2.1.3 PCR-DGGE e PCR-ARISA	39
2.2.1.4 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante	39
2.2.1.5 Isolamento, clonagem e sequenciamento de <i>amplicons</i> 16S rRNA separados por DGGE	41
2.2.1.6 Análise Automatizada do Espaço Intergênico Ribossomal.....	42
2.2.2 Resultados.....	43
2.2.2.1 Análise dos padrões de bandas gerados por DGGE e estatísticas	43
2.2.2.2 Riqueza de <i>amplicons</i> e análise de sequências de <i>amplicons</i> 16S rRNA excisados de DGGE.....	56
2.2.2.3 Análise dos padrões de picos gerados por ARISA e análises multivariadas.....	63
2.2.3 Discussão.....	67
Referências	71
3 DIVERSIDADE DE <i>Archaea</i> OXIDADORAS DE AMÔNIA EM SOLOS DA AMAZÔNIA OCIDENTAL	75
RESUMO	75
ABSTRACT	76

3.1 Introdução	77
3.2 Desenvolvimento	80
3.2.1 Material e Métodos	80
3.2.1.1 Área de estudo e amostragem	80
3.2.1.2 Extração do DNA total do solo	80
3.2.1.3 Amplificação, clonagem e sequenciamento de fragmentos do gene <i>amoA</i> de <i>Archaea</i>	81
3.2.1.4 Análises das sequências, parâmetros ecológicos, medidas de diversidade e estatística.....	84
3.2.2 Resultados.....	85
3.2.2.1 Análises das sequências e parâmetros ecológicos das bibliotecas do gene <i>amoA</i> de <i>Archaea</i>	86
3.2.2.2 Análises filogenéticas	92
3.2.3 Discussão	98
4 CONCLUSÕES	102
Referências	103
ANEXOS	109

Resumo

Estrutura e diversidade de comunidades microbianas em solos sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental

O presente trabalho esteve inserido em um projeto mais amplo de cooperação internacional intitulado “Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity” – CSM-BGBD/BiosBrasil, implementado pela *United Nations Environment Programme* (UNEP) na bacia do Alto Solimões, Amazônia Ocidental, estado do Amazonas. Esta região é território remanescente de povos indígenas e permanece conservada, sendo um importante *hotspot* de biodiversidade. Ainda assim, as áreas de estudo foram caracterizadas por paisagens antropizadas com diferentes sistemas de usos da terra. Amostras de solos foram coletadas em um período de elevado índice pluviométrico, nos anos de 2008 e 2009, em áreas caracterizadas por floresta primária tropical, cultivos semiperenes de mandioca manejados por prática agrícola de corte-e-queima, pastagens implantadas nos anos de 1970 e áreas florestais em estádios avançados de regeneração (>10 anos de abandono). As amostras foram analisadas pelas técnicas de DGGE, ARISA, clonagem e sequenciamento a fim de obter uma caracterização das estruturas de comunidades de *Archaea*, *Bacteria* e microfungos e da composição e diversidade de um grupo funcional de *Archaea* envolvido no processo de oxidação de amônia nos ambientes do solo. Os resultados permitiram concluir que o uso da terra tem um grande efeito sobre as estruturas de comunidades de *Archaea*, *Bacteria* e microfungos presentes no solo e sugerem que longo período de abandono das áreas é necessário para cumprir com a resiliência dos ecossistemas amazônicos no contexto de recomposição da paisagem. Adicionalmente, os dados revelaram que a riqueza e a diversidade de comunidades de *Archaea* oxidadoras de amônia foram capazes de refletir sensivelmente as alterações percebidas nos ambientes do solo em decorrência do desmatamento de áreas de floresta primária e uso subsequente com cultivo agrícola tradicional e pastagem na região do Alto Solimões, Amazônia Ocidental.

Palavras-chave: Ecologia microbiana; Amazônia; Usos da terra; DGGE; ARISA; rRNA; *amoA*

Abstract

Soil microbial community structure and diversity under different land use systems in Western Amazon

The present study was part of a wider project of international cooperation entitled “Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity” – CSM-BGBD/BiosBrasil, established by the *United Nations Environment Programme* (UNEP) at the basin of Alto Solimões, Western Amazon, Amazonas State. This region is a remanescent territory of indigenous people and remains conserved, being considered an important hotspot of biodiversity. Even though, the studied areas were characterized by mosaic landscapes under different land use systems. Soil samples were collected in a period of high pluviometric index in the years 2008 and 2009 in areas characterized by tropical rainforest, semi permanent manioc cultivation under agricultural management of slash-and-burn, pasture established in the 1970s and forested areas at a higher stage of regeneration (>10 years abandoned). The samples were analyzed by DGGE, ARISA techniques, cloning and sequencing in order to obtain a characterization of the community structure of *Archaea*, *Bacteria* and microfungi and the composition and diversity of an archaeal functional group involved in the process of ammonia oxidation in the soil environments. The results allowed to conclude that land use has a great effect on the community structure of *Archaea*, *Bacteria* and microfungi present in the soil and suggest that long period of abandon of the areas is necessary to accomplish with the resilience of Amazonian ecosystems in the context of landscape recomposition. Additionally, the data revealed that richness and community diversity of ammonia oxidizing *Archaea* were able to sensitively reflect the changes observed in the soil environment due to deforestation of rainforest areas and subsequent use with traditional agriculture cultivation and pasture in the region of Alto Solimões, Western Amazon.

Keywords: Microbial ecology; Amazon; Land uses; DGGE; ARISA; rRNA; *amoA*

1 INTRODUÇÃO

As florestas tropicais estão sendo destruídas a taxas alarmantes. A Amazônia brasileira tem sido alvo de atividades que estão transformando extensas áreas de floresta tropical úmida em áreas destinadas à agricultura e pastagem, contribuindo para a alteração do ambiente e da paisagem amazônica (ALVIM, 1997; HOMMA et al., 1998; LORENA, 2003). Nepstad et al. (1991) afirmam que a capacidade de regeneração da floresta diminui a cada mudança do uso da terra e o impacto dessas transformações, a longo prazo, resulta em áreas menos produtivas.

A pecuária é considerada a atividade mais predadora do homem na região. A vida útil de produtividade das pastagens cultivadas na Amazônia é reduzida devido à seleção e implantação inadequada de espécies de gramíneas, a não fertilização do solo e os problemas de manejo dessas pastagens que degradam as propriedades físico-químicas do solo e possibilitam a colonização por espécies invasoras (SERRÃO E HOMMA, 1991).

A agricultura de subsistência, em geral itinerante e concentrada em pequenas áreas, também vem causando danos ao meio ambiente na Amazônia, além de limitar os estoques naturais de nutrientes e de diversidade genética (GASPAROTO et al., 1990; YOUNG, 1989). Em determinadas regiões amazônicas, a agricultura constitui uma atividade de baixa produtividade dependente do uso intensivo de mão-de-obra familiar, com tempo de pousio (descanso da terra) variado e baseada no desmatamento e queima frequente de novas áreas (HOMMA et al., 1998).

As atividades humanas na paisagem resultam na conversão da cobertura vegetal nativa, perda de tipos de cobertura, além de ocasionar fragmentação e perda de *habitats* (SAUDER et al., 2002). Segundo estimativas anuais realizadas pelo INPE, a Amazônia Ocidental apresentou no período de 1988 a 2006 uma taxa média de desmatamento de 4301,42 Km²/ano (INPE, 2007).

Em geral, são poucas as informações sobre os recursos naturais da Amazônia. Para a região do Alto Solimões, Amazônia Ocidental, destaca-se o levantamento dos recursos naturais realizado em pequena escala (1:1.000.000) pelo projeto RADAMBRASIL (DNPM, 1977) e o levantamento do uso e cobertura da terra realizado por Fidalgo et al. (2005) relacionado às áreas amostrais do projeto *Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity* (CSM-BGBD) ao qual este trabalho esteve vinculado. Dentre os sistemas de uso da terra

predominantes na região do Alto Solimões, destacam-se aqueles baseados no uso da floresta e os sistemas baseados predominantemente em produtos florestais, produtos animais e em culturas anuais (FIDALGO et al., 2005).

Três tipos de uso da floresta são identificados na região do Alto Solimões: floresta natural, florestas manejadas pelas comunidades e florestas destinadas ao corte de espécies arbóreas sob manejo sustentável. Os principais tipos de sistemas baseados em produtos florestais envolvem o sistema de produção florestal extensiva, na forma de agroflorestas, composto por vários estratos e diversidade de espécies; o sistema agroflorestal intensificado, composto por uma mistura de espécies arbóreas; e a monocultura de espécies florestais.

Os sistemas baseados predominantemente em culturas anuais identificados na região do Alto Solimões são representados por cultivo itinerante e pousio longo, que envolvem o abandono de áreas cultivadas permitindo a regeneração natural; ciclos intensivos e de intensidade média, com pousio médio a curto, entre 2 e 5 anos; e cultivo permanente ou pousio muito curto. Os sistemas baseados predominantemente em produtos animais podem ser divididos em uso de pastagens naturais ou espontâneas como fonte de forrageira e pastagem manejada para prover maior quantidade e qualidade de forragem.

Segundo o levantamento do uso e cobertura da terra realizado por Figalço et al. (2005), referente às áreas amostrais do projeto CSM-BGBD localizadas no município de Benjamin Constant, Amazônia Ocidental, o sistema de uso da terra denominado *Floresta Primária* envolve as áreas de formação florestal original em que se desconhece a ocorrência de desmatamento. As manchas de *Pastagem* compreendem áreas destinadas à produção animal, cobertas por gramíneas, enquanto o sistema designado como *Agricultura* representa áreas que se encontram cobertas por culturas anuais ou semiperenes, manejadas por métodos tradicionais.

O sistema de produção agrícola predominante nesta região baseia-se no ciclo de desmatamento da floresta ou da vegetação secundária e queima da vegetação para cultivo por um determinado período, seguido de descanso da terra e regeneração da vegetação florestal, que precede um novo ciclo iniciado com desmatamento e queima da vegetação. As áreas onde esse sistema ocorre se apresentam como um mosaico de áreas de floresta secundária em diversos

estádios de regeneração, ao lado de pequenas áreas agrícolas e de solo exposto (FIDALGO et al., 2005).

A região do Alto Solimões é um território remanescente de povos indígenas e, pelo difícil acesso, permanece como uma região conservada na Amazônia, sendo um importante *hotspot* de biodiversidade. O conhecimento de aspectos da ecologia microbiana em solos sob os diferentes usos da terra inseridos na paisagem é capaz de fornecer subsídios para o manejo sustentável desses solos, considerando a estrutura e a composição das comunidades microbianas como um indicador da alteração nos diferentes sistemas de uso da terra (BALLARD et al., 2004; KASCHUK, et al., 2006; MELLONI et al., 2006, BARBERI, 2007).

Comunidades microbianas do solo e suas respostas às práticas agrícolas e regimes de manejo associados à pastagem

Devido à importância dos micro-organismos do solo, muitos estudos têm sido realizados com o propósito de determinar os fatores que regulam as estruturas das comunidades microbianas ao longo de escalas temporais e espaciais, e ainda conhecer o impacto de diferentes espécies de plantas sobre a diversidade microbiana (CHIARINI et al., 1998; GLAYSTON, et al., 2004; IBEKWE et al., 2002; KOWALCHUK et al., 2002; SMALLA et al., 2001). Esta preocupação tem levado a um aumento no número de publicações de 1974 a 1999 (MORRIS et al., 2002) que avaliaram principalmente os efeitos de diferentes propriedades dos solos sobre as comunidades microbianas. No entanto, nos últimos cinco anos o impacto das atividades humanas sobre a diversidade microbiana do solo e o impacto da biodiversidade nos processos do solo têm recebido atenção especial (BUCKLEY E SCHMIDT, 2003; CLEGG et al., 2003; GLAYSTON, et al., 2004; JOHNSON et al., 2003; STEENWERTH et al., 2002; JESUS et al., 2009). Como resultado, o número de estudos abordando o impacto das práticas agrícolas e outros sistemas de uso da terra sobre a diversidade microbiana têm aumentado.

Perturbações causadas por práticas agrícolas podem proporcionar vantagens seletivas para alguns grupos biológicos presentes no solo, principalmente espécies bacterianas que são capazes de responder mais rapidamente às mudanças impostas no ambiente se comparado ao tempo de

resposta de outros grupos de organismos do solo (TORSVIK et al., 1998). Embora o homem possa melhorar a fertilidade do solo, seja por meio da adição de fertilizantes, uso de técnicas de aragem e drenagem ou alteração do pH, essas práticas de manejo modificam os ambientes do solo de modo a alterar sua diversidade funcional (WAID, 1999). Além disso, práticas como cultivo excessivo e contínuo, corte-e-queima, remoção dos resíduos da cultura e algumas práticas de irrigação promovem um declínio da qualidade do solo, que é geralmente acompanhada por perda da diversidade biológica (WAID, 1999).

As comunidades microbianas associadas com pastagem têm sido estudadas mais extensivamente no contexto do manejo do solo. As estruturas de comunidades microbianas neste ambiente sugeriram estar correlacionadas com diferentes níveis de fertilidade (McCAIG et al., 2001), tipos de pastagens (STEENWERTH et al., 2002), práticas de manejo (CLEGG et al., 2003) e ao processo de sucessão natural (FELSKE et al., 2000).

Técnicas moleculares para estudo de comunidades microbianas em amostras ambientais

A avaliação dos impactos antrópicos sobre as comunidades microbianas tem tradicionalmente dependido das técnicas de isolamento e cultivo. No entanto, uma pequena fração dos organismos na natureza, menos de 1%, podem ser cultivados usando técnicas microbiológicas de rotina (MALIK et al., 2008).

O desenvolvimento de técnicas para a análise de ácidos nucleicos tem permitido estudar complexas comunidades microbianas a nível genético. A análise do DNA fornece informação sobre a composição de espécies ou estruturas de comunidades. Embora, a princípio, qualquer gene possa ser usado nas análises, o gene 16S rRNA em procariotos e o 18S rRNA em eucariotos são os mais utilizados como moléculas marcadoras para este propósito, uma vez que estão presentes em todos os organismos; apresentam regiões conservadas e regiões variadas, o que torna possível o desenho de *primers* e sondas com diferentes níveis de especificidade; têm informação de sequência suficiente para inferência filogenética; e estão presentes em grande número de células, o que facilita sua detecção. Além disso, cerca de 800.000 sequências estão disponíveis atualmente em bases de dados de livre acesso, tais como *Genbank*

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), *RDP* (<http://rdp.cme.msu.edu/html>) e *Greengenes* (<http://greengenes.lbl.gov>).

Neste sentido, técnicas de *fingerprinting* são utilizadas a fim de se obter uma visão global da estrutura genética da comunidade microbiana. A aplicação destas técnicas em estudos de ecologia microbiana vem sendo amplamente disseminada nos últimos anos, uma vez que constituem metodologias rápidas e relativamente fáceis de operacionalizar, permitindo a análise simultânea de múltiplas amostras ambientais. Dentre estas técnicas estão ARDRA (“*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*”), DGGE (“*Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis*”), RISA (“*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*”), ARISA (“*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*”) e T-RFLP (“*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*”). Estas técnicas para análise de ácidos nucléicos têm sido desenvolvidas mediante variações no método básico de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizado com acuidade no diagnóstico, quantificação, caracterização e identificação de micro-organismos e atividade dos mesmos. Em genética de populações e ecologia microbiana, a PCR gera dados para estudos da distribuição natural de membros dos Domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eucarya*.

O uso das técnicas moleculares vem oferecendo uma oportunidade única e inovadora para se estudar comunidades microbianas *in situ*, sem a necessidade de isolamento e cultivo. Entretanto, nenhuma destas técnicas isoladamente é capaz de gerar dados abrangentes ou conclusivos sobre uma comunidade microbiana em particular. Além das limitações técnicas, o uso do rRNA como marcador molecular pode limitar a tarefa de descrever a diversidade microbiana. Esta molécula pode ser, em alguns casos, muito conservada para revelar diferenças entre micro-organismos evolutivamente relacionados, mas ecologicamente diferentes. Apenas uma aplicação combinada de diferentes métodos de biologia molecular, aliada ao uso de técnicas clássicas de isolamento e cultivo de micro-organismos em cultura pura, será capaz de revelar de maneira mais precisa a dimensão da diversidade microbiana na natureza.

Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

A técnica de DGGE é uma metodologia que permite a separação de fragmentos de DNA com o mesmo tamanho, porém com sequência de nucleotídeos diferentes, baseada na mobilidade eletroforética de uma molécula de DNA parcialmente desnaturada em géis de poliacrilamida com gradiente crescente de agente desnaturante. À medida que fragmentos de DNA se movem através do gel de poliacrilamida, contendo um gradiente crescente de desnaturantes, uréia e formamida, pequenas regiões denominadas domínios de desnaturação sofrem uma dissociação das fitas que compõem a dupla hélice, gerando moléculas parcialmente desnaturadas com mobilidade eletroforética retardada. Estas moléculas de DNA continuam a se mover vagarosamente através das concentrações mais altas de desnaturantes e, desse modo, domínios de desnaturação adicionais sofrem dissociação das fitas. Variações na composição de bases dentro destes domínios alteram o seu comportamento de desnaturação, caracterizando diferenciações no padrão de eletroforese no gel gradiente desnaturante. Entretanto, quando o último domínio, ou o mais estável, sofre desnaturação, o fragmento tem suas fitas completamente dissociadas e o poder de resolução do gel é perdido. Para contornar este problema, uma sequência de DNA rica em GC (cerca de 40-45 bases) é acoplada à extremidade 5' do *forward primer*, no caso de fragmento amplificado por PCR. Desta maneira, o fragmento inteiro desnatura como um domínio único e pára de migrar quando encontra seu T_m (*melting temperature*) no gel, enquanto a sequência rica em GC permanece na configuração duplex, impedindo a completa separação das duas fitas da molécula (MYERS et al., 1985).

Na década de 90, a técnica de DGGE foi introduzida no campo da ecologia molecular microbiana, aliada à extração direta de DNA da comunidade. Os produtos de PCR obtidos com vários conjuntos de *primers* que se anelam às regiões conservadas do gene 16S rRNA em procariotos e 18S rRNA em eucariotos, e abrangem uma ou até três regiões variáveis, têm sido separados por DGGE, revelando a complexidade de comunidades microbianas.

Entretanto, muitas vezes, a molécula de rRNA não oferece variação suficiente para diferenciar linhagens dentro de espécies. A análise de sequências intergênicas espaçadoras (IGS) entre a menor e a maior subunidade do gene rRNA pode gerar maior variabilidade a fim de investigar organismos em nível intra-específico (GÜRTLER E STANISICH, 1996). O uso de

primers específicos para a região espaçadora oferece uma vantagem sobre o uso de *primers* para a região 16S do gene rRNA no caso de espécies de rizóbios, uma vez que esta molécula não apresenta muita variação dentro deste táxon (VALLAEYS et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2006).

O uso de DGGE vem sendo disseminado nos últimos anos, demonstrando seu valor não apenas na caracterização de comunidades microbianas, como também para inferir afiliação filogenética dos membros da comunidade, testar a pureza de linhagens bacterianas, monitorar o isolamento de bactérias a partir de amostras ambientais, ou estudar a dinâmica de populações específicas em função de variações ambientais ou das condições operacionais de um sistema (MUYZER et al., 1993; HEUER et al., 1997; NOGUEIRA et al., 2006; PEIXOTO et al., 2006).

Análise Automatizada do Espaço Intergênico Ribossomal (ARISA)

A Análise Automatizada do Espaço Intergênico Ribossomal – ARISA (do inglês, *Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) é um método independente de cultivo, desenvolvido por Fisher e Triplet (1999). Nesta técnica, é amplificado o espaço intergênico entre a menor e a maior subunidade do gene rRNA (16S-23S em procarioto e 18S-28S em eucarioto). Esta região pode codificar vários tRNAs dependendo da espécie e apresenta heterogeneidade em termos do comprimento e da composição da sequência (GONZÁLEZ et al. 2003; RANJARD et al. 2000).

O método de ARISA baseia-se no uso de *primer* fluorescente na amplificação do espaço intergênico ribossomal microbiano, usando DNA extraído de amostras ambientais. Os produtos de PCR são analisados por um sistema de eletroforese capilar automatizado, no qual picos correspondentes a fragmentos de DNA são detectados por um sistema fluorescente a *laser* (CARDINALE, 2004).

A técnica de ARISA distingue as populações microbianas com base na heterogeneidade do comprimento do espaço intergênico ribossomal e permite uma análise sensível das comunidades com um nível relativamente elevado de resolução taxonômica e reprodutibilidade (CARDINALE et al., 2004, FISHER E TRIPLET, 1999). Fisher e Triplett (1999) sugerem que

esta técnica é rápida e efetiva para a análise de comunidades, podendo ser empregada juntamente com outros métodos mais acurados (clonagem e sequenciamento) quando for necessária uma resolução espacial e temporal refinada.

A natureza automatizada do método tem possibilitado análises rápidas de um grande número de amostras coletadas em uma variedade de ambientes: solos (BORNEMAN E TRIPLETT, 1997), solos de rizosfera (ROBLETO et al., 1998), água doce (FISHER E TRIPLETT, 1999), ambientes lacustres (YANNARELL E TRIPLETT, 2005), dentre outros. A eficácia deste método para a análise de comunidades microbianas tem sido demonstrada por diferentes grupos de pesquisa (HEWSON et al., 2004; KENT, et al., 2004; YANNARELL E TRIPLETT, 2005; GONZÁLEZ et al. 2003; RANJARD et al. 2000).

Construção e sequenciamento de bibliotecas de clones

A técnica de construção e sequenciamento de bibliotecas de clones de genes é uma ferramenta de alta sensibilidade no estudo de comunidades microbianas (SCHLOSS E HANDELSMAN, 2005). No entanto, a maioria dos trabalhos utiliza como alvo os genes ribossomais, com posterior comparação entre genótipos de micro-organismos presentes em diferentes amostras. A diversidade microbiana foi acessada em vários ambientes baseando-se nos genes 16S rRNA e 18S rRNA das espécies microbianas componentes das comunidades, revelando a grande diversidade que deixa de ser explorada quando apenas os métodos baseados em cultivo são aplicados (HEAD et al., 1998; PROSSER et al., 2007). No entanto, o estudo focado nestes genes não fornece dados sobre a funcionalidade do grupo ou espécie microbiana no ambiente avaliado.

Diversos grupos microbianos funcionais têm sido estudados por meio da clonagem e sequenciamento de *amplicons* provenientes de DNA de amostras ambientais. Para suprir informações mais correlatas com a funcionalidade de grupos microbianos, novos genes vêm sendo utilizados em estudos de ecologia molecular, sendo alvo para o desenvolvimento de *primers* específicos. Estes *primers* permitem o estudo da diversidade do grupo funcional no ambiente, seja por meio de *fingerprint* ou por sequenciamento de bibliotecas de clones.

Os três Domínios

Em 1977, Carl Woese propôs que a classificação dos seres vivos fosse substituída por um esquema baseado em três Domínios: *Bacteria*, *Archaea* e *Eucarya*, sendo os dois primeiros exclusivamente microbianos e compostos por células procarióticas. O terceiro Domínio, o *Eukarya*, englobaria todos os organismos eucariotos, incluindo os micro-organismos do grupo dos fungos e protozoários. Os genes que codificam para a formação do rRNA foram usados como base para estes estudos por serem essenciais para a sobrevivência de todos os organismos e altamente conservados em procariotos e eucariotos.

A árvore filogenética universal evidencia que o Domínio *Eucarya* não apresenta origem recente e que é tão antigo quanto as linhagens procarióticas (Figura 1). A árvore mostra também que a evolução inicial a partir do ancestral comum se deu inicialmente em duas direções, *Bacteria* versus *Archaea-Eucarya*. Mais tarde, *Archaea* e *Eucarya* divergiram e produziram duas linhagens principais. Portanto, *Archaea* e *Eucarya* são filogeneticamente mais relacionados entre si do que qualquer um destes Domínios com *Bacteria*.

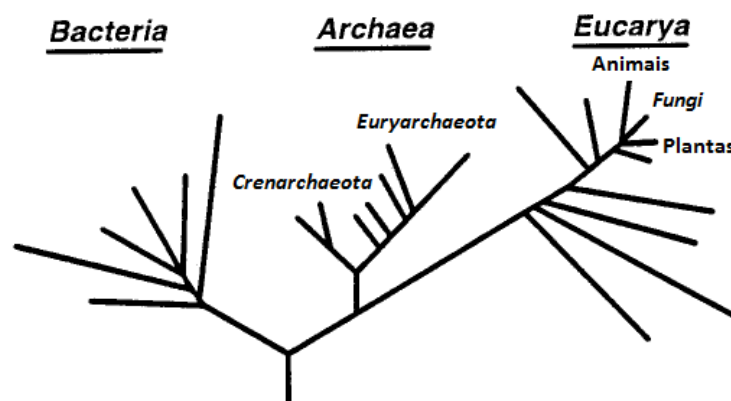


Figura 1.1 - Árvore filogenética universal inferida com base em análise comparativa de sequências de rRNA (Adaptado de Woese, 2000)

Membros do Domínio *Bacteria* desempenham um importante papel nas atividades de decomposição, transformação de nutrientes e outros processos biogeoquímicos relacionados à

manutenção da capacidade produtiva dos solos em diversos ambientes (CURY, 2006). Estima-se que é conhecido apenas 1% das bactérias presentes no solo, no entanto, esta porcentagem vem aumentando nos últimos anos em virtude do desenvolvimento de técnicas moleculares. Estudos empregando tais técnicas têm revelado que alguns grupos de *Bacteria* apresentam distribuição cosmopolita, ao passo que outros parecem estar restritos a ambientes particulares (SCHLEGEL E JANNASCH, 1992). Recentemente têm sido constatadas mudanças significativas nas estruturas de comunidades bacterianas em solos da Amazônia Ocidental sob efeito antropogênico de desmatamento e uso da terra com cultivo agrícola tradicional e pastagem, revelando a sensibilidade de diferentes grupos bacterianos às mudanças nos sistemas de uso da terra (JESUS et al., 2009).

Embora haja alguns relatos abordando a diversidade de *Archaea* de zonas climáticas tropicais (LEADBETTER E BREZNAK, 1996; DONOVAN et al., 2004; WINTER et al., 2004; PAZINATO, 2007) a compreensão destas comunidades e suas funções nos ecossistemas é ainda incipiente. Membros do Domínio *Archaea* compreendem uma fração significativa do total da microbiota do solo, representando 10% dos filotipos analisados pelo rDNA total, capaz de ter uma grande participação nos ciclos energéticos globais (ROBERTSON et al., 2005), principalmente na transformação de carbono e nitrogênio (GATTINGER et al., 2006). Filotipos de *Archaea* têm sido identificados em uma variedade de *habitats* microbianos, incluindo solos sob agricultura (GATTINGER et al., 2006), floresta (BINTRIM et al., 1997; BORNEMAN E TRIPLETT, 1997; JURGENS et al., 1999; PESARO E WIDMER, 2002; JURGENS et al., 1997), pastagem (NICOL et al., 2003a; NICOL et al., 2003b), solos de mangue e marisma (CURY, 2006) e Terra Preta de Índio da Amazônia Oriental (PAZINATO, 2007).

Algumas *Archaea* podem conter o gene que codifica para a subunidade da enzima monoxigenase de amônia (*amoA*). Estudos metagenômicos recentes têm revelado a existência da subunidade da enzima monoxigenase de amônia derivada de *Crenarchaeota* presentes em diferentes ambientes naturais (VENTER et al., 2004; FRANCIS et al., 2005; CHEN, et al., 2008). A oxidação da amônia é o primeiro passo da nitrificação, um processo chave no ciclo global do nitrogênio que resulta na formação de nitrato através de atividade microbiana. Leininger et al. (2006) mostraram que as *Archaea* predominam entre os procariotos oxidadores de amônia nos solos.

Dentre os componentes do ecossistema solo há também uma diversa comunidade composta por grupos de fungos, dentre os quais se incluem os chamados microfungos. O termo microfungo assume apenas um caráter prático, sendo amplamente empregado por micologistas ou microbiologistas, não apresentando significado taxonômico ou filogenético. Esse grupo é composto por zigomicetos, ascomicetos com corpos de frutificação menores que 2 mm e por fases conidiais ou assexuadas de ascomicetos e basidiomicetos tradicionalmente denominadas de *fungi imperfecti* ou deuteromicetos (ABREU E PFENNING, 2008). A função dos fungos no solo é complexa e fundamental para este ecossistema e inclui a decomposição de matéria orgânica e a reciclagem de nutrientes (ANDERSON E CAIRNEY, 2004; BRIDGE E SPOONER, 2001). Atualmente não há investigações sobre microfungos do solo com uma identificação precisa das espécies que permitem desenhar uma figura consistente a respeito das comunidades presentes em solos agrícolas e florestais. Para regiões de clima temperado há disponível uma série de estudos clássicos que comparam a diversidade de espécies e a frequência de isolamento em solos sob diferentes tipos de uso ou impacto humano (WIDDEN E PARKINSON, 1973; CRISTENSEN, 1981; WIDDEN, 1986; BRODIE et al., 2003). Como o tipo de serrapilheira influencia o processo de decomposição pelos fungos, é difícil prever uma comunidade específica em solos sob florestas tropicais (KJØLLER E STRUWE, 1982). As estruturas, a dinâmica e a diversidade de comunidades fúngicas do solo são pouco conhecidas devido à relutância de muitos fungos crescer em meio de cultura, particularmente as micorrizas (VAN ELSAS et al., 2000). Além disso, os poucos gêneros e nichos ecológicos estudados não fornecem informações adicionais ao que já se sabe a respeito dos 5-10% dos fungos conhecidos na Terra (HAWKSWORTH, 2001).

Conforme apresentado, os micro-organismos do solo são responsáveis por atividades essenciais associadas à sustentabilidade dos ecossistemas. Dessa forma, avaliar o impacto de mudanças no ambiente do solo sobre populações e comunidades de micro-organismos torna-se importante não só para o manejo do solo, mas também para o delineamento de práticas que favoreçam a funcionalidade dos agroecossistemas e a produtividade agrícola sustentável.

Neste sentido, este trabalho esteve inserido em um projeto mais amplo de cooperação internacional intitulado “*Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity/CSM-BGBD*” (Projeto GF/2715-02), implementado pela *United Nations Environment Programmer* (UNEP) e executado em sete países: Brasil, Costa do Marfim, Índia,

Indonésia, Quênia, México e Uganda. No Brasil, o projeto é denominado *BiosBrasil*, nome dado também ao grupo de pesquisa do CNPq.

O objetivo geral do trabalho aqui apresentado foi determinar as estruturas de comunidades de *Archaea*, *Bacteria* e microfungos e conhecer a diversidade de *Archaea* oxidadoras de amônia (AOA) em solos sob floresta primária tropical, cultivo agrícola tradicional (roça de mandioca), pastagem implantada há mais de 30 anos e floresta secundária em estágio avançado de regeneração (>10 anos de abandono da área) em uma paisagem mosaico na região do Alto Solimões, Amazônia Ocidental.

Mais especificamente, a primeira parte deste trabalho propôs-se avaliar a similaridade das estruturas de comunidades de *Archaea*, *Bacteria* e microfungos presentes em solos sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental utilizando as técnicas moleculares de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) e Análise Automatizada do Espaço Intergênico Ribossomal (ARISA). A segunda parte objetivou medir a diversidade e realizar inferências filogenéticas a partir de sequências do gene *amoA* de membros do Domínio *Archaea* presentes em solos sob diferentes usos na Amazônia Ocidental.

Referências

- ABREU, L.M.; PFENNING, L.H. Diversidade de microfungos em solos tropicais. In: MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: Ed. UFLA, 2008, chap. 14, p. 445-481.
- ALVIM, P.T. Floresta Amazônica: equilíbrio entre utilização e conservação. Espaço, ambiente e planejamento. ILHEUS:CEPLAC/CEPEC, 1997. 20p.
- ANDERSON, I.C.; CAIRNEY, J.W.G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 8, p. 769-779, 2004.
- BALLARD, R.A.; CHARMAN, N.; MCINNES, A.; DAVIDSON, J.A. Size, symbiotic effectiveness and genetic diversity of feald pea rhizobia (*Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*) populations in South Australian soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1347-1355, 2004.
- BARBERI, A. **Ocorrência, eficiência e diversidade de bactérias que nodulam feijoeiro em solos submetidos a diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental**. 2007. 144 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- BINTRIM, S.B.; DONOHUE, T.J.; HANDELSMAN, J.; ROBERTS, G.P.; GOODMAN, R.M. Molecular phylogeny of Archaea from soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 94, p. 277-282, 1997.
- BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E.W. Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 2647-2653, 1997.
- BRIDGE, P.; SPOONER, B. Soil fungi: diversity and detection. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 232, n. 1/2, p. 147-154, 2001.
- BRODIE, E.; EDWARDS, S.; CLIPSON, N. Soil fungal community structure in a temperate upland grassland soil. **Microbiol Ecology**, New York, v. 45, p. 105-114, 2003.
- BUCKLEY, D.H.; SCHMIDT, T.M. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 5, p. 441-452, 2003.

- CARDINALE, M.; BRUSETTI, L.; QUATRINI, P.; BORIN, S.; PUGLIA, A.M.; RIZZI, A.; ZANARDINI, E.; SORLINI, C.; CORSELLI, C.; DAFFONCHIO, D. Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 6147-6156, 2004.
- CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; NACAMULLI, C.; TABACCHIONI, S. Influence of plant development, cultivar and soil type on microbial colonization of maize roots. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 8, p. 11-18, 1998.
- CLEGG, C.D.; LOVELL, R.D.L.; HOBBS, P.J. The impact of grassland management regime on the community structure of selected bacterial groups in soils. **Microbial Ecology**, Amsterdam, v. 43, p. 263-270, 2003.
- CHEN, X.P.; ZHU, Y.G.; XIA, Y.; SHEN, J.P.; HE, J.Z. Ammonia-oxidizing archaea: important players in paddy rhizosphere soil? **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 10, n. 8, p. 1978-1987, 2008.
- CHRISTENSEN, M. Species diversity and dominance in fungal communities. In: WICKLOW, D.T.; CARROL, G.C. (Ed.) **The fungal community, its organization and role in ecosystem**. New York: Marcel Dekker, 1981. p. 201-232.
- CURY, C.J. **Diversidade de Bacteria e Archaea em solos de mangue e marisma**. 2006. 151 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL. **Projeto RadamBrasil**. Folha SB. 19 – Juruá: geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra. Levantamento de recursos minerais, Rio de Janeiro, 1977. 436 p.
- DONOVAN, S.E.; PURDY, K.J.; KANE, M.D.; EGGLETON, P. Comparison of *Euryarchaea* strains in the guts and food-soil of the soil-feeding termite *Cubitermes fungifaber* across different soil types. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 3884-3892, 2004.
- FELSKE, A.; WOLTERINK, A.; VAN LIS, R.; DE VOS, W.M.; AKKERMANS, A.D.L. Response of a soil bacterial community to grassland succession as monitoring by 16S rRNA levels of the predominant ribotypes **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3998-4003, 2000.
- FIDALGO, E.C.C.; COELHO, M.R.; ARAUJO, F.O.; MOREIRA, F.M.S.; SANTOS, H.G.; BREFIN, M.L.M.S.; HUISING, J. **Levantamento do uso e cobertura da terra de seis áreas amostrais relacionadas ao projeto BiosBrasil (Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity: Phase I), Município de Benjamin Constant (AM)**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2005. (Boletim De Pesquisa E Desenvolvimento/Embrapa Solos, ISSN 1678-0892; 71).

- FISHER, M.M.; TRIPLETT, E.W. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 4630-4636, 1999.
- FRANCIS, C.A.; ROBERTS, K.J.; BEMAN, J.M.; SANTORO, A.E.; OAKLEY, B.B. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.102, p.683-688, 2005.
- GASPAROTO, L.; PEREIRA, F.A.; LIMA, M.I.P.M. **Enfermidade da seringueira no Brasil**. Manaus: EMBRAPA, CCAA, 1990. 169 p. (Circular Técnica, 3).
- GATTINGER, A.; ELHOTTOVA, D.; LABRENZ, M.; WAGNER, D.; MUNCH, J.C.; SCHLOTTER, M. Structure and function of archaeal communities in natural and agriculturally used soil ecosystems. **Geophysical Research Abstracts**, Katlenburg-Lindau, v. 80, p. 6426, 2006.
- GONZÁLEZ, N.; ROMERO, J.; ESPEJO, R.T. Comprehensive detection of bacterial populations by PCR amplification of the 16S-23S rRNA spacer region. **Journal of Microbiological Methods**, Netherlands, v. 55, p. 91-97, 2003.
- GRAYSTON, S.J.; CAMPBELL, C.D.; BARDGETT, R.D.; MAWDSLEY, J.L.; CLEGG, C.D.; RITZ, K.; GRIFFITHS, B.S.; RODWELL, J.S.; EDWARDS, S.J.; DAVIES, W.J. Assessing shifts in microbial community structure across a range of grassland of differing management intensity using CLPP, PLFA and community DNA techniques. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 25, p. 63-84, 2004.
- GÜRTLER, V.; STANISICH, V.A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region. **Microbiology**, New York, v. 142, p. 3-16, 1996.
- HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, New York, v. 105, n. 4, p. 1422-1432, 2001.
- HEAD, I.M.; SAUNDERS, J.R.; PICKUP R.W. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **FEMS Microbial Ecology**, Amsterdam, v. 35, p. 1-21, 1998.
- HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P. SMALLA, K., WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3233-3241, 1997.
- HEWSON, I.; FUHRMAN, J.A. Richness and diversity of bacterioplankton species along an estuarine gradient in Moreton Bay, Australia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, p. 3425-3433, 2004.

HOMMA, A.K.O.; CONTO, A.J.; FERREIRA, C.A.P.; CARVALHO, R.A.; WALKER, R.T. A dinâmica da extração madeireira no Estado do Pará. In: HOMMA, A.K.O. (Ed). **Amazônia, meio ambiente e desenvolvimento agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 1998, p. 298-307.

IBEKWE, A.M.; KENNEDY, A.C.; FROHNE, P.S.; PAPIERNIK, S.K.; YANG, C.H.; CROWLEY, D.E. Microbial diversity along a transect of agronomic zones. **FEMS Microbial Ecology**, Amsterdam, v. 39, p. 183-191, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Projeto PRODES: Monitoramento da Floresta Amazônica Brasileira por Satélite**. Disponível em:

<<http://www.dpi.inpe.br/prodesdigital/prodesmunicipal.php>>. Acesso em: 23 out. 2007.

JESUS, E.C.; MARSH, T.L.; TIEDJE, J.M.; MOREIRA, F.M.S. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **International Society for Microbial Ecology Journal**, on-line, 2009.

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, p. 279-303, 2003.

JURGENS, G.; LINDSTROM, K.; SAANO, A. Novel Group within the Kingdom *Crenarchaeota* from Boreal Forest Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 2, p. 803-805, 1997.

JURGENS, G.; SAANO, A. Diversity of soil *Archaea* in boreal forest before, and after clear-cutting and prescribed burning. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 29, p. 205-213, 1999.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; SANTOS, J.C.P.; BERTON-JUNIOR, J.F. Differences in common bean rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 87, p. 205-217, 2006.

KENT, A.D.; JONES, S.E.; YANNARELL, A.C.; GRAHAM, J.M.; LAUSTER, G.H.; KRATZ, T.K.; TRIPLETT, E.W. Annual patterns in bacterioplankton community variability in a humic lake. **FEMS Microbial Ecology**, Amsterdam, v. 48, p. 550-560, 2004.

KJØLLER, A.; STRUWE, S. Microfungi in ecosystems, fungal occurrence and activity in litter and soil. **Oikos**, Lund, v. 39, p. 391-422, 1982.

KOWALCHUK, G.A.; BUMA, D.S.; de BOER, W.; KLINKHAMER, P.G.L.; van VEEN, J.A. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganism. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**. New York, v. 81, p. 509-521, 2002.

LEADBETTER, J.R.; BREZNAK, J.A. Physiological ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov. and *Methanobrevibacter curvatus* sp. nov., isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 3620-3631, 1996.

LEININGER, S.; URICH, T.; SCHLOTTER, M.; SCHWARK, L.; QI, J.; NICOL, G.W.; PROSSER, J.I.; SCHUSTER, S.C.; SCHLEPER, C. *Archaea* predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. **Nature**, London, v. 442, n. 17, p.806-809, 2006.

LORENA, R.B. **Evolução do uso da terra em porção da Amazônia Ocidental (Acre), com uso de técnicas de detecção de mudanças**. 2003. 116 p. Dissertação (Mestrado em Sensoriamento Remoto) – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, 2003.

MALIK, S.; BEER, M.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. **Environment International**, Amsterdam, v.34, p. 265-276, 2008.

McCAIG, A.E.; GLOVER, L.A.; PROSSER, J.I. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimens by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4554-4559, 2001.

MELLONI, R.; MOREIRA, F.S.M.; NÓBREGA, R.S.A.; SIQUEIRA, J.O. Efficiency and phenotypic diversity among nitrogen-fixing bacteria that nodulate cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in bauxite-mined soils under rehabilitation. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 2, p. 235-246, 2006.

MORRIS, C.E.; BARDIN, M.; BERGE, O.; FREY-KLETT, FROMIN, N.; GIRARDIN, H.; GUINEBRETIERE, M.-H.; LEBARON, P.; THIERY, J.M.; TROUSSELLIER, M. Microbial biodiversity: approaches to experimental design and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, p. 592-616, 2002.

MUYZER, G.;E.C. DEWAAL, A.G. UITTERLINDEN. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S ribosomal RNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

MYERS, R.M.; FISCHER, S.G.; LERMAN, L. S.; MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 13, p. 3131-3145, 1985.

NEPSTAD, D.C.; UHL, C.; SERRÃO, E.A.S. Recuperation of a degraded Amazonian landscape: forest recovery and agricultural restoration. **Ambio**, Lawrence, v. 20, n. 6, p. 248-255, 1991.

NICOL, G.W.; GLOVER, L.A.; PROSSER, J.I. Spatial analysis of archaeal community structure in grassland soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.69, n. 12, p. 7420-7429, 2003a.

_____. The impact of grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 5, n. 3, p. 152-162, 2003b.

NOGUEIRA, M.A.; ALBINO, U.B.; BRANDÃO-JUNIOR, O.; BRAUN, G.; CRUZ, M.F.; DIAS, B.A.; DUARTE, R.T.D.; GIOPPO, N.M.R.; MENNA, P.; ORLANDI, J.M.; RAIMAM, M.P.; RAMPAZO, L.G.L.; SANTOS, M.A.; SILVA, M.E.Z.; VIEIRA, F.P.; TOREZAN, J.M.D.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, G. Promising indicators for assessment of agroecosystems alteration among natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. Amsterdam, v. 115, p. 237-247, 2006.

OLIVEIRA, V.M.; MANFIO, G.P.; COUTINHO, H.L.C; KEIJZER-WOLTERS, A.C.; VAN ELSAS, J.D. A ribosomal RNA gene intergenic spacer based PCR and DGGE fingerprinting method for the analysis of specific rhizobial communities in soil. **Journal of Microbiological Methods**, Netherlands, v. 64, p. 366-379, 2006.

PAZINATO, J.M. **Isolamento e identificação de microrganismos metanogênicos em solos de Terra Preta Antropogênica (TPA) e de várzea (Gleissolos) da Amazônia Oriental**. 2007. 187 p. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

PEIXOTO, R.S.; COUTINHO, H.L.C.; MADARI, B.; MACHADO, P.L.O.A.; RUMJANEK, N.G.; VAN ELSAS, J.D.; SELDIN, L.; ROSADO, A.S. Soil aggregation and bacterial community structure as affected by tillage and cover cropping in the Brazilian Cerrados. **Soil and Tillage Research**. Amsterdam, v. 90, p. 16-28, 2006.

PESARO, M.; WIDMER, F. Identification of novel *Crenarchaeota* and *Euryarchaeota* clusters associated with different depth layers of a forest soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 42, p. 89-98, 2002.

PROSSER, J.I.; BOHANNAN, B.J.M.; CURTIS, T.P.; ELLIS, R.J.; FIRESTONE, M.K.; FRECKLETON, R.P.; GREEN, J.L.; GREEN, L.E., KILLHAM, K.; LENNON, J.J., OSBORN, A.M.; SOLAN, M.; VAN DER GAST, C.J.; YOUNG, J.P.W. Essay - The role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 384-392, 2007.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, p. 167-177, 2000.

ROBERTSON, C.E.; HARRIS, J.K.; SPEAR, J.R.; PACE, N.R. Phylogenetic diversity and ecology of environmental Archaea. **Opinion in Microbiology**, London, v. 8, p. 638-642, 2005.

ROBLETO, E. A.; BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Effects of bacterial antibiotic production on rhizosphere microbial communities from a culture independent perspective. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 5020-5022, 1998.

SAUDER, S.C.; MISLIVETS, M.O.R.; CHEN, J.; CLELAND, D.T. Effects of roads on landscape structure within nested ecological units of the Northern Great lakes Region, USA. **Biological Conservation**, Newins-Ziegler, v. 103, p. 209-225, 2002.

SCHLEGEL, H.G.; JANNASCH, H.W. Prokaryotes and their habitats. In: BALLOWS, A.; TRUPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. (Ed.). **The prokaryotes**. New York, v. 1, p. 75-125, 1992.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, E.J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 3, p.1501-1506, 2005.

SERRÃO, E.A.S.; HOMMA, A.K.O. Agriculture in the Amazon: The question of sustainability. Committee for Agriculture Sustainability and the Environment in the Humid Tropics. **National Research Council**, Washington, DC, p. 85, 1991.

SMALLA, K.; WIELAND, G.; BUCHNER, A.; ZOCK, A.; PARZY, J.; KAISER, S.; ROSKOT, N.; HEUER, H.; BERG, G. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: Plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4742-4751, 2001.

STEENWERTH, K.L.; JACKSON, L.E.; CALDERON, F.J.; STROMBERG, M.R.; SCOW, K.M. Soil microbial community composition and land use history in cultivated and grassland ecosystems of coastal California. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 34, p. 1599-1611, 2002.

TORSVIK, V.; DAAE, F.L.; SANDAA, R.A.; ØVREÅS, L. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. **Journal of Biotechnology**, Germany, v. 64, p. 53-62, 1998.

VALLAEYS, T.; TOPP, E.; MUYZER, G.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G.; RIGAUD, A.; SOULAS, G. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 24, p. 279-285, 1997.

VAN ELSAS, J.D.; DUARTE, G.F.; WOLTERS, A.K.; SMIT, E. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, Netherlands, v. 43, n. 2, p. 133-151, 2000.

VENTER, J.C.; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J.F.; HALPERN, A.L.; RUSCH, D.; EISEN, J.A.; WU, D.; PAULSEN, I.; NELSON, K.E.W.; FOUTS, D.E.; LEVY, S.; KNAP, A.H.; LOMAS, M.W.; NEALSON, K.; WHITE, O.; PETERSON, J.; HOFFMAN, J.; PARSONS, R.; BADEN-TILLSON, H.; PFANNKOCH, C.; ROGERS, Y.H.; SMITH, H.O. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. **Science**, Washington, v. 304, p. 66-74, 2004.

YANNARELL, A.C.; TRIPLETT, E.W. Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 227-239, 2005.

YOUNG, A. **Agroforestry for soil conservation**. Wallingford, UK: CAB International; ICRAF, 1989. 276 p.

WAID, J.S. Does soil biodiversity depend upon metabiotic activity and influences? **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 13, p. 151-158, 1999.

WIDDEN, P. Microfungal community structure from forest soils in southern Quebec, using discriminant function and factor analysis. **Canadian Journal of Botany**, Guelph, v. 64, p. 1402-1412, 1986.

WIDDEN, P.; PARKINSON, D. Fungi from Canadian coniferous forest soils. **Canadian Journal of Botany**, Guelph, v. 51, p. 2275-2290, 1973.

WINTER, C.; SMIT, A.; HERNDL, G.J.; WEINBAUER, M.G. Impact of virioplankton on archaeal and bacterial community richness as assessed in seawater batch cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 804-813, 2004.

WOESE, C.R. Interpreting the universal phylogenetic tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 97, n. 15, p. 8392-8396, 2000.

2 ESTRUTURAS DE COMUNIDADES MICROBIANAS DO SOLO SOB DIFERENTES USOS DA TERRA NA AMAZÔNIA OCIDENTAL

Resumo

O objetivo desta parte do trabalho foi determinar as estruturas de comunidades microbianas presentes em solos sob floresta primária tropical, cultivo agrícola tradicional (roça de mandioca), pastagem implantada há mais de 30 anos e floresta secundária em estágio avançado de regeneração (>10 anos de abandono da área) em uma paisagem antropizada na Amazônia Ocidental brasileira. Amostras de solo foram coletadas a 0-20 cm de profundidade no município de Benjamin Constant, estado do Amazonas, usando informações provenientes do manejo local da terra confirmadas por imagens de sensoriamento remoto. As estruturas das comunidades de *Archaea*, *Bacteria* e microfungos foram analisadas por DGGE, ARISA, clonagem e sequenciamento de *amplicons* separados em géis de DGGE. A análise dos dados através de técnicas estatísticas multivariadas mostrou que as comunidades microbianas diferiram em estrutura e que essas diferenças estiveram relacionadas ao uso da terra e mudanças em vários atributos do solo, especialmente aqueles associados com algumas propriedades físicas, tais como teor de silte e areia, e químicas (pH, saturação por base e Ca^{+2}). O efeito do desmatamento e uso da terra com atividades agrícolas e pecuária mostrou-se capaz de alterar a riqueza de filotipos das comunidades microbianas dos solos sob floresta primária tropical da Amazônia, de modo que um maior número de *amplicons* foi detectado em solos sob cultivo agrícola tradicional e pastagem. Maior número de picos foi observado nos eletroferogramas gerados com ARISA, se comparado ao número de *amplicons* separado nos perfis de DGGE. O sequenciamento de bandas excisadas dos géis de DGGE de *Archaea* e *Bacteria* revelou membros dominantes comuns para as comunidades dos solos sob os diferentes usos da terra nos dois anos de amostragem. Por fim, os resultados permitiram concluir que o uso da terra tem um grande efeito sobre as estruturas de comunidades microbianas presentes no solo e sugerem que um longo período de abandono das áreas é necessário para superar esse efeito e cumprir com a resiliência dos ecossistemas amazônicos no contexto de recomposição da paisagem.

Palavras-chave: *Archaea*; *Bacteria*; Microfungos; Usos da terra; Amazônia; DGGE; ARISA

SOIL MICROBIAL COMMUNITY STRUCTURE UNDER DIFFERENT LAND USE IN WESTERN AMAZON

Abstract

The objective of this part was to determine the microbial community structure present in soils under tropical rainforest, traditional agriculture cultivation (manioc), pasture established for over 30 years and secondary forest at later stage of regeneration (>10 years abandoned) in mosaic landscape in the Brazilian Western Amazon. Soil samples were collected at 0-20 cm depth in the municipality of Benjamin Constant, Amazonas State, using information from the local land management confirmed by satellite image. The community structure of *Archaea*, *Bacteria* and microfungi were analyzed by DGGE, ARISA, cloning and amplicons sequencing separated in DGGE gels. The data analysis with multivariate statistics techniques showed that microbial communities differ in structure and that these differences were related to land use and changes in several soil attributes, especially those associated with some physical properties, such as silt and sand content, and chemical (pH, base saturation and Ca^{+2}). The effect of deforestation and land use with agricultural and pasture activities were able to change the richness of phylotypes of the soil microbial communities under Amazonian tropical rainforest, being detected a higher number of amplicons in soils under traditional agriculture cultivation and pasture. Higher number of peaks were observed in the eletropherograms produced with ARISA, when compared to the number of amplicons separated by DGGE. The sequencing of the gel excised bands of DGGE of *Archaea* and *Bacteria* revealed common dominant members to the soil communities under different land use in the two years of sampling. In conclusion, the results allowed to conclude that land use has a great effect on microbial community structure present in the soil and suggest that long period of abandon of the areas is necessary to overcome this effect and accomplish with the resilience of Amazonian ecosystems in the context of landscape recomposition.

Keywords: *Archaea*; *Bacteria*; Microfungi; Land use; Amazon; DGGE; ARISA

2.1 Introdução

Estudos sobre diversidade biológica têm mostrado que as espécies se distribuem desigualmente pela superfície da Terra, mas a magnitude da diferença entre a diversidade tropical e aquela encontrada em ambientes temperados é claramente ilustrada ao considerarmos a Amazônia. Os ecossistemas amazônicos abrigam grande parte da biodiversidade do planeta, mas pouco se conhece sobre a composição das comunidades microbianas ou como elas são impactadas pelas atividades antrópicas de desmatamento e uso da terra com cultivo agrícola tradicional e pastagem.

Mudanças nas estruturas de comunidades biológicas do solo podem afetar as funções por elas realizadas e, conseqüentemente, a sustentabilidade do ecossistema. A atividade e diversidade dos micro-organismos do solo são diretamente influenciadas pelas mudanças em seus *habitats*. Alterações no teor de água (BOSSIO E SCOW, 1998), pH (FIERER E JACKSON, 2006), tipo de solo, propriedades de campo (WU et al., 2008), composição e diversidade de plantas (CARNEY E MATSON, 2006) têm mostrado influenciar a composição das comunidades microbianas. Assim, enquanto os diferentes usos da terra afetam a diversidade e a estrutura de comunidades microbianas do solo, a resposta específica de vários grupos microbianos a essas mudanças no ambiente ainda é pouca compreendida (BUCKLEY E SCHMIDT, 2001).

Várias abordagens têm sido empregadas para realizar a avaliação da diversidade de populações e comunidades microbianas de interesse presentes no solo, tais como a determinação da biomassa, a medição da atividade bioquímica, o cultivo dos organismos e o emprego de técnicas moleculares independentes de cultivo (MOREIRA et al., 2008).

Os métodos moleculares têm revolucionado o estudo dos micro-organismos e de suas atividades. A habilidade de extrair DNA ou RNA de células presentes em amostras de solo e a análise direta desses ácidos nucléicos em experimentos de hibridização ou uso em reações de PCR têm permitido detectar a presença de uma vasta diversidade de micro-organismos previamente inimaginável. A aplicação dessas técnicas para o estudo de comunidades microbianas tem superado as limitações inerentes ao enriquecimento tradicional e técnicas de isolamento, possibilitando, assim, a detecção de organismos ainda não cultivados.

Sem dúvida os alvos mais comuns para a caracterização das comunidades microbianas são as sequências do gene RNA ribossomal (*rrn* operon). Estas sequências são as menores subunidades (SSU) do gene rRNA, 16S em procariotos e 18S em eucariotos; as maiores subunidades (LSU) do gene rRNA, 23S em procarioto e 28S em eucarioto; ou a caracterização dessas comunidades é feita pela variabilidade do comprimento do espaço intergênico entre as subunidades SSU e LSU. Outros alvos definidos são genes que codificam para funções ecológicas específicas (ROTTHAUWE et al., 1997).

O objetivo de muitas técnicas moleculares é descrever as populações biológicas por meio da riqueza de táxons. A avaliação da abundância de diferentes taxas por meio dessas técnicas é dificultada por implicações decorrentes das etapas de extração de ácidos nucléicos e ampliações por PCR. Além do mais, esses métodos ainda não são refinados ao ponto de considerar que a função pode não ser ambigualmente nomeada por diferentes taxas. Portanto, métodos moleculares devem ser usados em concordância com outras técnicas para alcançar uma compreensão mais holística da estrutura e função das comunidades microbianas do solo (THIES, 2004).

As técnicas de *fingerprinting* fornecem uma visão global da estrutura genética da comunidade microbiana. De uma maneira simplificada, a diversidade das sequências de DNA obtidas a partir da amostra ambiental é estimada através da migração eletroforética diferencial em géis de agarose e acrilamida ou por eletroforese capilar automatizada, em função do tamanho ou composição das sequências. O *fingerprinting* genético fornece um perfil de bandas ou picos que reflete a complexidade da comunidade microbiana analisada. Entretanto, estes perfis não podem ser diretamente interpretados em termos de riqueza e abundância, uma vez que uma mesma banda ou pico pode ser originado de diferentes espécies, e/ou uma célula pode ser representada por várias bandas ou picos. Assim, as técnicas de *fingerprinting* são especialmente adequadas para a comparação de comunidades. Os perfis de bandas e picos podem ser analisados em termos de similaridade e as relações podem ser representadas por um dendrograma. Desta maneira, correlações entre alterações na estrutura genética de comunidades microbianas e variáveis ambientais podem ser estabelecidas.

A aplicação destas técnicas em estudos de ecologia microbiana vem sendo amplamente disseminada nos últimos anos, uma vez que estas metodologias são relativamente fáceis de realizar, permitindo a análise simultânea de múltiplas amostras ambientais.

A técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) tem sido frequentemente aplicada em ecologia microbiana para comparar as complexas estruturas de comunidades e para estudar suas dinâmicas (ØVREÅS et al., 1997; el FANTROUSSI et al., 1999; HEUER et al., 1999; MUYZER E SMALLA, 1998). Uma vantagem que a análise de DGGE apresenta sobre a análise de T-RFLP (do inglês, *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) é que *amplicons* de interesse revelados em um gel podem ser excisados e sequenciados, obtendo, assim, informação taxonômica e/ou filogenética sobre os membros amplificáveis da comunidade presente no solo. Muyzer et al. (1993) sugeriram que análises de DGGE de fragmentos de rDNA amplificados por PCR geram *fingerprinting* dos constituintes mais dominantes de populações microbianas mistas quando são utilizados *primers* que se anelam a regiões conservadas do gene rRNA.

Outra técnica molecular que tem se mostrado adequada para a análise de comunidades microbianas é a Análise do Espaço Intergênico Ribossomal (ARISA), desenvolvida por Fisher e Triplett (1999). Nesta técnica, a região do espaço intergênico ribossomal entre a menor e a maior subunidade do gene rRNA (16S e 23S rRNA em procariotos e 18S e 28S em eucariotos) é amplificada com um *primer* marcado com fluorescência, o qual permite a detecção desses fragmentos em um sequenciador (FISHER & TRIPLETT, 1999). Essas regiões possuem comprimento e sequências variáveis entre espécies devido ao número variável de unidades funcionais presentes (LOUGHNEY et al., 1982; CHUN et al., 2002; GARCÍA-MARTINEZ et al., 2000).

Neste estudo, as estruturas de comunidades de *Archaea*, *Bacteria* e microfungos presentes em solos sob floresta primária tropical, cultivo agrícola tradicional, pastagem e floresta secundária em estágio avançado de regeneração na Amazônia Ocidental brasileira foram analisadas usando Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante baseada nos genes 16S rRNA de *Archaea* e *Bacteria* e 18S rRNA de microfungos e Análise Automatizada do Espaço Intergênico Ribossomal.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e Métodos

2.2.1.1 Área de estudo e amostragem

A área de estudo está localizada entre as coordenadas geográficas 4° 21' e 4° 26' Sul e 69° 36' e 70° 1' Oeste, no município de Benjamin Constant, noroeste do estado do Amazonas, às margens do rio Solimões (Figura 2.1). Esta região, denominada de Alto Solimões, localiza-se na tríplice fronteira Brasil, Colômbia e Peru. O delineamento amostral seguiu critérios previamente estabelecidos e padronizados pelo projeto CSM-BGBD, os quais indicavam a utilização de 6 grades de amostragem com cerca de 100 pontos no total, espaçados 200 m entre si (TSBF/CIAT E GEF/UNEP, 2003). Algumas adaptações às condições amazônicas foram feitas a fim de viabilizar a amostragem de solos e de material biológico para avaliação da diversidade. A principal dessas adaptações foi relacionada à distância entre os pontos, modificada para 100 m (ou em alguns poucos casos, 50 m) de modo que todos os sistemas de cultivo estivessem adequadamente representados. As Janelas 1 e 2 localizam-se na localidade Guanabara II, as Janelas 3, 4 e 5 na localidade de Nova Aliança e a Janela 6 localiza-se próxima à sede do município de Benjamin Constant.

As janelas amostrais foram posicionadas em áreas onde predominam as florestas de terra firme. O termo “terra-firme” se aplica a todas as florestas da região amazônica que não são sazonalmente inundadas pela cheia dos rios, diferenciadas assim das florestas de várzea e igapó (RIBEIRO et al., 1999). Nas áreas utilizadas para atividade agropecuária predominam as culturas de banana e mandioca. No último Censo Agropecuário, de 1995-1996 (IBGE, 2005b), foram contabilizados 11134 hectares de áreas utilizadas no município, sendo 34,6% ocupados por lavouras, 11,4% por pastagens, 41,8% por matas ou florestas plantadas e 8,6% estavam em descanso. A produção agrícola do ano de 2002 (IBGE, 2005a) foi predominantemente de mandioca, com 1830 hectares cultivados, seguida por banana (1614 hectares) e milho (390 hectares). O rebanho bovino totalizou 2978 cabeças no município em 2002.

Os sistemas de uso da terra estudados foram caracterizados por Fidalgo et al. (2005) quanto à cobertura vegetal e o uso. Nesta classificação, foram enquadradas como *Floresta*

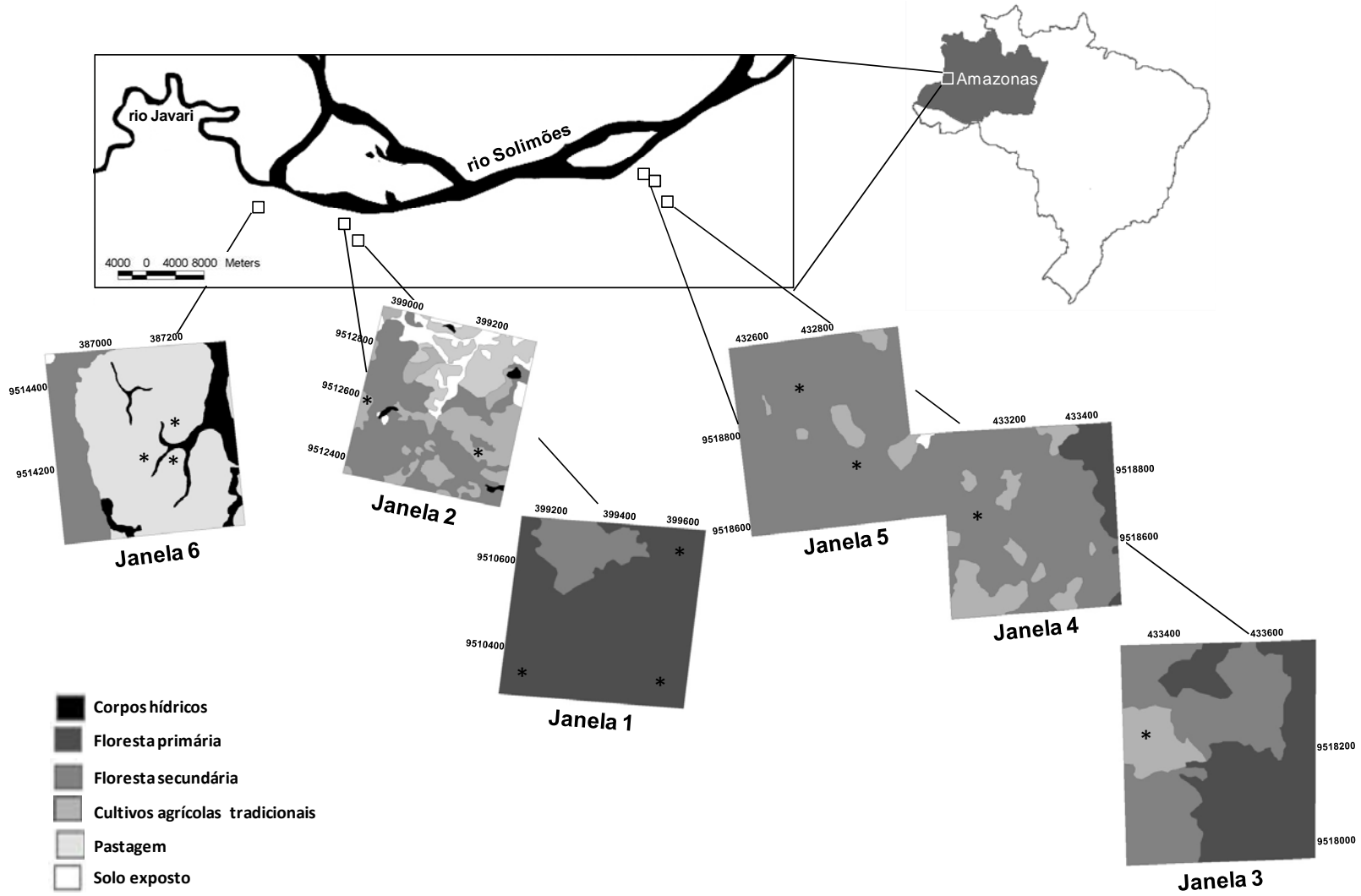


Figura 2.1 - Localização das áreas de estudo, das seis janelas e pontos de amostragem (*), na região do Alto Solimões, município de Benjamin Constant, estado do Amazonas

Primária (Floresta Tropical Aberta) áreas com formação florestal original em que se desconhecia a ocorrência de desmatamento; *Floresta Secundária em Estádio Avançado de Regeneração*, áreas florestais com 10 a 30 anos de formação; *Agricultura*, cultivos anuais e semiperenes (abacaxi, banana, cana-de-açúcar, mandioca e milho); e *Pastagem*, áreas com *Brachiaria brizantha*, *B. humidicola*, grama batatais (*Paspalum notatum flugge*) e espécies invasoras. Todas as áreas eram originalmente cobertas por formação florestal original e não foi constatado o uso de corretivos, fertilizantes e controle de pragas em nenhum dos sistemas de uso da terra estudados.

O clima da região é classificado como *Af* (classificação de Köppen), com temperatura média anual de 25,7° C e precipitação média de 2562 mm, com maior intensidade pluviométrica concentrada nos meses de dezembro a abril (Figura 2.2). Os Cambissolos predominam em extensão, correspondendo a 98% dos pontos observados em campo, ocorrendo também Alissolos e Gleissolos (FIDALGO et al., 2005). A taxa de desmatamento nesta região é baixa, devido principalmente à dificuldade de acesso e à baixa densidade populacional. As comunidades locais utilizam as terras com a prática agrícola de corte-e-queima; contudo, algumas áreas são ocupadas com pastagem como consequência de políticas governamentais implementadas durante a década de 1970.

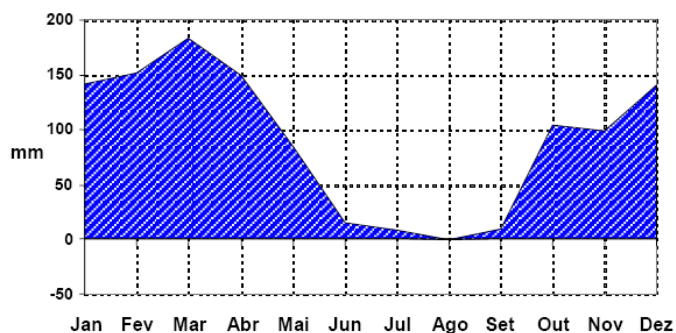


Figura 2.2 - Balanço hídrico anual segundo o método de Thornthwaite e Mather (1955), referente ao período de 1960 a 1990 para o município de Benjamin Constant (AM). Fonte: INMET apud FIDALGO et al., 2005

Na primeira quinzena de março de 2008 e na última quinzena de janeiro de 2009 (período úmido e com maior intensidade pluviométrica) amostras de solo foram coletadas nas áreas amostrais localizadas no município de Benjamin Constant, estado do Amazonas. Foram amostrados doze pontos distribuídos entre os sistemas de uso da terra da seguinte forma: 3 pontos amostrados sob floresta primária (pontos amostrais 04, 10 e 16 do projeto CSM-BGBD/BiosBrasil), 3 pontos sob cultivo agrícola tradicional (19, 23 e 37), 3 pontos sob pastagem (84, 92 e 93) e 3 pontos sob floresta secundária em estágio avançado de regeneração (60, 70₁ e 77)

Em cada ponto amostral foram coletadas amostras de solo indeformadas (com estrutura preservada) a 0-20 cm de profundidade utilizando tubos de PVC de 25 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro previamente esterilizados (Figura 2.3 A). Após a coleta, os tubos de PVC foram vedados com fita adesiva para evitar deformação e perda da amostra. Os solos foram transportados do campo sob gelo em gel até o Laboratório de Ciências do Instituto Natureza e Cultura da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), preservados em gelo seco durante a condução ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA-USP e armazenados a -80°C até o processamento para a extração do DNA total.

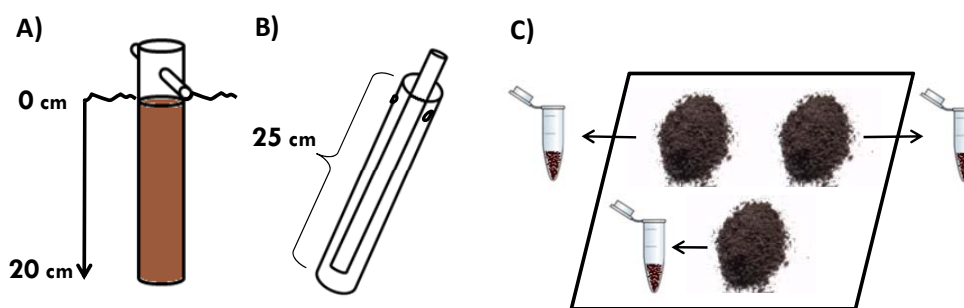


Figura 2.3 - Amostragem e sub-amostragem do solo. A. obtenção de amostra de solo indeformada em campo. B. sub-amostragem do solo em laboratório para fins de análise microbiológica. C. separação de frações do solo para extração do DNA total

Do total de solo coletado em cada ponto amostral, apenas uma sub-amostra cilíndrica retirada da porção central com o auxílio de outro tubo de PVC de 30 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro, previamente esterilizado, foi utilizada para análise microbiológica (Figura 2.3 B). O solo externo à porção central foi encaminhado ao Laboratório de Análises Químicas do Departamento de Ciência do Solo (ESALQ-USP) para análises dos atributos químicos e ao Laboratório Agrotécnico de Piracicaba (Pirasolo) para análise dos atributos físicos. O solo restante de ambas as porções foi armazenado em tubos separados a -80°C .

Cada sub-amostra de solo destinada à análise microbiológica foi deformada, homogeneizada em saco plástico e espalhada sobre folha de alumínio em três frações (Figura 2.3 C). Uma amostra de 0,25 g de solo foi coletada de cada porção e transferida para tubo *ependorf* a fim de proceder a extração do DNA total do solo. O DNA total foi extraído em triplicata para cada ponto amostral.

2.2.1.2 Extração do DNA total do solo

Para a extração do DNA total do solo utilizou-se o *Kit Power Soil DNA ExtractionTM* (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA). Brevemente, 0,25 g de solo foi adicionado em microtubos contendo granada finamente moída e as células foram lisadas por agitação horizontal a 4 ms^{-1} por 5 segundos (agitador de tubos modelo MA 162, Marconi). Após a lise celular, o DNA total do solo foi extraído de acordo com as instruções do fabricante. O DNA purificado foi quantificado por comparação com padrão de massa após eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídeo em tampão TSB (BRODY E KERN, 2004). Como padrão de tamanho e quantidade de DNA foi utilizado o marcador de massa *DNA Mass Ladder* (Invitrogen) e para verificar a integridade da molécula empregou-se λ /*Hind III* (Invitrogen).

2.2.1.3 PCR-DGGE e PCR-ARISA

Reações de PCR para uso em DGGE e ARISA foram realizadas em termociclador (modelo GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) seguindo as condições estabelecidas nos respectivos trabalhos de referência dos *primers*, com pequenas alterações quando necessário (Tabela 2.1). Todas as reações de amplificação para uso em DGGE foram preparadas para um volume final de 25 μ L, usando 2,5 μ L de tampão para PCR 10 X, 0,2 mM de cada dNTP, 5 pmoles de cada *primer*, 1 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e concentrações variáveis de MgCl₂ e DNA conforme especificado na Tabela 2.1. As reações de amplificação para discriminação usando ARISA foram preparadas nas mesmas condições especificadas acima, com equivalência para a concentração de MgCl₂ (3,0 mM) entre as reações e variações nas concentrações de DNA molde e *primer* (ver detalhe na tabela a seguir). A verificação do tamanho dos *amplicons* resultantes de cada reação foi feita por comparação com o marcador molecular *Low DNA Mass ladder* (Invitrogen) e padrão de tamanho de DNA 100 pb (Invitrogen) após corrida eletroforética a 90 V por 30 minutos em gel de agarose 1%, usando tampão SB (BRODY E KERN, 2004). Os géis foram fotodocumentados pelo programa *Kodak digital science 1D* (Scientific Imaging Systems). Os produtos de PCR-ARISA foram purificados utilizando o *kit QIAquick PCR Purification* (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante e analisados novamente em gel de agarose 1% conforme descrito acima.

2.2.1.4 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante

Análises de DGGE foram realizadas usando o sistema phorU2 (Ingeny, Leiden, The Netherlands). Utilizou-se solução tampão 0,5 X de TAE (10 mM de Tris-acetato e 0,5 mM de EDTA, pH 8,0), solução desnaturante 80% (7 M de uréia e 40% de formamida) e solução 0%, sem uréia e formamida, nas condições apresentadas na Tabela 2.2. As metodologias tiveram como base os trabalhos referenciados nesta mesma tabela, com adaptações quando necessário.

Tabela 2.1 - *Primers* utilizados nas reações de PCR, programas no termociclador e variações no preparo das reações

	Primer ^a	Especificidade e <i>rrn</i> operon	Sequência (5' → 3')	Referência	Conjunto de <i>primers</i>	Programa termociclador/variações no preparo das reações
DGGE	21f	<i>Archaea</i> , 16S	TTCCGTTGATCCYGCCGGA	DeLong, 1992	21f/958r	95° C 5 min; 30 ciclos: 95° C 30 s, 53° C 30 s, 72° C 1 min; 72° C 10 min/ 3,0 mM MgCl ₂ , 10 ng/μL DNA
	958r	<i>Archaea</i> , 16S	YCCGGCGTTGA(I/C)TCCAATT	DeLong, 1992		
	340f-GC	<i>Archaea</i> , 16S	gc.-CCCTACGGGG(C/T)GCA(G/C)CAG	Øvreås et al., 1997	340f-GC/519r ^b	95° C 5 min; 30 ciclos: 95° C 30 s, 55,8° C 30 s, 72° C 1 min; 72° C 10 min/ 3,0 mM MgCl ₂ , 10 ng/μL amplicons
	519r	<i>Archaea</i> , 16S	TTACCGCGGC(G/T)GCTG	Øvreås et al., 1997		
	F984-GC	<i>Bacteria</i> , 16S	gc.-AACGCGAAGAACCTTAC	Heuer et al., 1997	F984GC/R1378	94° C 4 min; 35 ciclos: 94° C 1 min, 60° C 1 min, 72° C 2 min; 72° C 10 min/ 2,5 mM MgCl ₂ , 10 ng/μL DNA, 0,25 μL Formamida
	R1378	<i>Bacteria</i> , 16S	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	Heuer et al., 1997		
	EF3f	<i>Fungi</i> , 18S	TCCTCTAAATGACCAAGTTTG	Smit et al., 1999	EF3f/NS1r	94° C 5 min; 25 ciclos: 94° C 30 s, 53° C 45 s, 72° C 3 min; 72° C 10 min/ 3,75 mM MgCl ₂ , 10 ng/μL DNA
	NS1r	<i>Fungi</i> , 18S	GTAGTCATATGCTTGTCTC	White et al., 1990		
	FR1-GC	<i>Fungi</i> , 18S	gc.-AICCATTCAATCGGTAIT	Vainio e Hantula, 2000	FR1-GC/NS1r ^c	94° C 5 min; 20 ciclos: 94° C 30 s, 50° C 45 s, 72° C 3 min; 72° C 10 min 3,75 mM MgCl ₂ , 10 ng/μL amplicons
ARISA	915f-FAM	<i>Archaea</i> , ITS	AAAGGAATTGGCGGGGAGCAC	Garcia-Martínez et al., 2000	915F-FAM/71r	96° C 3 min; 30 ciclos: 94° C 1,5 min, 52° C 1 min, 72° C 1,5 min; 72° C 10 min/ 2,5 pmoles <i>primer</i> , 2 ng/μL de DNA
	71r	<i>Archaea</i> , ITS	TCGGYGCCCGAGCCGAGCCATCC	Garcia-Martínez et al., 2000		
	1490-72f-FAM	<i>Bacteria</i> , ITS	TGCGGCTGGATCCCCTCCTT	Casamayor et al., 2002	1490-72f-FAM/ LSU21-38r	96° C 3 min; 25 ciclos: 94° C 1,5 min, 52° C 1 min, 72° C 1,5 min; 72° C 10 min/ 5 pmoles <i>primer</i> , 2 ng/μL de DNA
	LSU21-38r	<i>Bacteria</i> , ITS	TGCCAAGGCATCCACCGT	Casamayor et al., 2002		
	2234Cf-FAM	<i>Fungi</i> , ITS	GTTTCCGTAGGTGAACCTGC	Sequerra et al., 1997	2234Cf-FAM/3126Tr	94° C 3 min; 35 ciclos: 94° C 30 s, 59° C 45 s, 72° C 1 min; 72° C 15 min 5 pmoles <i>primer</i> , 2 ng/μL de DNA
	3126Tr	<i>Fungi</i> , ITS	ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT	Sequerra et al., 1997		

^a f - *forward primer*; r - *reverse primer*; gc. - sequência rica em G+C inserida na extremidade 5'; FAM - marcação carboxi-terminal (FAM) na extremidade 5'.

^b *Nested-PCR* – utilizou como molde o produto resultante da amplificação feita com os *primers* 21f/958r.

^c *Semi Nested-PCR* – utilizou como molde o produto resultante da amplificação feita com os *primers* EF3f/NS1r.

Tabela 2.2 - Condições de eletroforese em gel com gradiente desnaturante utilizadas para análise de fragmentos parciais SSU rDNA de diferentes tamanhos

PCR	Tamanho produto (pb)*	Gradiente desnaturante (%)	Gel poliacrilamida (%)	Eletroforese	Referência
340f-GC/519r ^a	179	35 - 55	8	5 h a 175 V e 60° C	Øvreås et al., 1997
F984-GC/R1378 ^b	430	40 - 65	6	16 h a 100 V e 60° C	Heuer et al., 1997
FR1-GC/NS1r ^c	1650	18 - 40	6	17 h a 150 V e 58° C	Vainio e Hantula, 2000

^aArchaea, ^bBacteria e ^cFungi

*Tamanho dos produtos de amplificação discriminados por DGGE.

Após a eletroforese, os géis foram corados com nitrato de prata (0,2%) e digitalizados em *ImageScanner* Modelo-PowerLook 1120 USG (Amersham Biosciences). A plataforma de *software* do *BioNumerics* versão 5.1 (Applied Maths NV, Belgium) foi utilizada para analisar os perfis de DGGE. A tolerância com respeito ao posicionamento das bandas foi de 0,8%. Análises de agrupamento hierárquico foram feitas usando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages*) e a correlação foi calculada usando o coeficiente de similaridade de *Jaccard*. A consistência dos agrupamentos foi avaliada pelos valores de correlação cofenética. Análises multivariadas de ordenação (Análise de Componentes Principais e *Non-Metric Multidimensional Escaling* - NMDS) foram feitas usando a mesma plataforma de *software* do *BioNumerics* e os pacotes do *CANOCO for Windows 4.5* (Biometris, Wageningen, Holanda), respectivamente. Análises de similaridade (ANOSIM) foram feitas com o programa *Primer5 for Windows* versão 5.2.6 (Plymouth Marine Laboratory, Primer-E, Reino Unido) e a riqueza de *amplicons* foi analisada com o *software Statistica* versão 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

2.2.1.5 Isolamento, clonagem e sequenciamento de *amplicons* 16S rRNA separados por DGGE

Bandas foram excisadas de géis de DGGE de *Bacteria* e *Archaea* e eluídas em 10 µL de água ultra-pura (Milli-Q) esterilizada. O DNA difundido foi usado como molde em reações de PCR com os *primers* F984/R1378 (*Bacteria*) e 340f/519r (*Archaea*). Os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose 1% por comparação com o marcador molecular *Low DNA Mass ladder* (Invitrogen) e *100 pb* (Invitrogen) como padrão de tamanho de DNA. Em seguida, os

produtos foram purificados com o *kit GFX PCR DNA e Gel Band Purification* (GE Healthcare), quantificados novamente em gel de agarose 1% e clonados no plasmídeo *pGEM-T Easy Vector* (Promega). Após transformação em células quimiocompetentes de *Escherichia coli* (DH-5 α), clones foram aleatoriamente selecionados, crescidos em meio *Circle Grow* (Bio 101, Inc) e posteriormente o DNA plasmidial foi extraído, analisado em gel de agarose 1% e utilizado como molde em reações de PCR com os *primers* do vetor M13F (5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3') e M13R (5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3'). As amostras foram preparadas com *DYEnamic* (DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit, Amersham, Biosciences GE) e os produtos resultantes da amplificação foram precipitados com solução de acetato de sódio/EDTA e etanol absoluto. Os *amplicons* foram submetidos a um sequenciador automático *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) para sequenciamento. As sequências obtidas foram editadas usando os programas Phred/Phrap/Consed em sistema operacional *Linux* e comparadas com sequências do *GenBank do National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando o programa *nucleotide blast* do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL et al, 1990). Foi realizado alinhamento com sequências recuperadas do *GenBank* usando o programa *Clustal X2* (LARKIN et al., 2007), considerando apenas sequências parciais do 16S rDNA amplificadas com *primers* específicos utilizados para *Bacteria* e *Archaea*. Agrupamentos filogenéticos foram construídos pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU & NEI, 1987) baseados no método de *Jukes-Cantor* (JUKES E CANTOR, 1969) e valor de *bootstrap* de 1000 repetições. Estas análises foram realizadas com o programa MEGA, versão 4.0 (TAMURA et al., 2007). Detalhes do procedimento de clonagem e sequenciamento encontram-se descritos no item 3.2.1.3 deste trabalho.

2.2.1.6 Análise Automatizada do Espaço Intergênico Ribossomal

A discriminação usando ARISA foi feita em um sequenciador *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Para o carregamento das amostras no sequenciador, 1 μ L do produto de PCR purificado foi misturado a 8,75 μ L de formamida *HiDi* e 0,25 μ L de um padrão de comprimento. Para a análise da variabilidade do tamanho do espaço intergênico ribossomal de

Archaea, *Bacteria* e microfungos empregaram-se os padrões de comprimento GeneScan™ 120 LIZ (Applied Biosystems), GeneScan™ 500 ROX (Applied Biosystems) e MegaBACE™ ET900 (GE Healthcare), respectivamente. Antes do carregamento as amostras foram desnaturadas a 95° C por 5 minutos e resfriadas a 0° C por 3 minutos. A verificação do comprimento dos fragmentos entre a menor e a maior subunidade do gene rRNA foi feita usando o programa *PeakScanner* versão 1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Foram considerados nas análises estatísticas subsequentes apenas os tamanhos do espaço intergênico de *Archaea* com variação de 25 a 150 pb, tamanhos de 50 a 500 pb para *Bacteria* e de 50 a 900 pb para microfungos. O tamanho de cada pico foi expresso em um percentual de unidade de fluorescência relativo a cada amostra. Os dados foram analisados com técnicas multivariadas usando os pacotes do *CANOCO for Windows 4.5* (Biometris, Wageningen, Holanda) e a medida de distância de *Hellinger* (LEGENDRE et al., 2001). Análises de similaridade ANOSIM foram feitas com o programa *Primer5* (Plymouth Marine Laboratory, Primer-E, Reino Unido).

2.2.2 Resultados

Os atributos físicos do solo estudados foram: teor de argila, silte, areia total (Areia To), areia grossa (Areia Gr) e areia fina (Areia Fi). Os atributos químicos analisados foram: P disponível, matéria orgânica (MO), pH, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ trocáveis, hidrogênio + alumínio (H + Al), soma de bases (SB), capacidade de troca catiônica (CTC), índice de saturação por bases (V) e os micronutrientes (Fe, Mn e Zn) (Tabelas A.1 e A.2, ANEXO A).

2.2.2.1 Análise dos padrões de bandas gerados por DGGE e estatísticas

As discriminações dos produtos de PCR foram feitas em diferentes géis de DGGE, combinando os perfis das comunidades de um mesmo grupo microbiano presentes nos solos sob os diferentes usos da terra analisados, comparativamente, da seguinte forma: Cultivo Agrícola Tradicional vs. Floresta Primária, Pastagem vs. Floresta Primária e Floresta Secundária vs. Floresta Primária. Os solos sob floresta primária foram considerados controle. Foram obtidos três

conjuntos de dados (presença/ausência de bandas) para cada ano de coleta e grupo microbiano estudado. Baseado nestes conjuntos de dados, quatro análises foram feitas (Análise de agrupamento hierárquico, Análise de Componentes Principais, Análise de Similaridade – ANOSIM e *Non-Metric Multidimensional Escaling* – NMDS).

A classificação feita por método hierárquico permitiu a construção de dendrogramas elucidativos contendo a sequência em que ocorreram divisões ou uniões dos diferentes perfis das comunidades microbianas revelados por DGGE. A heterogeneidade destes perfis está representada pela posição dos seus nós na linha base de similaridade (Figuras 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 e 2.9). A distorção na matriz original dos dados foi quantificada pelo coeficiente de correlação cofenética, o qual expressou valores que garantem confiabilidade à interpretação dos agrupamentos gerados pelo método de ligação UPGMA.

Na sequência de figuras apresentada a seguir, cada dendrograma está acompanhado de uma Análise de Componentes Principais feita com o mesmo conjunto de dados usado na classificação hierárquica. Este método de análise de gradiente indireto consiste em uma técnica estatística multivariada que permitiu a distribuição dos perfis das comunidades microbianas ao longo de eixos de ordenação com base na presença e ausência de bandas detectadas por DGGE. Os valores percentuais associados a cada eixo da ordenação (X, Y e Z) informam a explicabilidade destes eixos ao longo das mudanças percebidas nas estruturas de comunidades dentro do espaço de ordenação. Conjuntamente, os três eixos plotados em cada ordenação apresentada explicam mais de 50% da distribuição dos dados.

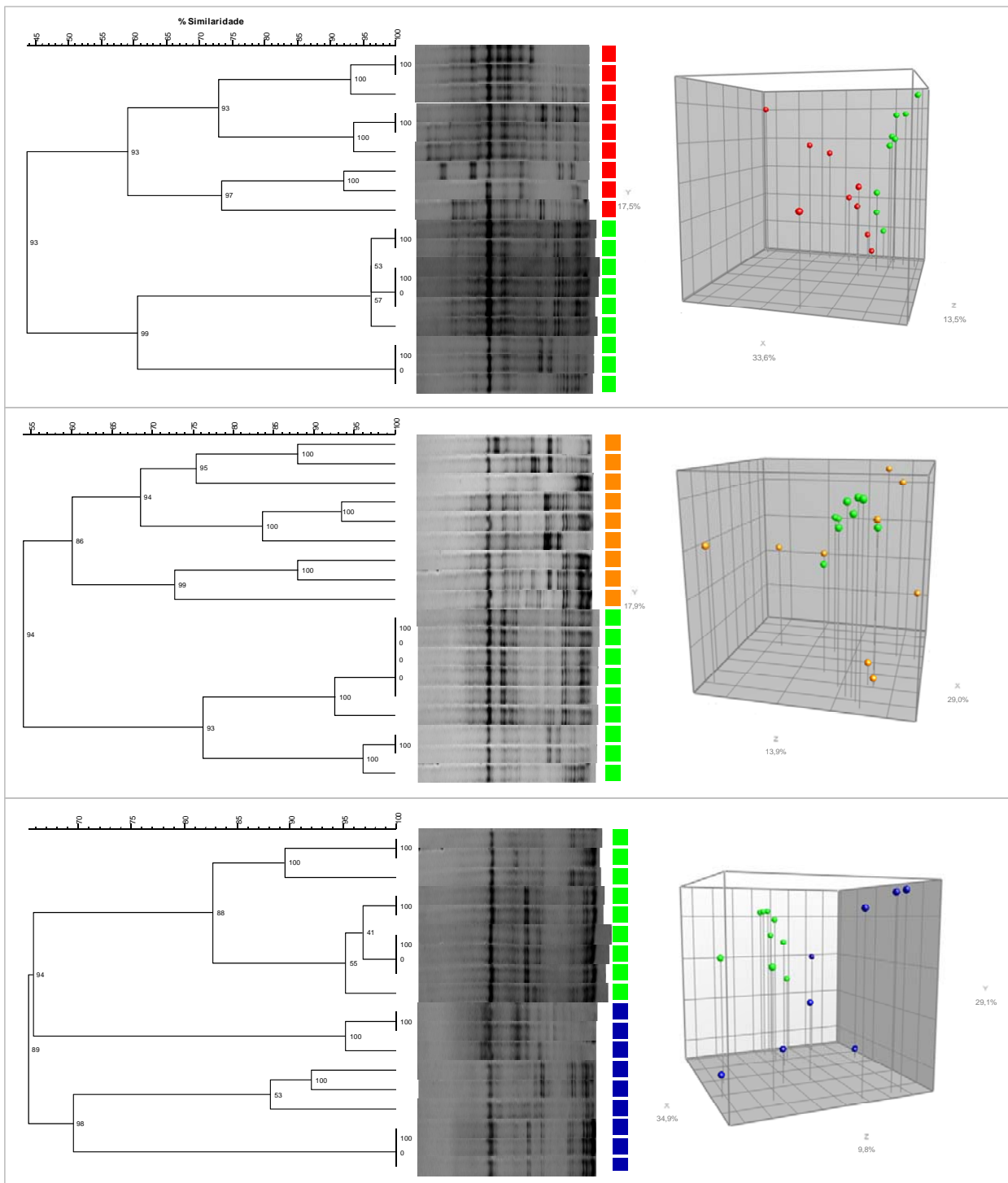


Figura 2.4 - Agrupamentos hierárquicos e Análise de Componentes Principais definidos a partir de *fingerprints* DGGE de comunidades totais de *Archaea* presentes em solos sob Floresta Primária - ■, Cultivo Agrícola Tradicional - ■, Pastagem - ■ e Floresta Secundária em Estádio Avançado de Regeneração - ■, amostrados em março de 2008 nas áreas de estudo localizadas na Amazônia Ocidental brasileira. Os valores numéricos nos nós dos ramos indicam o coeficiente de correlação cofenética associado com cada cluster

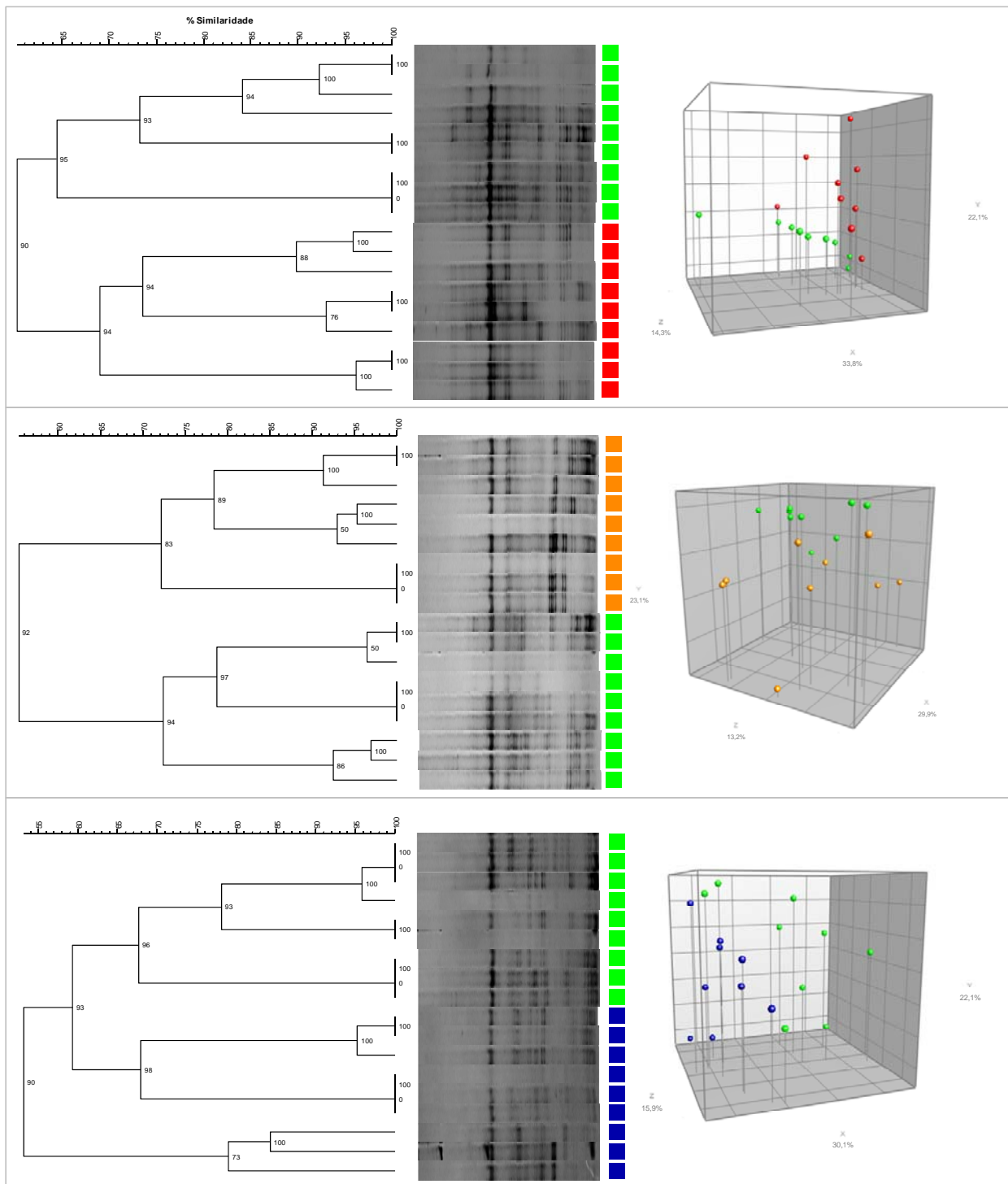


Figura 2.5 - Agrupamentos hierárquicos e Análise de Componentes Principais definidos a partir de *fingerprints* DGGE de comunidades totais de *Archaea* presentes em solos sob Floresta Primária - ■, Cultivo Agrícola Tradicional - ■, Pastagem - ■ e Floresta Secundária em Estádio Avançado de Regeneração - ■, amostrados em janeiro de 2009 nas áreas de estudo localizadas na Amazônia Ocidental brasileira. Os valores numéricos nos nós dos ramos indicam o coeficiente de correlação cofenética associado com cada cluster

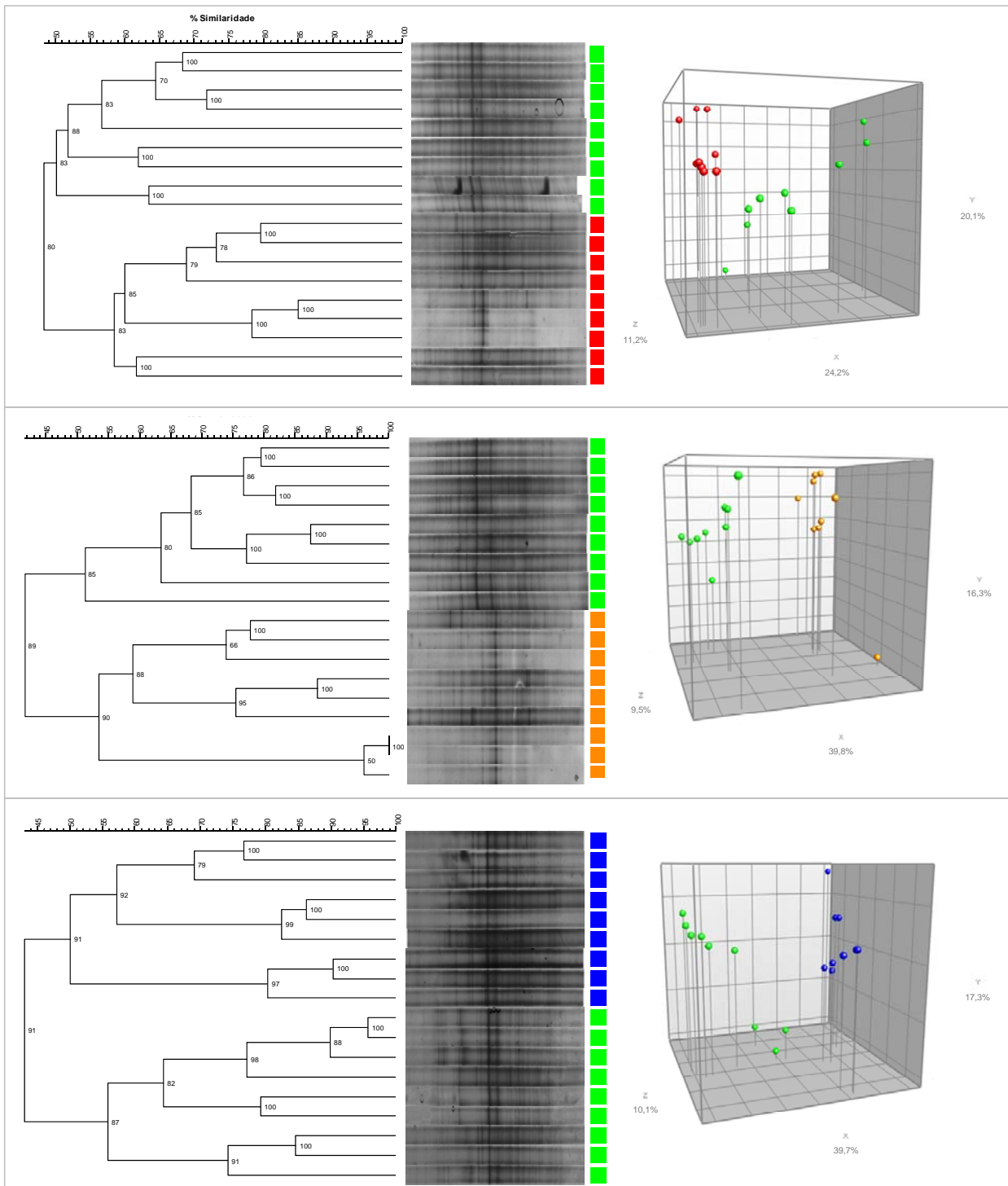


Figura 2.6 - Agrupamentos hierárquicos e Análise de Componentes Principais definidos a partir de *fingerprints* DGGE de comunidades totais de *Bacteria* presentes em solos sob Floresta Primária - ■, Cultivo Agrícola Tradicional - ■, Pastagem - ■ e Floresta Secundária em Estádio Avançado de Regeneração - ■, amostrados em março de 2008 nas áreas de estudo localizadas na Amazônia Ocidental brasileira. Os valores numéricos nos nós dos ramos indicam o coeficiente de correlação cofenética associado com cada cluster

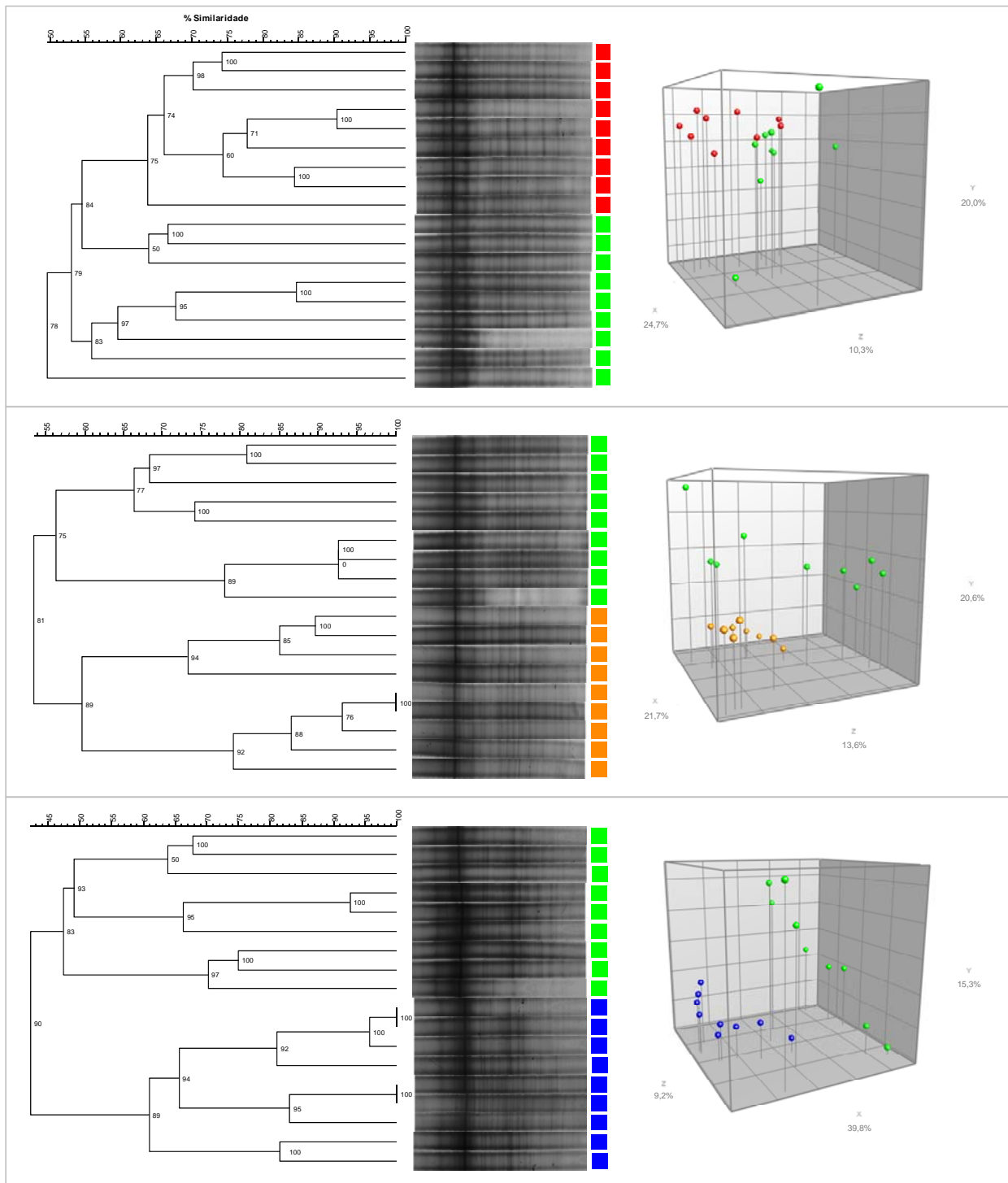


Figura 2.7 - Agrupamentos hierárquicos e Análise de Componentes Principais definidos a partir de *fingerprints* DGGE de comunidades totais de *Bacteria* presentes em solos sob Floresta Primária - ■, Cultivo Agrícola Tradicional - ■, Pastagem - ■ e Floresta Secundária em Estádio Avançado de Regeneração - ■, amostrados em janeiro de 2009 nas áreas de estudo localizadas na Amazônia Ocidental brasileira. Os valores numéricos nos nós dos ramos indicam o coeficiente de correlação cofenética associado com cada cluster

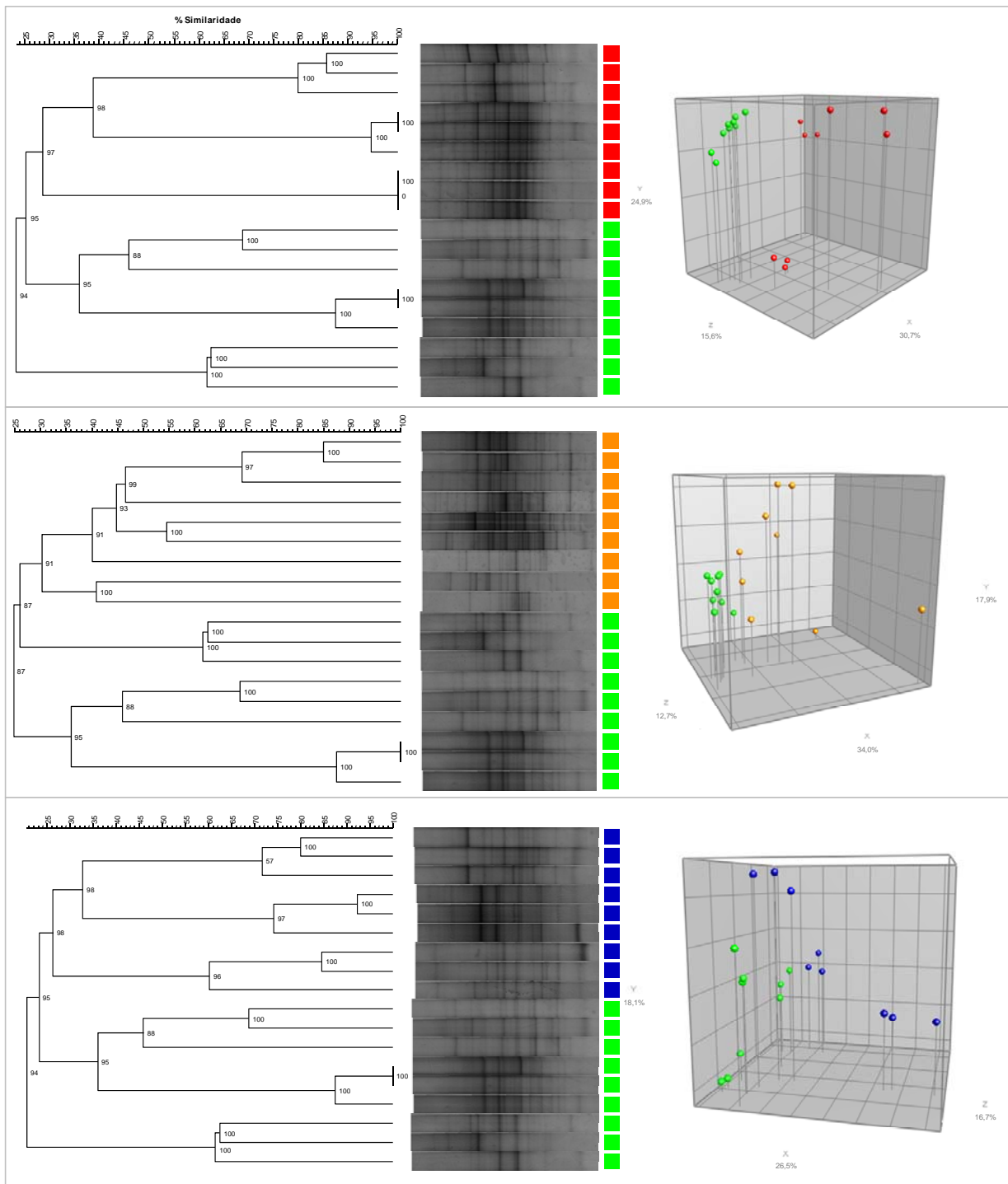


Figura 2.8 - Agrupamentos hierárquicos e Análise de Componentes Principais definidos a partir de *fingerprints* DGGE de comunidades totais de microfungos presentes em solos sob Floresta Primária - ■, Cultivo Agrícola Tradicional - ■, Pastagem - ■ e Floresta Secundária em Estádio Avançado de Regeneração - ■, amostrados em março de 2008 nas áreas de estudo localizadas na Amazônia Ocidental brasileira. Os valores numéricos nos nós dos ramos indicam o coeficiente de correlação cofenética associado com cada cluster

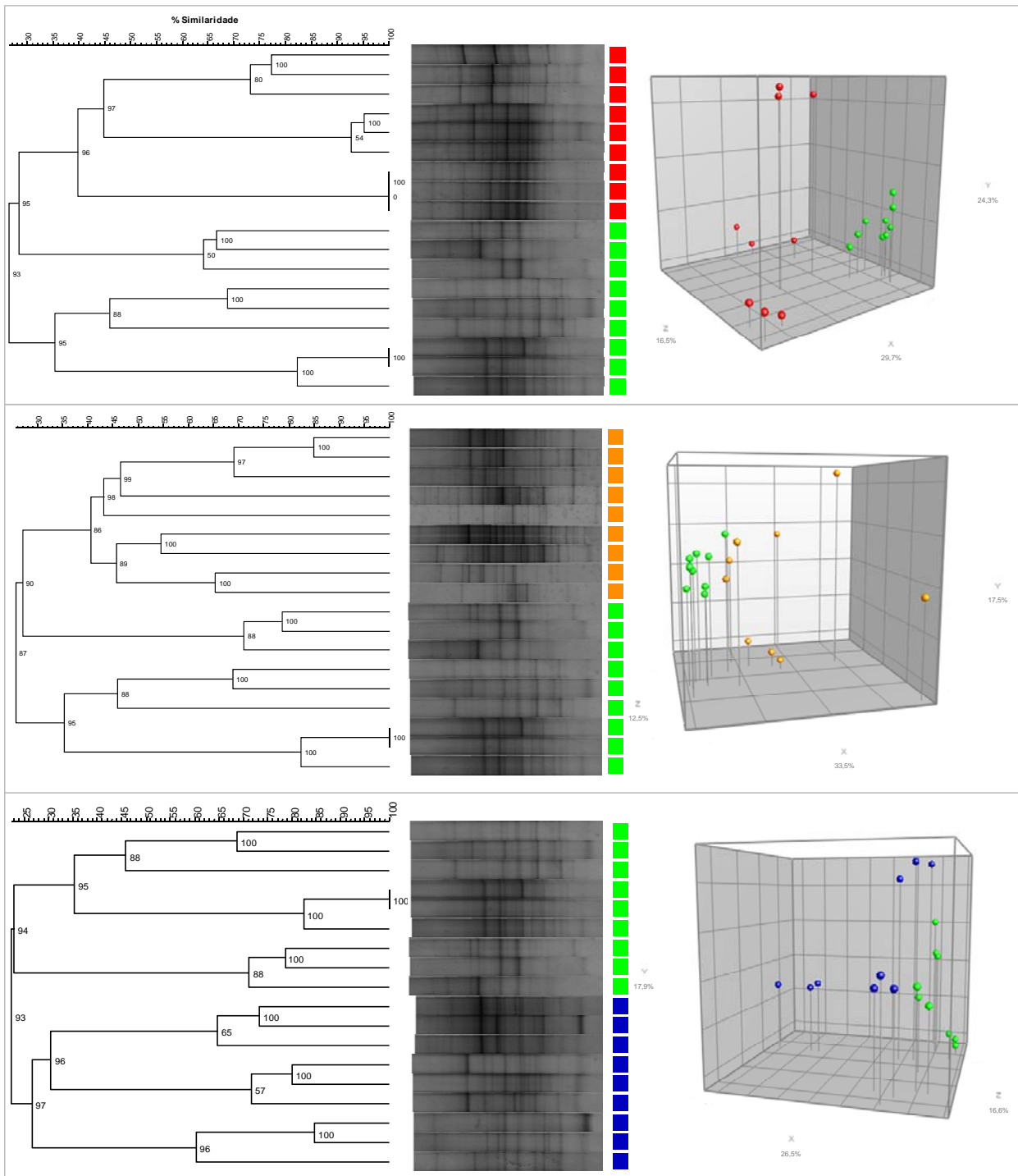


Figura 2.9 - Agrupamentos hierárquicos e Análise de Componentes Principais definidos a partir de *fingerprints* DGGE de comunidades totais de microfungos presentes em solos sob Floresta Primária - ■, Cultivo Agrícola Tradicional - ■, Pastagem - ■ e Floresta Secundária em Estádio Avançado de Regeneração - ■, amostrados em janeiro de 2009 nas áreas de estudo localizadas na Amazônia Ocidental brasileira. Os valores numéricos nos nós dos ramos indicam o coeficiente de correlação cofenética associado com cada cluster

Análises de similaridade (ANOSIM) foram realizadas com os conjuntos de dados gerados por DGGE a fim de testar o efeito do uso da terra nas estruturas de comunidades dos diferentes grupos microbianos estudados. A matriz de distância foi construída sem transformação dos dados e empregando *Bray-Curtis* (LEGENDRE E LEGENDRE, 1998) como medida de distância. Os valores de R obtidos usando 1000 permutações (Tabela 2.3) expressam o nível de separação das estruturas de comunidades microbianas em função do uso da terra variando em uma escala de 0 (indistinguível) a 1. Interpretam-se os valores de $R > 0,75$ como indicativos de grupos bem separados; $R > 0,5$ como grupos com sobreposição, mas claramente diferenciados e $R < 0,25$ como grupos pouco separados, de acordo com o manual do programa *Primer5* (CLARKE E GORLEY, 2001).

Os dados de presença e ausência de bandas foram ordenados com os atributos físico-químicos dos solos usando o método multivariado *Non-Metric Multidimensional Escaling* – NMDS (Figuras 2.10, 2.11 e 2.12). Na análise de NMDS foi plotado um ponto para cada amostra. A distância entre as amostras foi avaliada usando *Jaccard*. A fidelidade da relação entre as distâncias das amostras no diagrama e os valores reais de similaridade entre elas encontra-se expressa na Tabela 2.3 (valores de *Stress*), juntamente com a correlação e a variabilidade resultantes da análise.

Tabela 2.3 - Descrição das análises de similaridade (ANOSIM) e NMDS

	Conjunto dados ^a	ANOSIM		NMDS					
		2008	2009	Stress ^b	Correlação ^c (%)	Variabilidade ^d (%)	Stress ^b	Correlação ^c (%)	Variabilidade ^d (%)
<i>Archaea</i>	CAT vs. FP	0,874	0,750	0,036	77,2	73,9	0,105	71,5	68,9
	P vs. FP	0,772	0,904	0,106	68,4	67,3	0,104	75,2	72,3
	FS vs. FP	0,600	0,538	0,150	63,9	63,7	0,125	73,2	69,4
<i>Bacteria</i>	CAT vs. FP	0,615	0,510	0,203	74,0	60,7	0,182	66,2	57,1
	P vs. FP	0,775	0,372	0,116	76,8	61,9	0,167	58,9	60,1
	FS vs. FP	0,789	0,765	0,128	66,7	64,4	0,135	72,0	70,2
microfungos	CAT vs. FP	0,448	0,405	0,166	65,0	62,9	0,148	66,3	62,4
	P vs. FP	0,442	0,523	0,141	55,6	58,2	0,156	51,1	53,8
	FS vs. FP	0,601	0,571	0,130	60,3	59,6	0,131	56,2	54,8

^aFP - Floresta Primária; CAT - Cultivo Agrícola Tradicional; P - Pastagem; FS - Floresta Secundária.

^bIndica a fidelidade da regressão utilizada na análise (100 permutações).

^cIndica a correlação das estruturas de comunidades microbianas e os atributos físico-químicos do solo para o primeiro eixo da ordenação.

^dPorcentagem de variabilidade do conjunto de dados referente às estruturas de comunidades microbianas explicada pelo primeiro eixo da ordenação.

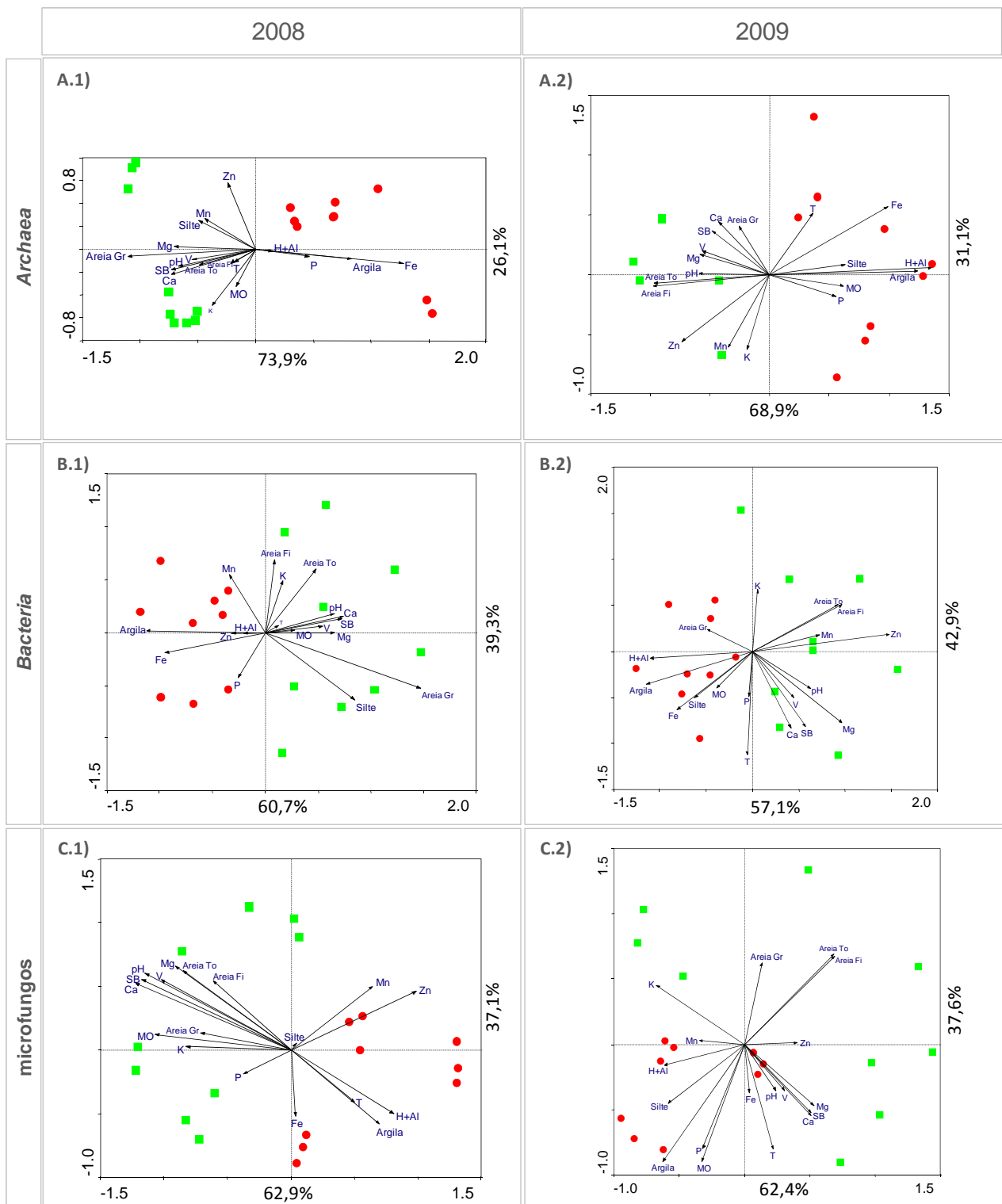


Figura 2.10 - Análises *Non-Metric Multidimensional Scaling* baseadas nas estruturas de comunidades de *Archaea* (A.1 e A.2), *Bacteria* (B.1 e B.2) e microfungos (C.1 e C.2), conforme discriminadas pela técnica de DGGE, e nos atributos físico-químicos dos solos. Os números 1 e 2 após as letras de identificação referenciam a coleta de 2008 e 2009, respectivamente. ■ - Floresta Primária e ● - Cultivo Agrícola Tradicional

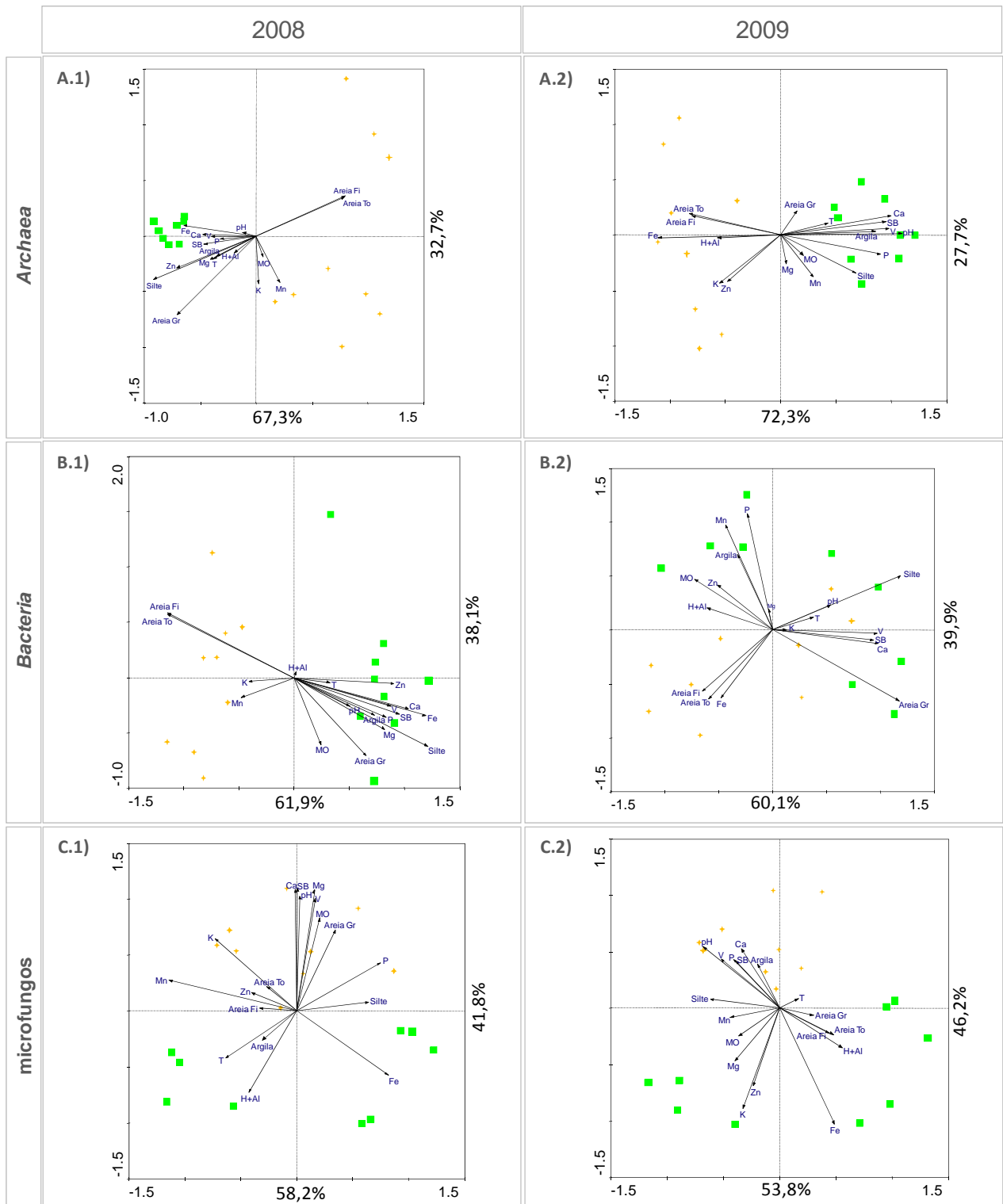


Figura 2.11 - Análises *Non-Metric Multidimensional Scaling* baseadas nas estruturas de comunidades de *Archaea* (A.1 e A.2), *Bacteria* (B.1 e B.2) e microfungos (C.1 e C.2), conforme discriminadas pela técnica de DGGE, e nos atributos físico-químicos dos solos. Os números 1 e 2 após as letras de identificação referenciam a coleta de 2008 e 2009, respectivamente. ■ - Floresta Primária e ♦ - Pastagem

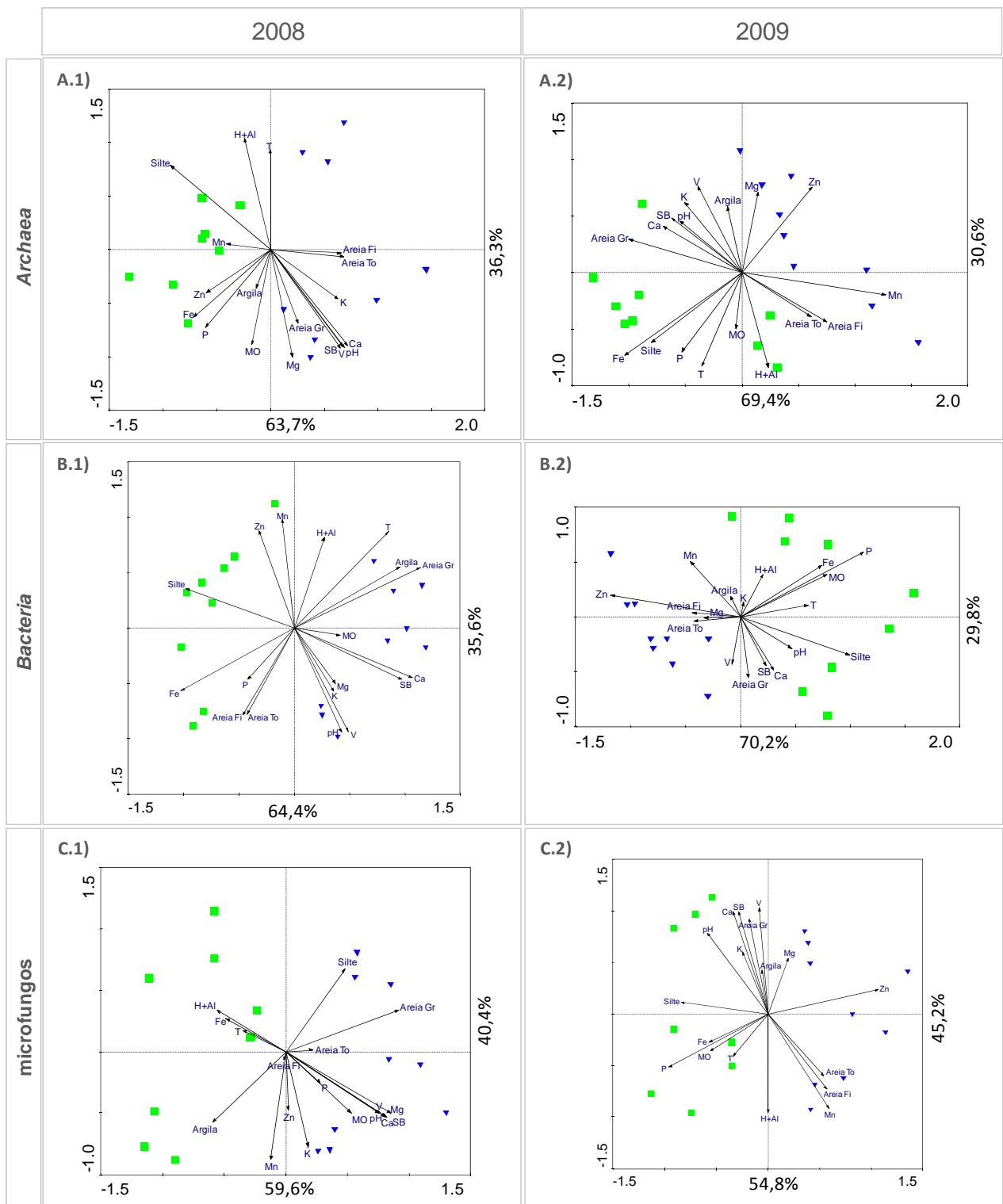


Figura 2.12 - Análises *Non-Metric Multidimensional Scaling* baseadas nas estruturas de comunidades de *Archaea* (A.1 e A.2), *Bacteria* (B.1 e B.2) e microfungos (C.1 e C.2), conforme discriminadas pela técnica de DGGE, e nos atributos físico-químicos dos solos. Os números 1 e 2 após as letras de identificação referenciam a coleta de 2008 e 2009, respectivamente. ■ - Floresta Primária e ▼ - Floresta Secundária em Estádio Avançado de Regeneração.

Valores de *Stress* <0,05 indicam que a configuração das amostras no espaço de ordenação apresenta baixa probabilidade de má interpretação; valores <0,1 garantem boa representação; valores <0,2 sugerem interpretação juntamente com outros métodos, e valores >0,3 indicam uma representação não aceitável (ter BRAAK E SMILAUER, 2002).

As ordenações dos dados de presença e ausência de bandas com os atributos dos solos analisados foram caracterizadas por *biplots* que aproximaram os perfis das comunidades microbianas às variáveis ambientais. Assim, os diagramas de ordenação representam as principais características da distribuição das comunidades ao longo de um gradiente ambiental definido pelos atributos físico-químicos dos solos. Para facilitar a interpretação, os atributos dos solos foram representados por setas. O comprimento e a inclinação do vetor são parâmetros significantes na interpretação das ordenações.

As análises de NMDS dos perfis de DGGE mostraram que as comunidades microbianas (*Archaea*, *Bacteria* e microfungos) presentes nos *habitats* dos solos diferiram em estrutura e que essas diferenças estiveram relacionadas ao uso da terra e mudanças em vários atributos do solo, especialmente aqueles associados com algumas propriedades físicas, tais como teor de silte, areia (areia total e areia fina) e químicas (pH, saturação por base e Ca^{+2}). Os valores de pH variaram de 3,7 a 5,5 nos solos amostrados em 2008 e de 3,7 a 4,9 nos solos coletados na campanha de 2009 (ver Tabelas A.1 e A.2, ANEXO A). Foi verificada uma correlação entre a porcentagem de saturação por base (V%) e o pH do solo. À medida que se reduz a saturação por base, o pH é também baixado.

As estruturas de comunidades microbianas dos solos sob cultivo agrícola tradicional (roça de mandioca) mostraram relação com a taxa de alumínio trocável (H+Al) nos dois anos de amostragem (Figura 2.10). Os solos apresentaram, em comum, elevados teores de alumínio trocável, variando de 25 a 281 mmolc.dm^{-3} em 2008 e 42 a 150 mmolc.dm^{-3} em 2009 (ver Tabela A.1 e A.2, ANEXO A). O teor de silte mostrou-se elevado na camada sub-superficial dos solos, com valores médios de 469 g/Kg e 427 g/Kg para os anos de 2008 e 2009, respectivamente.

Com base nos valores de R expressos pela análise de similaridade (ANOSIM), as estruturas de comunidades de *Archaea* dos solos reveladas nos perfis de DGGE apresentaram grupos bem separados nos espaços de ordenação para os dois anos de estudo, exceto para as

comparações FS vs FP, que apresentaram valores de R indicativos de grupos com sobreposição, mas claramente separados ($R > 0,5$). As estruturas de comunidades bacterianas formaram grupos bem separados nas ordenações FS vs FP ($R > 0,75$) em ambos os anos de amostragem dos solos, e grupos com sobreposição, mas claramente separados, nas ordenações CAT vs FP. A similaridade entre as estruturas de comunidades bacterianas dos solos sob FP e P evidenciou grupos bem separados para o ano de 2008 ($R > 0,75$) e grupos com sobreposição para o ano de 2009 ($R < 0,5$). As comunidades de microfungos mostraram grupos com sobreposição em todas as ordenações realizadas ($R > 0,5$ e $R < 0,5$).

2.2.2.2 Riqueza de *amplicons* e análise de sequências de *amplicons* 16S rRNA excisados de DGGE

A riqueza é aqui tratada como o número de *amplicons* rDNA separados em DGGE. O número de *amplicons* rDNA nos diferentes perfis gerados em DGGE foi avaliado em função dos grupos microbianos estudados, dos sistemas de uso da terra e do ano de coleta das amostras de solo (Figura 2.13). Em todos os casos analisados, a riqueza de *amplicons* rDNA de *Archaea*, *Bacteria* e microfungos apresentou variação ao comparar os valores de média obtidos a partir do número de *amplicons* dos perfis referentes à Floresta Primária (FP) com aqueles referentes ao Cultivo Agrícola Tradicional (CAT), Pastagem (P) e Floresta Secundária em Estádio Avançado de Regeneração (FS). A análise da riqueza de *amplicons* de *Archaea* mostrou resultado inverso para as comparações feitas entre CAT vs FP, P vs FP e FS vs FP nos dois anos de coleta das amostras de solo (Figura 2.13, A.1 e A.2). O resultado desta análise para as comunidades de *Bacteria* e microfungos foi similar entre os anos de coleta, exceto para a comparação FP vs P feita para *Bacteria* (Figura 2.13, B.1 e B.2). Na maioria dos casos, a riqueza de *amplicons* rDNA dos diferentes grupos microbianos é maior em CAT, P e FS quando comparada com a de FP. Uma exceção a esse comportamento ocorreu nos dois anos de coleta para o grupo dos microfungos ao comparar FP e FS. O número de bandas foi maior nos perfis de *Bacteria*, tendo sido os perfis de *Archaea* mais ricos que os de microfungos. Além disso, o efeito dos usos da terra nas comunidades microbianas poderia ter sido observado pela diferença na intensidade das bandas.

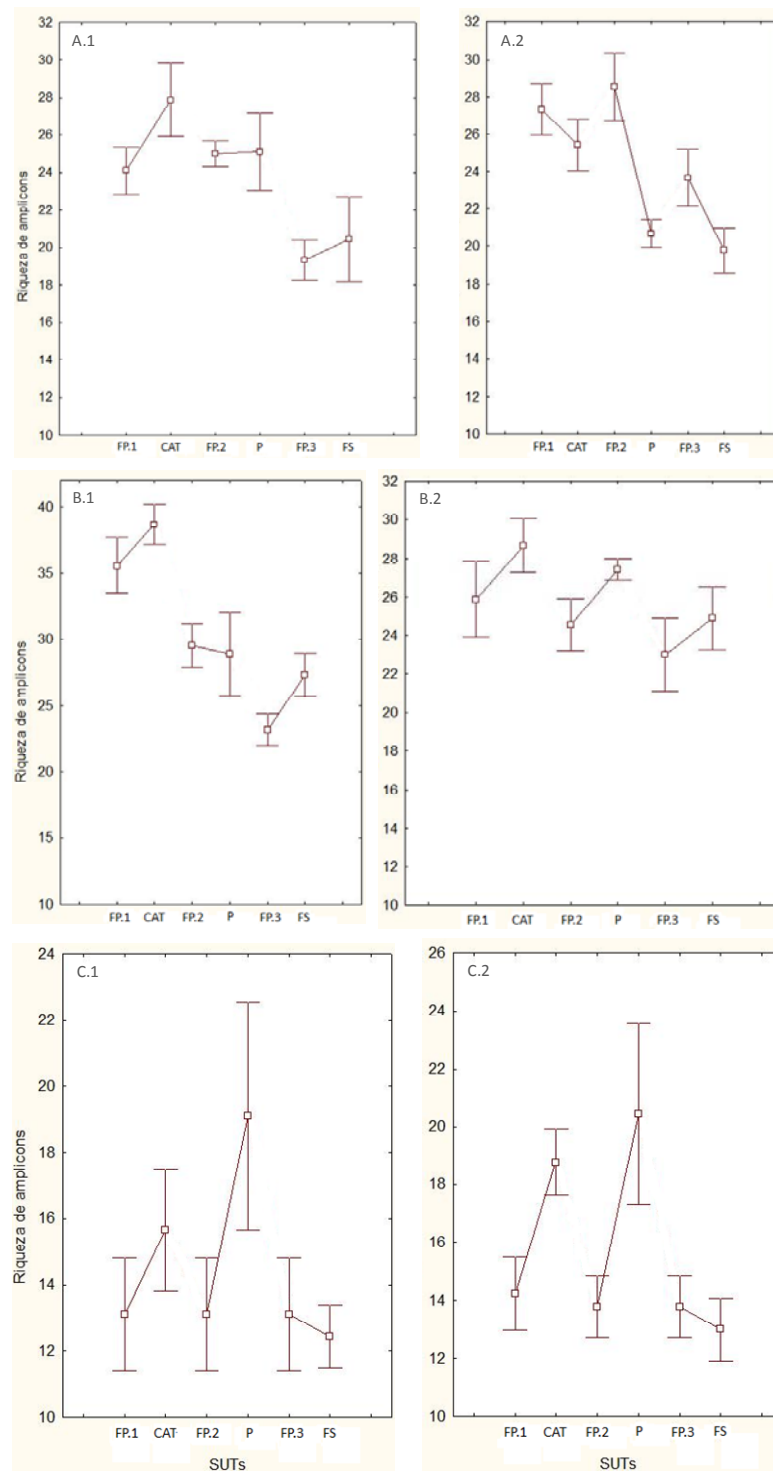


Figura 2.13 - Análise comparativa da riqueza de *amplicons* rDNA de *Archaea* (A.1 e A.2), *Bacteria* (B.1 e B.2) e microfungos (C.1 e C.2) separados por DGGE a partir de amostras de solos coletadas em 2008 (1) e 2009 (2) nos diferentes sistemas de uso da terra (SUTs). Cada comparação foi feita com base no número de *amplicons* separados nos perfis de DGGE contidos em um mesmo gel (FP.1 vs CAT; FP.2 vs P; FP.3 vs FS). FP - Floresta Primária; CAT - Cultivo Agrícola Tradicional; P - Pastagem e FS - Floresta Secundária em Estádio Avançado de Regeneração

Quanto à análise baseada no sequenciamento de *amplicons* do gene 16S rRNA excisados de DGGE, foram selecionadas 10 bandas, com posicionamento comum e raro nos géis obtidos para as comunidades de *Bacteria* e *Archaea* do solo (Figuras 2.14 e 2.16) visando identificar os filotipos. Em ambos os casos, foram consideradas sequências de nucleotídeos obtidas de aproximadamente 10 clones para cada banda excisada de DGGE. O resultado da análise comparativa de todas as sequências obtidas dos clones referentes a cada banda excisada de DGGE de *Bacteria* e *Archaea* com sequências depositadas no banco de dados do *Ribosomal Database Project* (RDP II) e do *Greengenes*, respectivamente, foi apresentado nas Tabelas B.1 e B.2, ANEXO B.

A análise comparativa realizada a partir das sequências obtidas de todos os clones referentes às bandas selecionadas dos géis de DGGE de *Bacteria* revelou mais de um organismo para cada banda excisada. O organismo de maior ocorrência foi considerado na representação da banda, e apenas a sequência de um clone (>96% de identidade com a sequência do organismo de maior ocorrência) foi utilizada na análise de agrupamento filogenético.

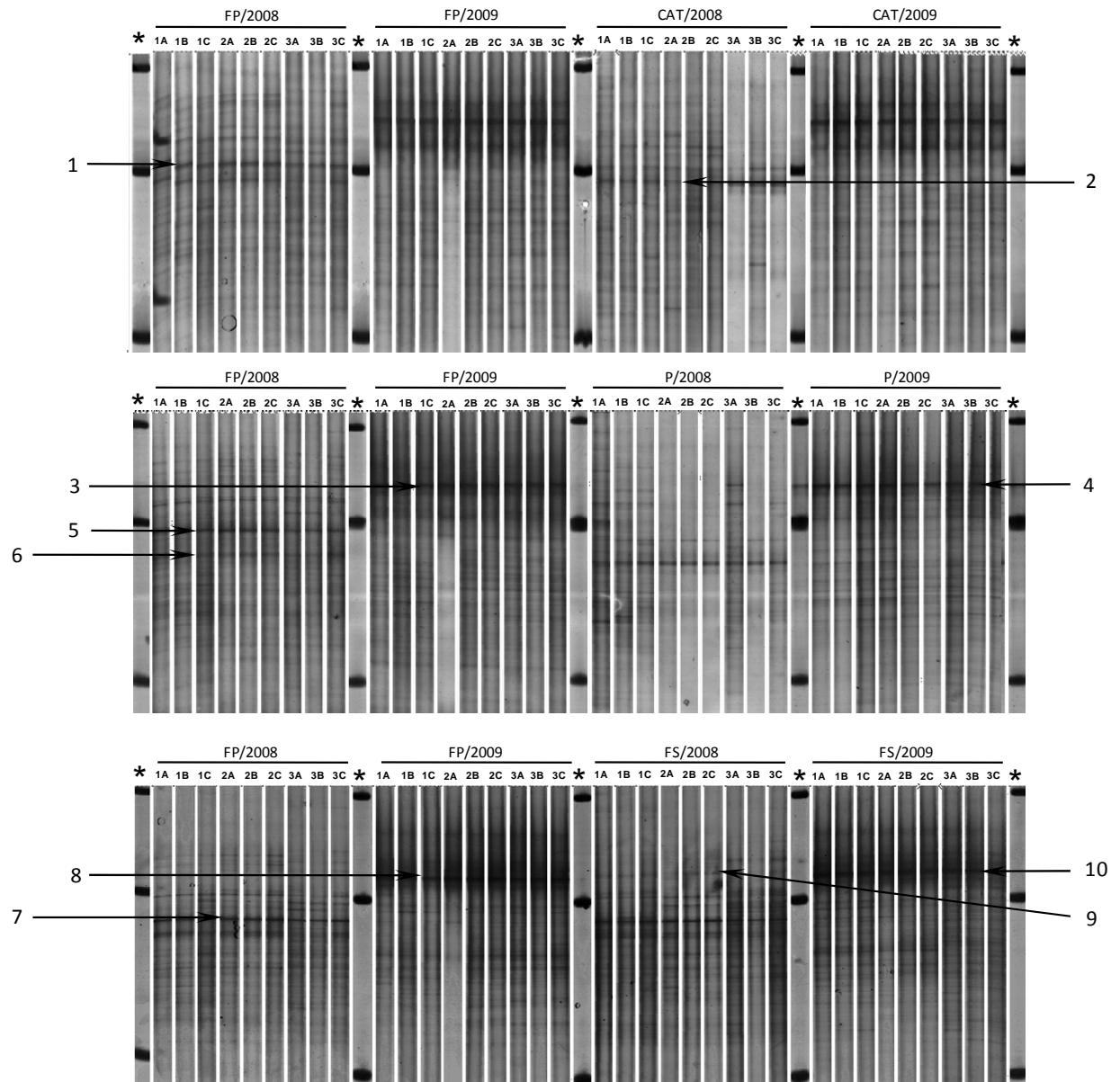


Figura 2.14 - Perfis de DGGE de comunidades de *Bacteria* presentes nos solos sob os diferentes usos da terra (FP - Floresta Primária; CAT - Cultivo Agrícola Tradicional; P - Pastagem e FS - Floresta Secundária em Estádio Avançado de Regeneração) amostrados nos anos de 2008 e 2009. Os perfis padrões usados para normalização dos géis foram identificados com "*". Os números acompanhados das setas correspondem à identificação da banda excisada do gel. As letras "A", "B" e "C" indicam as repetições de corrida no gel

As seqüências selecionadas para representar cada posição de banda considerada na análise de seqüências de *amplicons* do gene 16S rRNA de *Bacteria* foram agrupadas filogeneticamente com seqüências de isolados bacterianos similares depositadas no bando de dados do *Greengenes* (Figura 2.15).

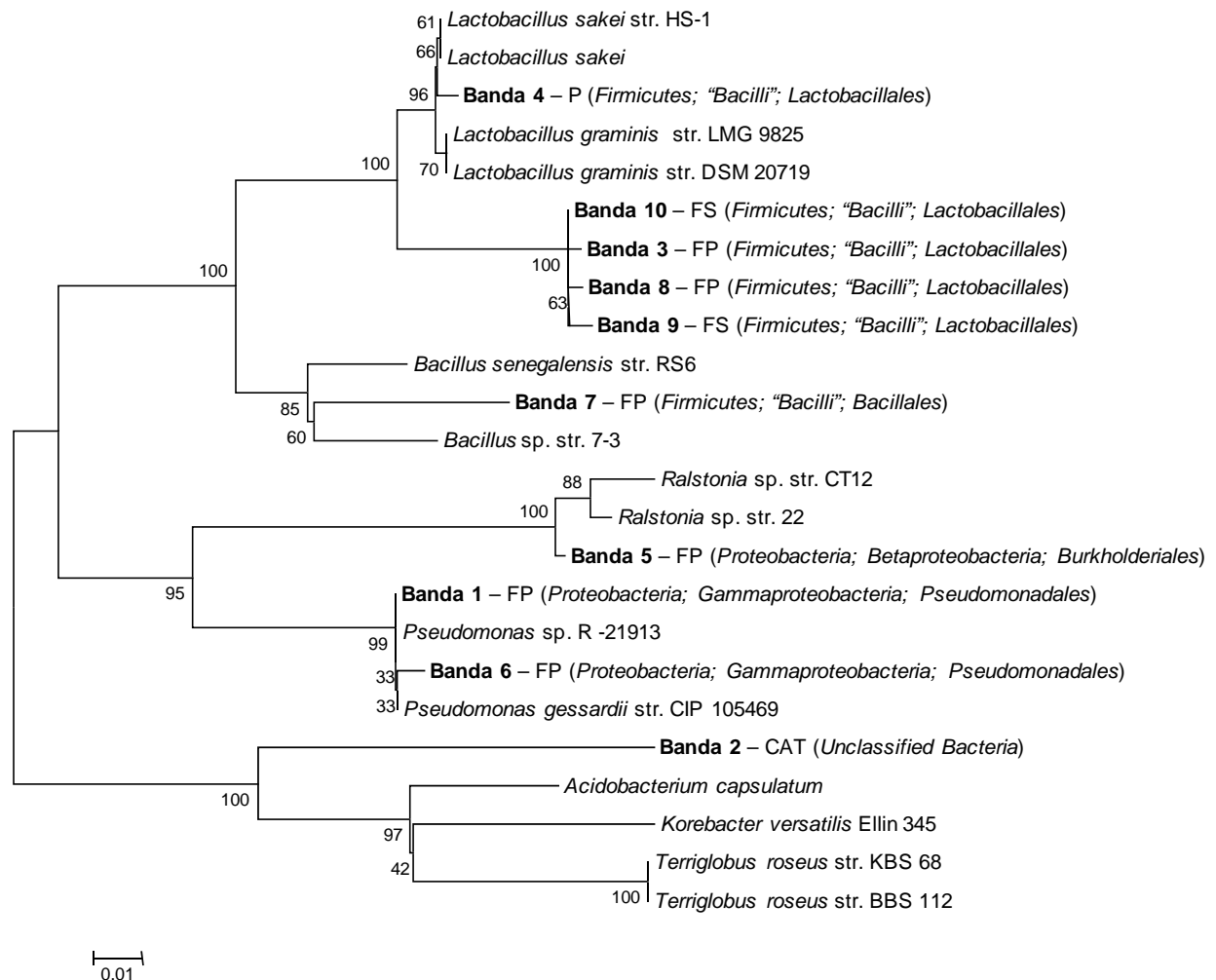


Figura 2.15 - Agrupamento filogenético mostrando a relação entre alguns isolados bacterianos e bandas excisadas de DGGE. O agrupamento foi construído com base em fragmentos amplificados com os *primers* específicos para *Bacteria* (F984-GC/R1378). FP - Floresta Primária; CAT - Cultivo Agrícola Tradicional; P - Pastagem e FS - Floresta Secundária em Estádio Avançado de Regeneração

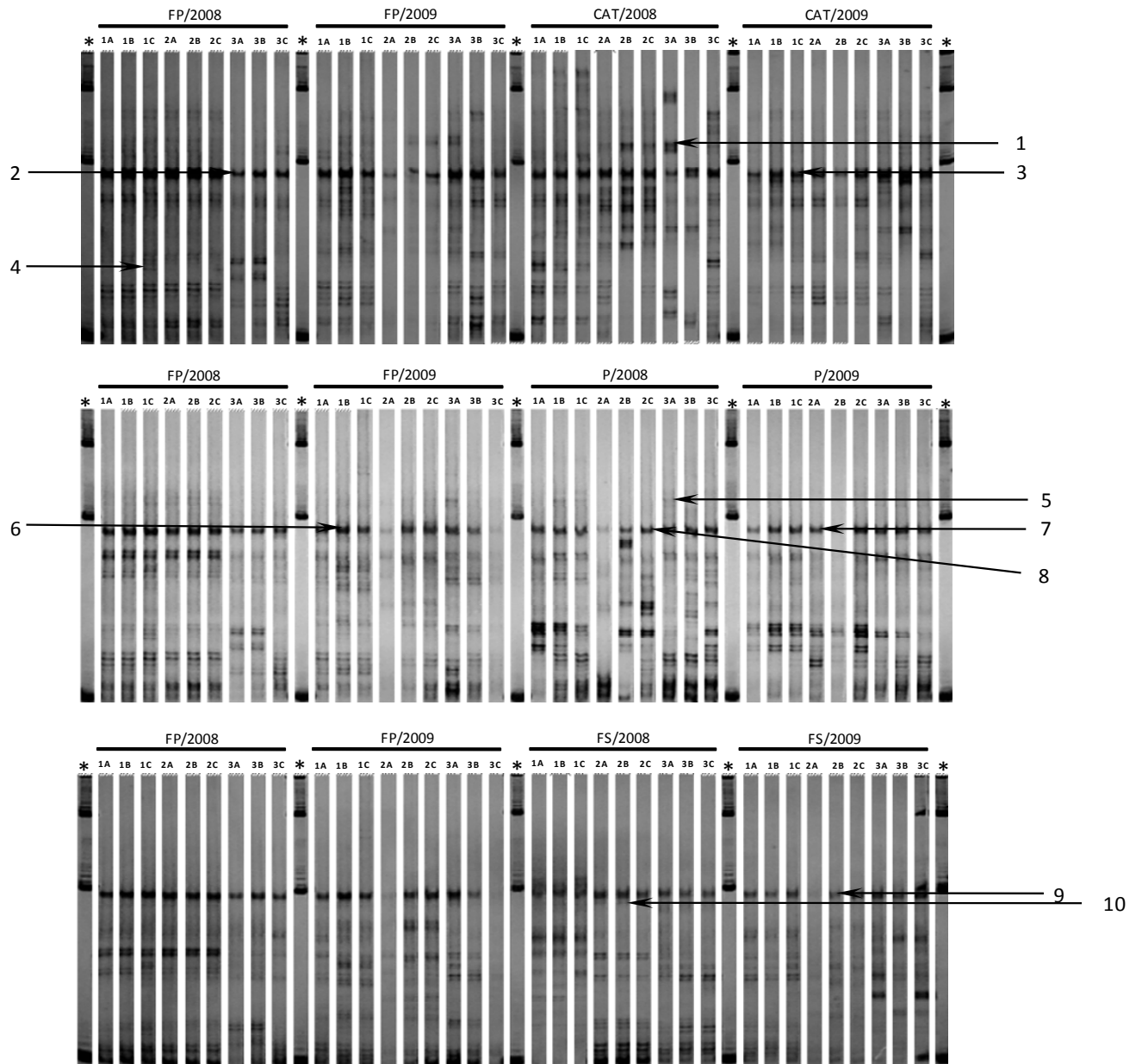


Figura 2.16 - Perfis de DGGE de comunidades de *Archaea* presentes nos solos sob os diferentes usos da terra (FP - Floresta Primária; CAT - Cultivo Agrícola Tradicional; P - Pastagem e FS - Floresta Secundária em Estádio Avançado de Regeneração) amostrados nos anos de 2008 e 2009. Os perfis padrões usados para normalização dos géis foram identificados com “*”. Os números acompanhados das setas correspondem à identificação da banda excisada do gel. As letras “A”, “B” e “C” indicam as repetições de corrida no gel

As sequências selecionadas para representar cada posição de banda considerada na análise de sequências de *amplicons* do gene 16S rRNA de *Archaea* foram agrupadas filogeneticamente com sequências de clones similares depositadas no bando de dados do *Greengenes* (Figura 2.15).

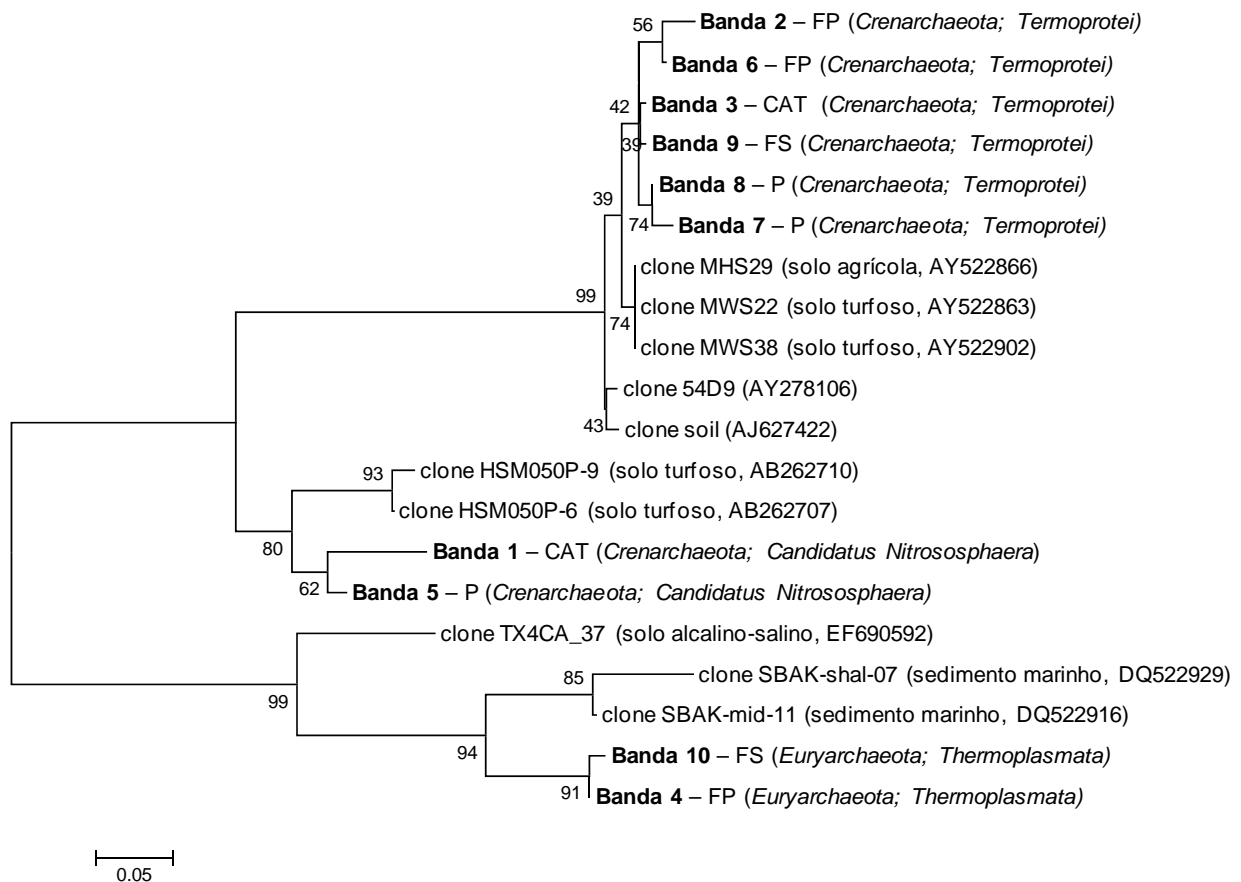


Figura 2.17 - Agrupamento filogenético mostrando a relação entre alguns clones de *Archaea* e bandas excisadas de DGGE. O agrupamento foi construído com base em fragmentos amplificados com os *primers* específicos para *Archaea* (21f/958r + 340f-GC/519r). FP - Floresta Primária; CAT - Cultivo Agrícola Tradicional; P - Pastagem e FS - Floresta Secundária em Estádio Avançado de Regeneração

Na análise das sequências de *amplicons* do gene 16S rRNA de *Bacteria*, bandas presentes na mesma posição no gel, mas obtidas de amostras diferentes, nem sempre afiliaram todas as suas sequências ao mesmo organismo no banco de dados do *Ribosomal Database Project* (RDP). Em média, das 10 sequências obtidas para cada banda excisada de DGGE, 8 delas se afiliaram ao

mesmo organismo no banco de dados, com porcentagem de similaridade variando de 96% a 100%.

Bandas de DGGE excisadas dos géis por apresentarem posicionamento comum entre as amostras foram agrupadas filogeneticamente próximas. Bandas em posicionamentos raros nos géis foram distribuídas em ramos distintos nos agrupamentos. No agrupamento filogenético de *Archaea*, bandas com expressiva intensidade excisadas de posicionamento comum nos géis (bandas 2, 3, 6, 7, 8 e 9; Figuras 2.16 e 2.17) mostraram proximidade com clones de *Crenarchaeota* obtidos de solos turfosos. Dentre as bandas com posicionamentos raros nos géis, as bandas 4 e 10 se afiliaram a clones obtidos de sedimentos marinhos e as bandas 1 e 5 estiveram próximas de clones recuperados de solos turfosos. Estas duas últimas bandas foram excisadas de posições similares em perfis distintos de DGGE referentes a cultivo agrícola tradicional e pastagem, respectivamente.

2.2.2.3 Análise dos padrões de picos gerados por ARISA e análises multivariadas

Eletroferogramas gerados em ARISA foram representados na Figura 2.18. Os eletroferogramas referentes às comunidades de *Archaea* dos solos mostraram número máximo de picos de 42 e 88 para o conjunto de amostras coletado nos anos de 2008 e 2009, respectivamente, e o comprimento do fragmento atingiu até 150 pb. O número máximo de picos nos eletroferogramas gerados em ARISA para as comunidades de *Bacteria* foi de 182 e 273 para os dois anos de coleta, consecutivamente, e o comprimento máximo do fragmento foi de aproximadamente 600 pb. As comunidades de microfungos dos solos apresentaram maior número de picos nos eletroferogramas gerados em ARISA se comparado aos valores mostrados anteriormente para as comunidades de *Archaea* e *Bacteria*, com número máximo de picos de 622 e 546 para as amostras coletadas em 2008 e 2009, respectivamente. O tamanho máximo do fragmento entre a menor e a maior subunidade do gene rRNA discriminado para as comunidades de microfungos nos eletroferogramas foi de aproximadamente 900 pb.

Os padrões de picos gerados por ARISA foram convertidos em uma matriz baseada no percentual de unidade de fluorescência relativo a cada amostra. Os dados percentuais de unidade

de fluorescência foram ordenados com os atributos físico-químicos dos solos usando o método multivariado *Non-Metric Multidimensional Escaling* – NMDS (Figura 2.19). Análises de similaridade (ANOSIM) foram realizadas a fim de testar o efeito do uso da terra nas estruturas de comunidades dos diferentes grupos microbianos estudados.

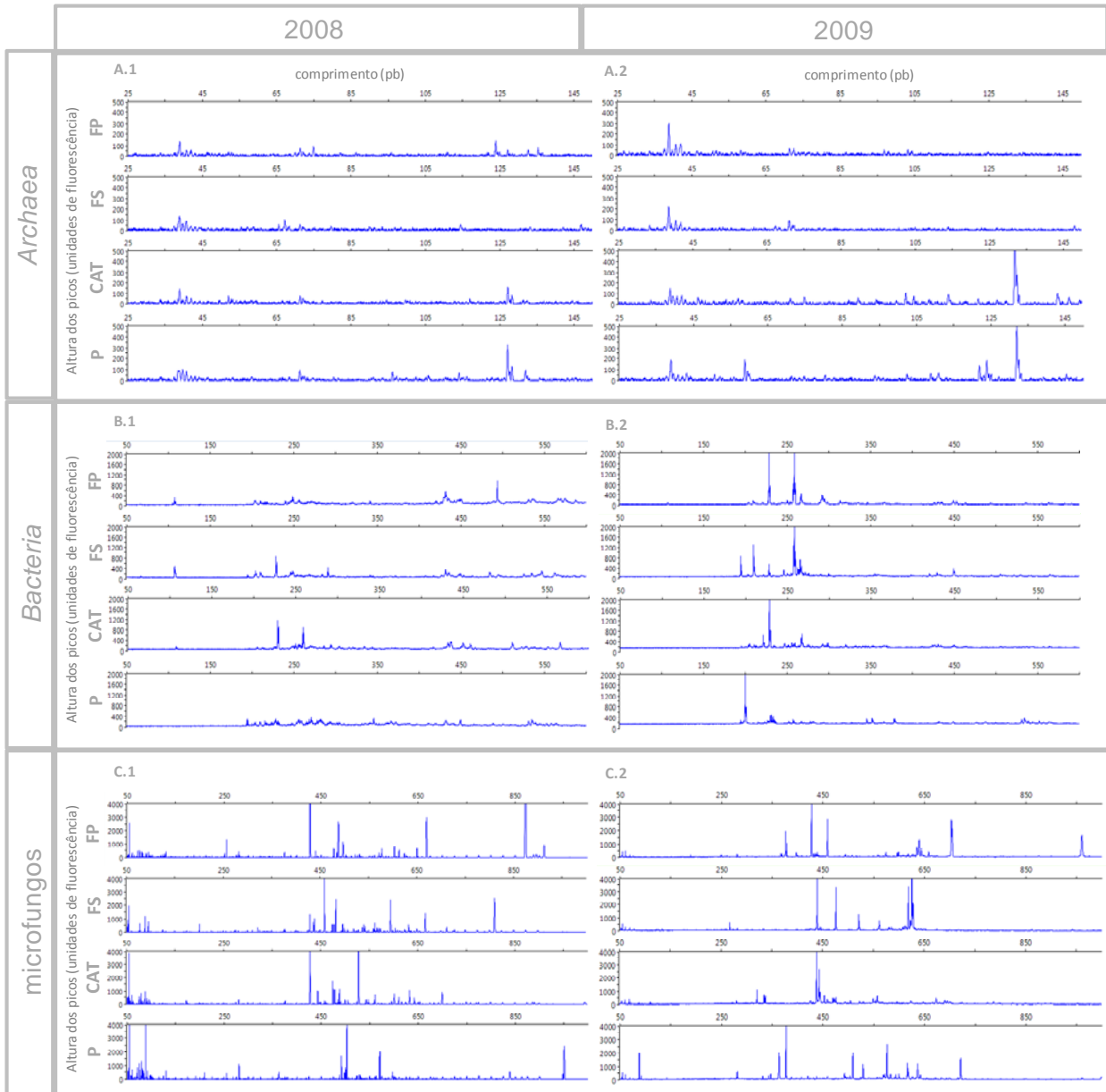


Figura 2.18 - Eletroferogramas gerados em ARISA para as comunidades de *Archaea* (A.1 e A.2), *Bacteria* (B.1 e B.2) e microfungos (C.1 e C.2) dos solos. Os números 1 e 2 após as letras de identificação referenciam a coleta de 2008 e 2009. FP - Floresta Primária; FS - Floresta Secundária em Estádio Avançado de Regeneração; CAT - Cultivo Agrícola Tradicional; e P - Pastagem

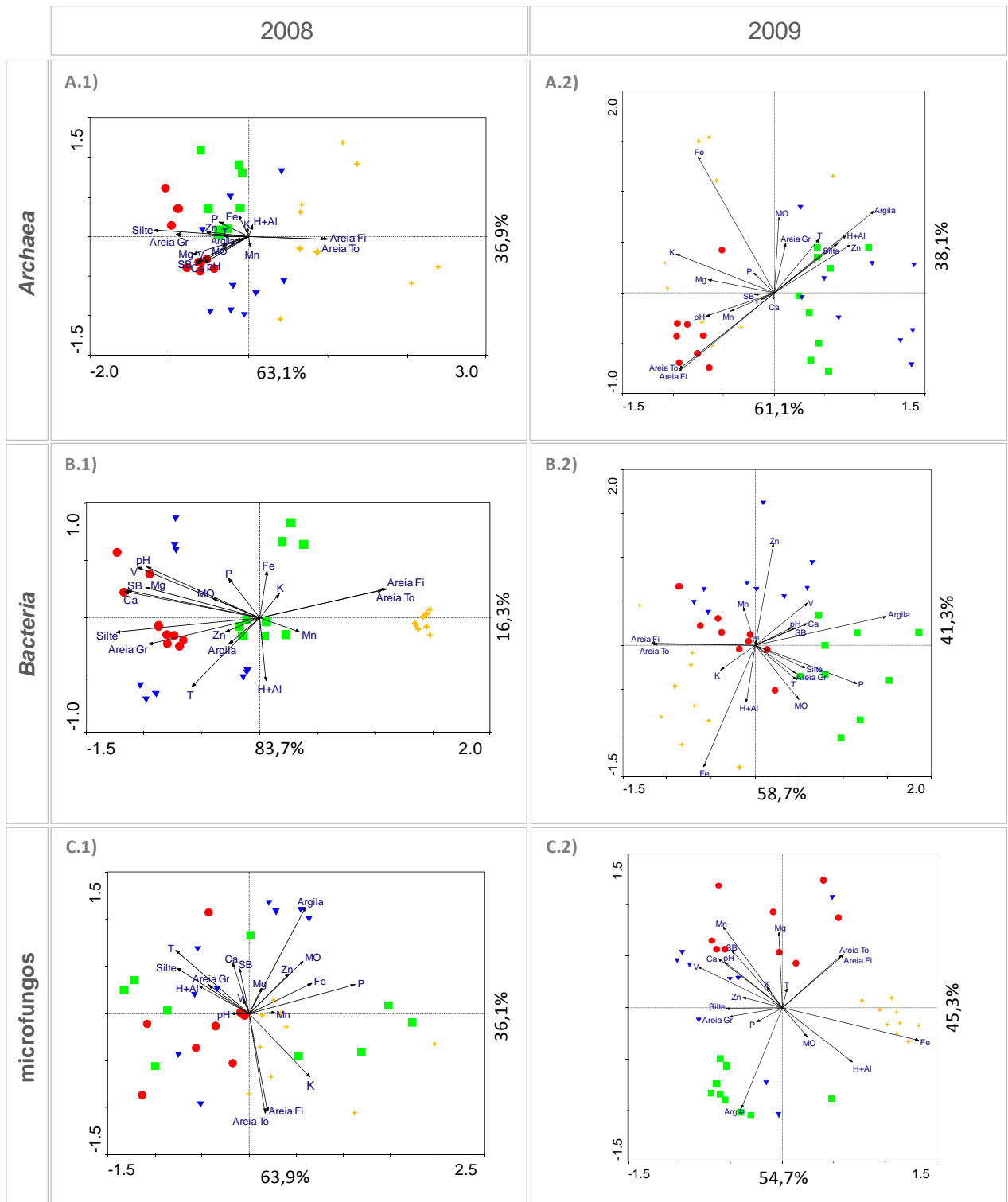


Figura 2.19 - Análises *Non-Metric Multidimensional Scaling* baseadas nas estruturas de comunidades de *Archaea* (A.1 e A.2), *Bacteria* (B.1 e B.2) e microfungos (C.1 e C.2) conforme discriminadas pela técnica de ARISA e nos atributos físico-químicos dos solos. Os números 1 e 2 após as letras de identificação referenciam a coleta de 2008 e 2009, respectivamente. ■ - Floresta Primária, ● - Cultivo Agrícola Tradicional, + - Pastagem e ▼ - Floresta Secundária em Estádio Avançado de Regeneração

Em ambas as análises (NMDS e ANOSIM) a distância entre as amostras foi avaliada usando *Bray-Curtis*. A fidelidade da relação entre as distâncias das amostras no diagrama e os valores reais de similaridade entre elas encontra-se expressa na Tabela 2.4 (valores de *Stress*), juntamente com a correlação e a variabilidade resultantes da análise.

Tabela 2.4 - Descrição das análises de similaridade (ANOSIM) e NMDS

	NMDS						Interações ^d	ANOSIM	
	Stress ^a	Correlação ^b (%)	Variabilidade ^c (%)	Stress ^a	Correlação ^b (%)	Variabilidade ^c (%)		2008	2009
	2008			2009					
<i>Archaea</i>	0,181	77,4	63,1	0,184	67,1	61,1	CAT vs FP	0,275	0,881
							P vs FP	0,725	0,616
							FS vs FP	0,300	0,152
<i>Bacteria</i>	0,099	84,1	83,7	0,199	62,7	58,7	CAT vs FP	0,448	0,642
							P vs FP	0,985	0,701
							FS vs FP	0,270	0,601
<i>microfungos</i>	0,195	67,8	63,9	0,219	51,7	54,7	CAT vs FP	0,221	0,762
							P vs FP	0,057	0,983
							FS vs FP	0,218	0,579

^aIndica a fidelidade da regressão utilizada na análise (100 permutações).

^bIndica a correlação das estruturas de comunidades microbianas e os atributos físico-químicos do solo para o primeiro eixo da ordenação.

^cPorcentagem de variabilidade do conjunto de dados referente às estruturas de comunidades microbianas explicada pelo primeiro eixo da ordenação.

^dFP, Floresta Primária; CAT, Cultivo Agrícola Tradicional; P, Pastagem; FS, Floresta Secundária.

Os resultados obtidos com as análises de NMDS dos padrões de picos gerados por ARISA foram semelhantes àqueles obtidos com base nos perfis de DGGE e mostraram que as comunidades de *Archaea*, *Bacteria* e microfungos do solo diferiram em estrutura e que essas diferenças estiveram correlacionadas ao uso da terra e mudanças em vários atributos do solo.

As ordenações dos dados percentuais de unidade de fluorescência com alguns atributos dos solos reforçaram a correlação das estruturas de comunidades microbianas com os teores de areia (areia total e areia fina), silte e argila. Quanto à correlação das comunidades de *Archaea*, *Bacteria* e microfungos com as propriedades químicas dos solos, as estruturas de comunidades discriminadas em ARISA mostraram correlação positiva com as concentrações de Fe (Figura 2.19). As maiores concentrações de Fe foram relatadas para os solos sob floresta primária e floresta secundária em 2008 e sob pastagem em 2009 (ver Tabelas A.1 e A.2, ANEXO A).

Os valores de *stress* sugerem interpretação, juntamente com outros métodos, das ordenações feitas com base nos dados percentuais de unidade de fluorescência (Tabela 2.4). A maioria dos valores de R, expressos pela análise de similaridade para as estruturas de comunidades microbianas dos solos amostrados em 2009 (interações CAT vs FP; P vs FP; FS vs FP), indicam grupos com sobreposição, mas claramente separados nos espaços de ordenação. Para o ano de 2008, tais valores indicam grupos pouco separados nas ordenações (Figura 2.19).

2.2.3 Discussão

Devido ao desmatamento de áreas de floresta primária tropical na região de estudo ter ocorrido em função da prática agrícola de corte-e-queima adotada pelas comunidades locais e da implantação de pastagens nos anos de 1970, acompanhado muitas vezes pelo abandono das áreas de cultivo e consequente estabelecimento de manchas na paisagem com florestas secundárias em diversos estádios de regeneração, foi considerada esta ordem de conversão dos usos da terra na apresentação dos resultados obtidos com as técnicas de DGGE e ARISA para as estruturas de comunidades microbianas do solo, mesmo que este estudo não tenha considerado cronossequências.

As comunidades de *Archaea*, *Bacteria* e microfungos reveladas por DGGE e ARISA diferiram em estrutura para os solos sob floresta primária, cultivo agrícola tradicional (roça de mandioca), pastagem implantada há mais de 30 anos e floresta secundária em estádio avançado de regeneração (>10 anos de abandono da área) amostrados nos anos de 2008 e 2009. As diferenças nas estruturas de comunidades microbianas foram explicadas por alguns atributos do solo, especialmente pelo teor de silte e areia (areia total e areia fina), pH, saturação por base (V) e concentração de Fe, comprovando a importância das propriedades físicas e químicas do solo para as estruturas de comunidades microbianas.

Elevados teores de silte e argila estiveram associados aos solos mais bem drenados das áreas de estudo, à forte estruturação, baixa macroporosidade e elevada e permanente umidade em determinadas épocas do ano, conforme apresentado por Coelho et al. (2005) ao caracterizar os solos das áreas de estudo. Apesar dos elevados teores de alumínio nos solos, estes mesmos

autores atentam que na pequena profundidade do *solum*, os elevados teores de silte e presença de filossilicatos 2:1 evidenciam sua maior jovialidade em relação à grande maioria dos solos de terra firme já descritos e mapeados na bacia Amazônica, os quais influenciam sobremaneira suas propriedades morfológicas, químicas, físicas, hidro e biológicas, bem como seu comportamento frente aos diferentes usos e práticas de manejo.

Quanto à correlação observada entre a porcentagem de saturação por base (V%) e o pH do solo, Brady (1989) explica que à medida que se reduz a saturação por base, mediante perdas por drenagem do calcário e de outros componentes metálicos, o pH é também baixado, numa proporção mais ou menos definida. Isto se ajusta ao consenso geral de que a lixiviação tende a aumentar a acidez dos solos de regiões úmidas.

Cambissolos constituem os solos dominantes nas áreas estudadas, assim, pode-se assumir que o uso da terra é o principal fator responsável pelas mudanças nos atributos destes solos, como demonstrado por Jesus et al. (2009), ao empregar métodos estatísticos multivariados para compreender o efeito do uso da terra sobre as comunidades bacterianas do solo nestas mesmas áreas amostrais no município de Benjamin Constant. Estes autores não excluíram a possibilidade dos organismos do solo afetar os atributos edáficos, no entanto, assumiram o efeito do uso da terra como o principal responsável pelas mudanças apresentadas nas propriedades químicas do solo.

As análises de riqueza dos perfis de DGGE (Figura 2.13) e dos padrões de picos gerados por ARISA (Figura 2.18) mostraram que as estruturas de comunidades de *Archaea*, *Bacteria* e microfungos dos solos foram claramente alteradas com a atividade antrópica de desmatamento e uso da terra com cultivo agrícola e pastagem, não evidenciando alta similaridade entre o número de bandas nos perfis de DGGE e número de picos nos eletroferogramas gerados por ARISA para as comunidades microbianas presentes nos solos sob os diferentes sistemas de uso da terra, inclusive sob floresta primária e floresta secundária em estágio avançado de regeneração (>10 anos de abandono da área).

Buckley e Schmidt (2003) compararam as estruturas de comunidades microbianas de campos agrícolas abandonados por diferentes períodos de tempo e em diferentes estádios sucessionais de regeneração, com as de campos cultivados historicamente e campos nunca submetidos a cultivos agrícolas. Os autores mostraram que campos que nunca haviam sido

cultivados diferiram significativamente daqueles cultivados historicamente. Quando compararam os campos abandonados em diferentes estádios sucessionais, o campo que havia sido abandonado por nove anos mostrou-se ainda bastante similar às áreas historicamente cultivadas. Somente o campo que havia sido abandonado há mais de 45 anos apresentou estruturas de comunidades microbianas que foram comparáveis às de campos que nunca haviam sido usados com agricultura. Tais resultados sugerem que períodos longos de regeneração da formação florestal são requeridos para que as comunidades microbianas possam ser convertidas às suas estruturas originais.

Jesus et al. (2009) constataram tendência de recomposição das comunidades bacterianas do solo nas mesmas áreas amostrais deste estudo no município de Benjamin Constant, após uso da terra com cultivo agrícola e pastagem, seguido de abandono das áreas por períodos de 5 a 30 anos. Os autores argumentaram que a intensidade da prática agrícola de corte-e-queima nas áreas amostrais não foi suficiente para impactar de modo significativo as comunidades bacterianas do solo, e destacaram que tais áreas são circundadas, na paisagem, por extensas manchas de floresta, que devem servir como fonte de inóculo para a colonização das áreas previamente desmatadas.

Maior riqueza de filotipos foi detectada com ARISA, se comparado ao número de amplicons separado nos perfis de DGGE. Muyzer et al. (1993) sugeriram que análises de DGGE de fragmentos de rDNA amplificados por PCR geram *fingerprinting* dos constituintes mais dominantes de populações microbianas mistas quando são utilizados *primers* que se anelam a regiões conservadas do gene rRNA. Gürtler & Stanisich (1996) asseguram que a análise de sequências intergênicas espaçadoras entre a menor e a maior subunidade do gene rRNA é capaz de gerar maior variabilidade ao investigar os organismos ao nível das comunidades. Cabe ainda considerar a sensibilidade da eletroforese capilar automatizada na caracterização da complexidade de comunidades microbianas.

A identificação das dez bandas excisadas de DGGE de *Bacteria* e dez bandas excisadas de DGGE de *Archaea* revelou membros dominantes comuns para as comunidades microbianas dos solos sob os diferentes usos da terra, quando analisadas as sequências de nucleotídeos obtidas para uma mesma posição de banda nos perfis de DGGE. Bandas posicionadas diferentemente nos géis tiveram suas sequências afiliadas a diferentes organismos nos agrupamentos filogenéticos, demonstrando a ocorrência particular de alguns membros das comunidades microbianas em solos

sob determinados usos da terra. Um maior número de bandas sequenciadas seria necessário para tornar possível a correlação de alguns organismos a um dado sistema de uso da terra, visto que foram considerados *primers* “universais” para a amplificação de regiões do gene 16S rRNA dos Domínios microbianos estudados e obtidos perfis com alta riqueza de amplicons.

O sequenciamento das bandas de maior intensidade, e de posicionamento e ocorrência comum nos perfis de DGGE de *Bacteria* referentes às amostras de solo coletadas em 2009, mostrou a ocorrência e dominância de bactéria da Ordem *Lactobacillales* nos solos sob os diferentes usos da terra amostrados no referido ano. Para o ano de 2008, os perfis de DGGE revelaram bandas de maior intensidade posicionadas diferentemente nos géis referentes aos vários sistemas de uso da terra. O resultado do sequenciamento dessas bandas revelou diferentes organismos dominando em tais comunidades. Isto mostra o dinamismo apresentado pelas comunidades microbianas do solo em função de fatores ambientais que possivelmente divergiram nos dois anos de amostragens.

Como observado pelas análises dos padrões de PCR-DGGE e PCR-ARISA das comunidades microbianas, este trabalho mostrou que os diferentes usos da terra estudados no município de Benjamin Constant, região do Alto Solimões, Amazônia Ocidental, tiveram um grande impacto sobre as estruturas de comunidades de *Archaea*, *Bacteria* e microfungos presentes no solo. Os resultados sugerem que a atividade antrópica de desmatamento e uso da terra com cultivo agrícola tradicional e pastagem modifica as comunidades microbianas dos solos e longos períodos de abandono da área são requeridos para que a resiliência dos ecossistemas do solo se cumpra.

Referências

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.L. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam. v. 215, p. 403-410, 1990.
- BOSSIO, D.A.; SCOW, K.M. Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. **Microbial Ecology**, New York, v. 35, p. 265-278, 1998.
- BRADY, N.C. **Natureza e propriedades dos solos**. Trad. Antônio B. Neiva Figueiredo Filho. 7. ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1989. p. 583
- BRODY, J.R.; KERN, S.E. Sodium boric acid: Atriz-less, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, New York, v. 36, p. 214-216, 2004.
- BUCKLEY, D. H.; SCHMIDT, T.M. Environmental factors influencing the distribution of rRNA from verrucomicrobia in soil. **FEMS Microbiol Ecology**, Amsterdam, v. 35, p. 105-112, 2001.
- _____. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 441-452, 2003.
- CARNEY, K.M.; MATSON, P.A. The influence of tropical plant diversity and composition on soil microbial communities. **Microbial Ecology**, New York, v. 52, p. 226-238, 2006.
- CASAMAYOR, E.O.; MASSANA, R.; BENLLOCH, S.; ØVREAS, L.; DÍEZ, B.; GODDARD, V.J.; GASOL, J.M.; JOINT, G.I.; RODRÍGUEZ-VALERA, F.; PEDRÓS-ALIÓ, C. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 4, p. 338-348, 2002.
- CHUN, J.; HUQ, A.; COLWELL, R.R. Analysis of 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2202-2208, 2002.
- CLARKE, K.R.; GORLEY, R.N. **PRIMER 6.0: User Manual/Tutorial**. PRIMER-E, Plymouth, 2006.
- DeLONG E.F. *Archaea* in coastal marine environments. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 89, p. 5685-5689, 1992.
- EL FANTROUSSI, S.; VERSCHUERE, L.; VERSTRAETE, W.; TOP, E.M. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 982-988, 1999.

FIDALGO, E.C.C.; COELHO, M.R.; ARAUJO, F.O.; MOREIRA, F.M.S.; SANTOS, H.G.; BREFIN, M.L.M.S; HUISING, J. **Levantamento do uso e cobertura da terra de seis áreas amostrais relacionadas ao projeto BiosBrasil (Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity: Phase I)**, Município de Benjamin Constant (AM). 2005, [recurso eletrônico], Rio de Janeiro: Embrapa Solos – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento/Embrapa Solos, ISSN 1678-0892; 71).

FIERER, N.; JACKSON, R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 103, n. 3, p. 626-631, 2006.

FISHER, M.M.; TRIPLETT, E.W. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 4630-4636, 1999.

GARCIA-MARTÍNEZ J.; RODRIGUEZ-VALERA, F.; Microdiversity of uncultured marine prokaryotes: the SAR11 cluster and the marine Archaea of group I. **Molecular Ecology**, Danvers, v. 9, p. 935-948, 2000.

GÜRTLER, V.; STANISICH, V.A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region. **Microbiology**, New York, v. 142, p. 3-16, 1996.

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

HEUER, H.; HARTUNG, K.; WIELAND, G.; KRAMER, I.; SMALLA, K. Polynucleotide probes that target a hypervariable region of 16S rRNA genes to identify bacterial isolates corresponding to bands of community fingerprints. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 1045-1049, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Cidades @**. 2005a. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php>>. Acesso em: 26 maio 2005.

_____. **Censo Agropecuário 1995-1996**. 2005b. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 26 maio 2005.

JESUS, E.C.; MARSH, T.L.; TIEDJE, J.M.; MOREIRA, F.M.S. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **International Society for Microbial Ecology Journal**, on-line, 2009.

JUKES, T.H.; CANTOR, C.R. Evolution of protein molecules. p.21-132. In: Munro H.H. (Ed.), **Mammalian protein metabolism**. New York: Academic Press, 1969.

LEGENDRE P, LEGENDRE L. **Numerical Ecology**. 2nd . ed. Amsterdam: Elsevier Science BV, 1998.

LEGENDRE, P.; GALLAGHER, E.D. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. **Oecologia**, Berlin, v. 129, p. 271-280, 2001.

LOUGHNEY, K.; LUND, E.; DAHLBERG, J.E. tRNA genes are found between the 16S and 23S rRNA genes in *Bacillus subtilis*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.10, p. 1607-1624, 1982.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: Ed. UFLA, 2008. 768 p.

MUYZER, G.; DEWAAL, E.C., UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S ribosomal RNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**. New York. v. 73, n. 1, p. 127-141, 1998.

ØVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F.L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplified gene fragments coding for 16S rDNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3367-3373, 1997.

RIBEIRO, J.E.L.S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A.S.; BRITO, J.M.; SOUZA, M.A.D.; MARTINS, L.H.P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.L.; PEREIRA, E.C.; SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L.C. **Flora de Reserva Ducke**: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA, 1999. 816 p.

ROTHAUWE, J.H., WITZEL, K.P., LIESACK, W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 4704-4712, 1997.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 4, p. 406-425, 1987.

SEQUERRA, J.; MARMEISSE, R.; VALLA, G.; NORMAND P.; CAPELLANO, A.; MOIROUD, A. Taxonomic position and intraspecific variability of the nodule forming *Penicillium nodositatum* inferred from RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer and random amplified polymorphic DNA. **Mycological Research**, New York, v. 101, p. 465-472, 1997.

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GLANDORF, B.; VAN ELSAS, J. D.; WERNARD, K. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 6, p. 2614-2621, June 1999.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

ter BRAAK, C.J.F.; SMILAUER, P. **CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide**: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Ithaca NY: Microcomputer Power, 2002.

THIES, J.E. Eco-Biological soil assessment: analytical approaches through molecular methods. In: INTERNATIONAL CONFERENCE SOIL AND COMPOST ECO-BIOLOGY, 1., 2004, Léon, Espanha, **Resumos...** Léon, 2004.,

TROPICAL SOIL BIOLOGY AND FERTILITY INSTITUTE/CIAT (TSBF/CIAT); Global Environment Facility/UNEP (GEF/UNEP). In: CONSERVATION AND SUSTAINABLE MANAGEMENT OF BELOW-GROUND BIODIVERSITY GLOBAL WORKSHOP, 2., 2003. **Report...** Sumberjaya, Lampung, Indonésia, Feb. 24-28, 2003. 147 p.

VAINIO, E.J.; HANTULA, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. **Mycological Research**, New York, v. 104, n. 8, p. 927-936, Aug. 2000.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.D.; LEE, S.; TAYLOR, J. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications**. 1990. p. 315-322.

WU, T.; CHELLEMI, D.O.; GRAHAM, J.H.; MARTIN, K.J.; ROSSKOPF, E.N. Comparison of soil bacterial communities under diverse agricultural land management and crop production practices. **Microbial Ecology**, New York, v. 55, p. 293-310, 2008.

3 DIVERSIDADE DE *Archaea* OXIDADORAS DE AMÔNIA EM SOLOS DA AMAZÔNIA OCIDENTAL

Resumo

Neste estudo foi medida a diversidade e realizadas inferências filogenéticas a partir de sequências do gene que codifica para amônia monoxigenase (*amoA*) em membros do Domínio *Archaea* presentes em solos sob floresta primária tropical, cultivo agrícola tradicional (roça de mandioca), pastagem implantada há mais de 30 anos e floresta secundária em estágio avançado de regeneração (>10 anos de abandono da área). Sequências do gene *amoA* de *Archaea* presentes nos solos foram amplificadas por PCR com *primers* específicos a partir do DNA total extraído diretamente de amostras de solos. A coleta foi realizada a 0-20 cm de profundidade em solos sob os diferentes sistemas de uso da terra inseridos em uma paisagem antropizada no município de Benjamin Constant, região do Alto Solimões, Amazônia Ocidental. Com base em Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) definidas pelo programa DOTUR, constatou-se maior riqueza e diversidade de *Archaea* oxidadoras de amônia (AOA) para os solos sob pastagem, seguido por menor riqueza e diversidade deste grupo funcional nos solos sob floresta primária, cultivo agrícola tradicional e floresta secundária em estágio avançado de regeneração, consecutivamente. Nos agrupamentos filogenéticos, as UTOs referentes aos solos estudados mostraram relações evolutivas com sequências referenciadas no banco de dados como originárias de sedimento marinho e solos geograficamente distantes. Um clado filogenético único foi definido para as sequências de AOA dos solos sob floresta primária. Agrupamentos monofiléticos mostraram a associação de sequências do gene *amoA* de *Archaea* obtidas de solos sob os diferentes usos da terra subsequentes ao desmatamento da vegetação florestal primária, sugerindo que perturbações antrópicas associadas à implantação de pastagens, ao manejo agrícola tradicional e ao abandono de áreas cultivadas, seguido da regeneração natural, podem influenciar a diversidade genética das populações de AOA de solos sob floresta tropical úmida da Amazônia.

Palavras-chave: AOA; *amoA*, Nitrificação; Solos; Florestas tropicais: Amazônia

SOIL DIVERSITY OF AMMONIA OXIDIZING *Archaea* IN WESTERN AMAZON

Abstract

In this study the diversity was measured and phylogenetic inferences were realized using sequences of the gene that codes for ammonia monooxygenase (*amoA*) in members of the Domain *Archaea* present in soils under tropical rainforest, traditional agriculture cultivation (manioc), pasture established for over 30 years and secondary forest in later stage of regeneration (>10 years abandoned). Sequences from the *amoA* gene of *Archaea* present in the soils were amplified by PCR with specific primers from total DNA extracted directly from soil samples. The sampling was realized at 0-20 cm depth in soils under different land use systems located in mosaic landscape at Benjamin Constant Municipality, Alto Solimões region, Western Amazon. Based on Operational Taxonomic Units (OTUs) defined by DOTUR program, it was found an elevated ammonia oxidizing *Archaea* (AOA) richness and diversity for the soils under pasture, followed by lower richness and diversity of this functional group in soils under tropical rainforest, traditional agriculture cultivation and secondary forest in later stage of regeneration, consecutively. In phylogenetic branch, the OTUs related to the studied soils showed evolutionary relations with sequences referred in the database as originated from sea sediments and distant geographically soils. One branch was defined to the sequences of AOA from the soils under tropical rainforest. Branches showed association to sequences from the *amoA* gene of *Archaea* obtained from soils under different land use followed by deforestation of tropical rainforest, suggesting that anthropic changes associated to implementation of pasture, management traditional agriculture and abandon of cultivated areas, followed by natural regeneration, may influence the genetic diversity of populations of AOA from soils under tropical rainforest in the Amazon.

Keywords: AOA; *amoA*; Nitrification; Soil; Tropical forests; Amazon

3.1 Introdução

A bacia amazônica abriga mais da metade do remanescente de floresta tropical do mundo, e provavelmente sustenta mais espécies do que qualquer outra região na Terra. Paisagens fragmentadas na Amazônia revelam mudanças na dinâmica florestal, estrutura, composição e microclima, e apresentam um mosaico de uso da terra que afeta negativamente uma variedade de espécies (LAURANCE et al., 2000). Estudos em longo prazo, como os realizados pelo *Biological Dynamics of Forest Fragments Project* (BDFFP) nas proximidades de Manaus, estado do Amazonas (LOVEJOY et al., 1986; BIERREGAARD et al., 1992), estão revelando que a fragmentação de *habitat* afeta a ecologia da floresta amazônica, alterando a diversidade biológica dos fragmentos (LAURANCE E BIERREGAARD, 1997) e modificando processos ecológicos como a ciclagem de nutrientes (DIDHAM, 1997).

Embora a Amazônia brasileira seja conhecida por sua diversidade de flora e fauna, relativamente poucos estudos foram publicados focalizando aspectos de ecologia microbiana analisados nesta região, principalmente aqueles relacionados com comunidades de *Archaea* do solo. Borneman e Triplett (1997) reportaram apenas duas sequências de *Archaea* na bacia amazônica entre 100 sequências do gene que codifica para a menor subunidade rRNA obtidas por amplificação pela técnica de PCR com *primers* universais. Fierer et al. (2007) usando o mesmo método analítico informaram que o número de UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais) em comunidades de *Archaea* provavelmente não excede 10^6 em solos da bacia amazônica do Peru.

Archaea constitui uma das três principais linhagens evolutivas da vida na Terra (WOESE, 1987; WOESE et al., 1990). Durante as duas últimas décadas, membros deste Domínio têm sido foco de pesquisas em ecologia microbiana devido à onipresença e abundância em vários ecossistemas terrestres perturbados naturalmente e por ação antrópica (CHABAN et al., 2006). Algumas *Archaea* podem conter gene que codifica para a subunidade da enzima monoxigenase de amônia (*amoA*) como reportado por Venter et al. (2004) usando análises por *shotgun* de sequências de DNA derivadas do Mar do Sargasso. Leininger et al. (2006) investigaram a abundância do gene *amoA* em 12 solos intemperizados e agrícolas de três zonas climáticas e verificaram que cópias de *amoA* de *Crenarchaeota* (*Archaea*) superavam em até 3000 vezes a abundância de genes *amoA* bacterianos. Considerando a onipresença de *Archaea* oxidadora de

amônia (AOA) em vários *habitats*, tais como corpos de água marinhos óxicos e subóxicos, sedimentos marinhos e solos (Francis et. al, 2005), parece provável que AOA também estão presentes em solos tropicais da Amazônia brasileira associadas ao processo de oxidação de amônia pelos quais o Domínio *Archaea* tem sido reconhecido como integrante no ciclo global do nitrogênio (JETTEN, 2008). Assim, a diversidade de *Archaea* desta região tropical é um objeto de grande interesse para estudos microbiológicos.

A bacia do Alto Solimões localizada na Amazônia Ocidental, estado do Amazonas, é território remanescente de povos indígenas e, pelo difícil acesso, permanece como uma região conservada da Amazônia, sendo um importante *hotspot* de biodiversidade. Ainda assim, a região do Alto Solimões apresenta paisagens florestais antropizadas com diferentes usos da terra. Entre os sistemas de uso da terra predominantes nesta região, destacam-se aqueles baseados no uso da floresta e os sistemas baseados predominantemente em produtos florestais, produtos animais e em culturas anuais. Os principais tipos de sistemas baseados em produtos florestais envolvem o sistema de produção florestal extensiva, na forma de agroflorestas, composto por vários estratos e diversidade de espécies; o sistema agroflorestal intensificado, composto por uma mistura de espécies arbóreas; e a monocultura de espécies florestais. Os sistemas baseados predominantemente em produtos animais podem ser divididos em uso de pastagens naturais ou espontâneas como fonte de forrageira e pastagem manejada para prover maior quantidade e qualidade de forragem. Os sistemas baseados predominantemente em culturas anuais identificados na região do Alto Solimões são representados por cultivo itinerante e pousio longo, que envolvem o abandono de áreas cultivadas permitindo a regeneração natural; ciclos intensivos e de intensidade média, com pousio médio a curto, entre 2 e 5 anos; e cultivo permanente ou pousio muito curto.

***Archaea* oxidadoras de amônia e sua importância no ciclo do nitrogênio**

Com o crescente número de estudos em ecologia molecular e a consequente descoberta de novos grupos microbianos, alguns princípios básicos têm sido revistos à luz dessas novas descobertas. Dentre alguns exemplos, pode-se citar a oxidação anaeróbica de metano por *Archaea* e a oxidação de amônia anaeróbica por planctomycetos (anamox) (STROUS E JETTEN, 2004). A

descoberta de *Archaea* (*Crenarchaeota*) oxidadoras de amônia representa um novo desafio que tem mudado a compreensão acerca do papel desses organismos no ciclo do nitrogênio e sua importância em diversos ecossistemas.

Membros do reino *Crenarchaeota* são ubíquos e constituem uma grande porção dos organismos mesofílicos em ambientes marinhos e terrestres (NICOL E SCHLEPER, 2006). Sequências do gene 16S rRNA de membros desse grupo já foram recuperadas de amostras de solos sob vegetação florestal, cultivos agrícolas, pastagem, solos alpinos (BINTRIM et al., 1997; JURGENS et al., 1997; BUCKLEY et al., 1998; NICOL et al., 2003), água doce (JURGENS et al., 2000), sedimentos, (SCHLEPER et al., 1997; VETRIANI et al., 1999), tecidos e trato intestinal de animais terrestres e marinhos (PRESTON et al., 1996; van der MAAREL et al., 1998; FRIEDRICH et al., 2001). Membros desse grupo foram recentemente identificados como portadores de genes codificando para amônia monooxigenase (VENTER et al., 2004; KÖNNEKE et al., 2005; SCHLEPER et al., 2005; TREUSCH et al., 2005).

A oxidação de amônia, o primeiro passo do processo da nitrificação, consiste na oxidação de amônia a nitrito através do metabolismo autotrófico dos micro-organismos em questão. Em solos, a oxidação de amônia pode acarretar perda de nitrogênio devido à mineralização ou lixiviação do nitrito. Até recentemente, considerava-se que a oxidação de amônia era realizada em grande parte pelas bactérias (AOB, *Ammonia-Oxidizing Bacteria*), que formam dois grupos monofiléticos distintos dentre as delta e betaproteobactérias (NICOL E SCHLEPER, 2006).

Estudos envolvendo a assimilação de isótopos de carbono na forma inorgânica (KUYPERS et al., 2001; PEARSON et al., 2001; HERNDL et al., 2005; WUCHTER et al., 2006) já indicavam a capacidade das *Archaea* incorporar esse carbono autotroficamente. Esses estudos, porém, não determinavam qual a fonte de energia utilizada. A primeira ligação entre esses organismos e os envolvidos na oxidação de amônia foi a descoberta de um clone metagenômico de uma amostra de solo, contendo genes *amo* putativos e um *operon* para RNA ribossomal de *Crenarchaeota* (TREUSCH et al., 2005). Essa descoberta foi corroborada pelos resultados obtidos por Venter et al. (2004) ao identificar outro *operon* no sequenciamento do metagenoma do mar do Sargasso, levando à hipótese de oxidação de amônia pelos *Crenarchaeota* (SCHLEPER et al., 2005). Essa hipótese foi comprovada em 2005 com o isolamento de *Nitropumilus maritimus*,

organismo quimiolitotrófico que utiliza amônia como forma de energia (KÖNNEKE et al., 2005). Porém, a grande mudança na visão dos estudiosos do ciclo do nitrogênio surgiu quando Leininger et al. (2006) mostraram que em doze amostras de solo de diferentes origens e usos na Europa (solos de floresta e sob agricultura) a quantidade de RNA que codifica para amônia monoxigenase de origem bacteriana era de 1,5 a 232 vezes menor que a transcrita por *Archaea*. De acordo com o referido estudo, as *Archaea* passaram a ser compreendidas como as principais responsáveis pelo processo da oxidação de amônia nos solos.

Neste estudo, sequências do gene *amoA* de *Archaea* obtidas de solos sob floresta primária tropical úmida, cultivo agrícola tradicional (roça de mandioca), pastagem homogênea implantada há mais de 30 anos e floresta secundária em estágio avançado de regeneração (>10 anos de abandono da área) na Amazônia Ocidental brasileira, revelaram a diversidade de AOA nestes solos e permitiram calcular parâmetros ecológicos associados a essas comunidades sob os diferentes usos da terra.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Métodos

3.2.1.1 Área de estudo e amostragem

As informações referentes à caracterização da área de estudo e ao processo de amostragem dos solos têm sido descritas no item 2.2.1.1 deste trabalho.

3.2.1.2 Extração do DNA total do solo

Para a realização deste trabalho foram utilizadas amostras de solo coletadas na campanha de 2008. Para extração do DNA total do solo utilizou-se o *kit Power Soil DNA ExtractionTM* (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA) conforme descrito no item 2.2.1.2.

3.2.1.3 Amplificação, clonagem e sequenciamento de fragmentos do gene *amoA* de *Archaea*

Fragmentos do gene *amoA* de *Archaea* (635 pb) foram amplificados utilizando os iniciadores Arch-amoAF (5'-STA ATG GTC TGG CTT AGA CG-3') e Arch-amoAR (5'-GCG GCC ATC CAT CTG TAT GT-3') (FRANCIS et al., 2005) a partir de *pools* separados do DNA total dos solos coletados sob floresta primária tropical, cultivo agrícola tradicional, pastagem e floresta secundária em estágio avançado de regeneração. A amplificação foi feita em solução contendo: 2,5 µL de tampão para PCR 10 X, 0,8 mM de cada dNTP (2,0 µL), 5,0 mM de MgCl₂ (2,5 µL), 8,0 pmoles de cada *primer* (0,08 µL), 1,25 U de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen) (0,25 µL), 1 µL do *pool* de DNA total do solo, e água ultra-pura (Milli-Q) esterilizada para um volume final de 25 µL. As condições de reação foram 95° C por 5 minutos, 35 ciclos de 94° C por 45 segundos, 53° C por 1 minuto e 72° C por 1 minuto; e 72° C por 10 minutos. O produto amplificado foi purificado utilizando o kit *GFXTM PCR DNA e Gel Band Purification* (GE Healthcare) e clonado em vetor *pGEM-T Easy* de acordo com as instruções contidas no Kit *pGEM-T Easy Vector* (Promega). O cálculo da razão inserto:vetor foi realizado de acordo com a fórmula: [(ng vetor X tamanho do inserto em Kb)/tamanho do vetor em Kb] X razão molar inserto:vetor = ng de inserto.

O vetor contendo o inserto foi inserido em células competentes de *E.coli* DH5α através de choque térmico (SAMBROOK et al., 1989). O processo de transformação foi feito da seguinte forma: 2 µL do produto de ligação e 50 µL de células competentes foram adicionados em microtubos, misturados gentilmente e incubados no gelo por 30 minutos. Em seguida, os microtubos foram incubados a 42° C por 50 segundos e posteriormente mantidos em gelo por 2 minutos. Adicionou-se 450 µL de meio SOC (SAMBROOK et al., 1989) e a mistura foi incubada a 37° C, por 2 horas, sob agitação de 200 rpm. As células competentes transformadas foram cultivadas em placas de Petri contendo meio LB-ágar, acrescido de ampicilina, X-Gal e IPTG (todos em concentração final de 100 µg.mL⁻¹). As células foram incubadas em estufa a 37° C, por 16 horas, e após este período as placas foram armazenadas a 4° C para facilitar a visualização e a seleção das colônias contendo o inserto. Pelo fato do vetor utilizado no estudo possuir o sistema β-galactosidase induzido pelo IPTG e sinalizado pelo indicador X-Gal, clones contendo o fragmento ligado ao plasmídeo transformado apresentaram coloração branca e os clones que receberam o plasmídeo sem o fragmento ligado apresentaram coloração azul (indicando a

expressão do gene *lacZ*). Assim, as colônias com coloração branca (correspondendo aos possíveis clones positivos) foram repicadas novamente em meio *Cicle Grow* (Bio 101, Inc) e incubadas a 37° C por 20 horas para confirmação das células transformadas e isolamento dos clones.

Após a estocagem dos clones, foi feita a extração do DNA plasmidial das culturas (BIRNBOIM E DOLY, 1979), segundo protocolo modificado. A placa foi centrifugada a 4000 rpm por 6 minutos a 20° C. O meio de cultura foi descartado e verificou-se a presença de precipitado. A placa foi mantida em posição invertida sobre papel absorvente por 5 minutos. Em cada cavidade foram adicionados 240 µL de solução GTE (Glicose 50 mM; Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM, pH 8,0) e agitou-se vigorosamente por 2 minutos. O material foi centrifugado a 4000 rpm por 6 minutos a 20° C e o sobrenadante descartado. A placa foi novamente invertida sobre o papel absorvente por 5 minutos. As células foram ressuspensas em 80 µL de solução GTE e agitou-se por 2 minutos. Em uma microplaca de fundo U (tipo Elisa) foram adicionados 2,5 µL de RNase em cada cavidade (10 mg.mL⁻¹) e 60 µL de cada suspensão de células. Adicionou-se 60 µL de NaOH/SDS (NaOH 0,2 N; SDS 1%), inverteu-se a placa 10 vezes, incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugou-se a 4000 rpm por 30 segundos a 20° C. Foram adicionados 60 µL de acetato de potássio 3 M, pH 4,8 (29,44 g de KOAc foram dissolvidos em 60 mL de água e adicionados 11,5 mL de ácido acético glacial; o volume foi completado para 100 mL com água ultra-pura Milli-Q autoclavada) e novamente foi feita mistura por inversão. A placa contendo os plasmídeos foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente, centrifugada a 4000 rpm por 30 segundos a 20° C e incubada em estufa a 90° C por exatos 30 minutos. Após esse período, as amostras foram colocadas em gelo por 10 minutos e centrifugadas a 4000 rpm por 4 minutos a 20° C. Todo o volume das amostras foi transferido para uma microplaca com filtro (PVDF – 0,2 µm – Millipore) e centrifugado a 4000 rpm por 4 minutos a 20° C. Adicionou-se ao material filtrado 110 µL de isopropanol absoluto e a solução foi misturada por inversão. O material foi centrifugado a 4000 rpm por 45 minutos a 20° C. Depois de centrifugado o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 200 µL de etanol 70% gelado e, posteriormente, centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos a 20° C. O sobrenadante foi descartado e a placa foi centrifugada invertida sobre o papel absorvente a 900 rpm por 3 minutos a 20° C. As amostras foram deixadas por 1 hora a temperatura ambiente para secagem e posteriormente ressuspensas em 40 µL de água ultra-pura (Milli-Q) autoclavada. A placa foi incubada por 16 horas a temperatura ambiente para solubilização do material e armazenada a -20°

C. Para verificação e quantificação da extração do DNA plasmidial, uma alíquota de 2 μL de DNA adicionada a 3 μL de tampão de carregamento foi aplicada em gel de agarose 1%. O Marcador molecular *Low DNA Mass ladder* (Invitrogen) foi aplicado para verificação das concentrações. O gel foi documentado através do programa *Kodak digital science 1D* (Scientific Imaging Systems).

Para a confirmação da inserção dos fragmentos no vetor de clonagem, foram realizadas reações de PCR utilizando os *primers* para o gene *amoA* de *Archaea* – Arch-amoAF e Arch-amoAR, como descrito anteriormente, confirmando a presença dos fragmentos de tamanho desejado (635 pb). O perfil da amplificação dos fragmentos obtidos indicou que aproximadamente 100% das amostras avaliadas continham o fragmento correspondente ao gene *amoA* de *Archaea*.

As reações de sequenciamento foram feitas utilizando separadamente os *primers* do vetor M13F (5'-CCCAGTCACGACGTTGTAACG-3') e M13R (5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3') da seguinte maneira: 200 ng de DNA plasmidial, 2 μL de *DYEnamic* (DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit, Amersham, Biosciences GE), 1 μL de um dos *primers* a 5 pmoles, 3 μL de buffer de diluição 2,5 X (400 mM Tris-HCl pH 9,0; 10 mM MgCl_2) e água ultra-pura (Milli-Q) esterilizada para um volume final de 10 μL . As reações foram conduzidas em termociclador nas seguintes condições: 30 ciclos com desnaturação a 95° C por 20 segundos, anelamento a 55° C por 15 segundos, extensão a 60° C por 60 segundos. Ao final do programa as amostras permaneceram no termociclador a 4° C.

Após a reação, as amostras foram precipitadas para o sequenciamento conforme instrução do fabricante. Adicionou-se 2 μL de solução de acetato de sódio/EDTA e 60 μL de etanol absoluto. O material foi misturado em *vortex* e centrifugado a 4000 rpm por 45 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e a placa foi centrifugada em posição invertida sobre papel absorvente a 900 rpm por 30 segundos. Adicionou-se 150 μL de etanol 70% e centrifugou-se a 4000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e a placa foi centrifugada em posição invertida sobre papel absorvente a 900 rpm por 30 segundos a temperatura ambiente. As amostras foram secas em termociclador a 40° C por 10 minutos, ressuspendidas em 10 μL de *Hi-Di Formamide* (Applied Biosystems) e agitadas em *vortex* por 10

minutos. O sequenciamento dos clones foi realizado em sequenciador capilar automático modelo ABI PRISM 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

3.2.1.4 Análises das sequências, parâmetros ecológicos, medidas de diversidade e estatística

As sequências nucleotídicas tiveram seus cromatogramas analisados e posteriormente foram editadas utilizando os programas Phred/Phrap/Consed em sistema operacional *Linux* (EWING & GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON et al., 1998) a fim de estabelecer as sequências consenso para cada clone, remover as bases com baixa qualidade e as sequências do vetor. O nível de exigência mínimo foi de 600 bases e Phred com qualidade de base acima de 20 (1 erro a cada 100 bases lidas).

As sequências consenso foram comparadas com sequências de nucleotídeos disponibilizadas no banco de dados do *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando os programas *nucleotide blast* e *blastx* do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL et al, 1990).

Após o alinhamento múltiplo, realizado no programa *Clustal X2* (LARKIN et al., 2007), das sequências do gene *amoA* de *Archaea* obtidas dos clones e traduzidas *in silico* para proteína (*CLC Sequence Viewer 6.0.2* - CLC bio) e das sequências referências do *GenBank*, foram construídos agrupamentos filogenéticos no programa MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU E NEI, 1987) baseado na estimativa de distância calculada pelo método de *Jukes-Cantor* (JUKES E CANTOR, 1969), usando modelo de substituição de resíduos de aminoácidos por Matriz PAM (Dayhoff) e valor de *bootstrap* de 1000 repetições.

Para análise das medidas de diversidade das bibliotecas do gene *amoA* de *Archaea* obtidas nos diferentes sistemas de uso da terra estudados, utilizou-se o programa DOTUR (*Distance-Based OTU and Richness Determination*) (SCHLOSS E HANDELSMAN, 2005). Para tanto, utilizou-se uma matriz de distância evolutiva calculada com o DNAdist (algoritmo de *Jukes-Cantor*) do PHYLIP 3.63 (FELSENSTEIN, 1989), a partir do alinhamento feito no *Clustal X2*

(LARKIN et al., 2007), com definições de parâmetros padrão, exceto “gap-opening penalty” (10,0) e “gap-extension penalty” (1,0). A riqueza de UTOs foi estimada mediante o cálculo de curvas de rarefação e dos estimadores Chao1 e ACE. A heterogeneidade das comunidades de AOA foi verificada com os índices de *Shannon-Wiener* e *Simpson*.

A comparação entre as bibliotecas foi feita utilizando o programa J-Libshuff (SCHLOSS et al., 2004; SINGLETON et al., 2001) após o alinhamento das sequências e cálculo das matrizes de distância evolutiva conforme descrito acima. O programa J-Libshuff realiza comparações assimétricas pareadas entre diferentes bibliotecas e fornece a significância das diferenças entre elas.

3.2.2 Resultados

Bibliotecas de clones *amoA* de *Archaea* foram geradas para cada sistema de uso da terra (floresta primária, cultivo agrícola tradicional, pastagem e floresta secundária em estágio avançado de regeneração) a partir do DNA total extraído das amostras de solo coletadas no ano de 2008 nas áreas amostrais deste estudo em Benjamin Constant. Os resultados das análises das bibliotecas do gene *amoA* de *Archaea* apresentados a seguir foram obtidos com a utilização de vários programas de bioinformática conforme discriminado no fluxograma apresentado na Figura 3.1.

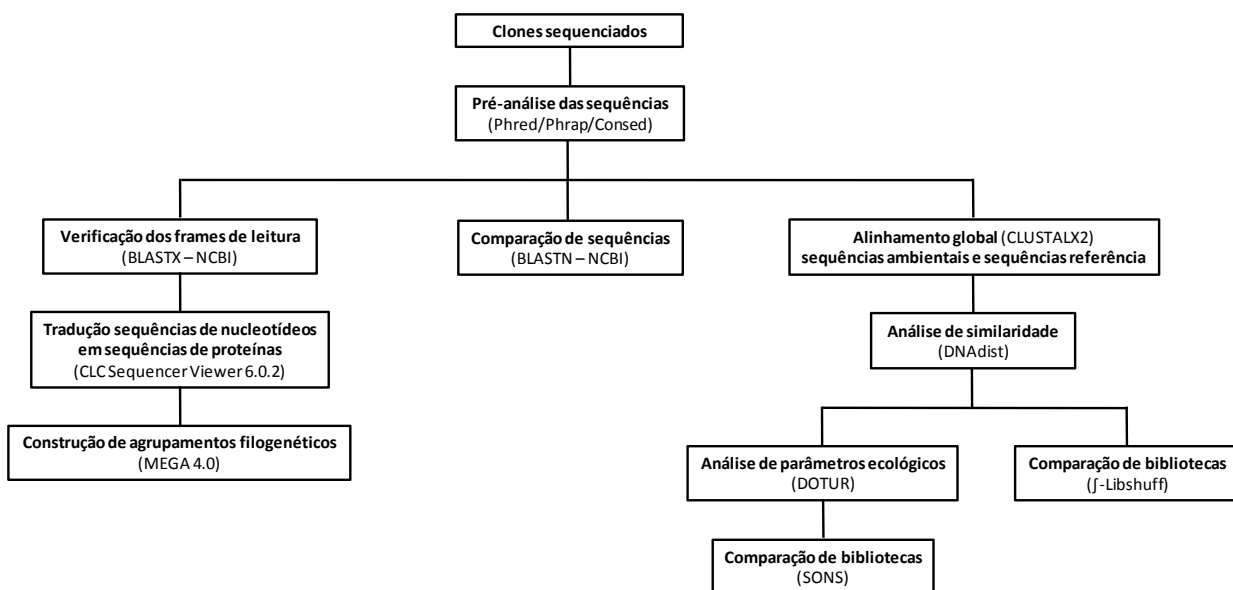


Figura 3.1 - Fluxograma mostrando as etapas e os programas de bioinformática empregados nas análises das sequências do gene *amoA* de *Archaea*

3.2.2.1 Análises das sequências e parâmetros ecológicos das bibliotecas do gene *amoA* de *Archaea*

Após os processos de análise da qualidade das sequências pelos programas Phred/Phrap/Consed, de um total de 423 clones sequenciados, obteve-se 310 sequências do gene *amoA* de *Archaea* com qualidade Phred acima de 20 e tamanho médio de aproximadamente 635 pb (Tabela 3.1). Todas as 310 sequências foram pré-analisadas e editadas.

O número de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) foi determinado utilizando o programa DOTUR (*Distance-Based OTU and Richness Determination*). O programa DOTUR define o número de UTOs para diferentes faixas de distância, usando algoritmos de agrupamentos por *complete-linkage (furthest neighbor)*, de modo que uma sequência só é adicionada a um dado grupo caso tenha uma porcentagem de similaridade (*cutoff*) com todos os seus componentes. Beman & Francis (2006) utilizaram *cutoff* de 5% de dissimilaridade para analisar bibliotecas do gene que codifica para amônia monoxigenase (*amoA*), tendo sido este o valor adotado para

analisar a similaridade entre as sequências do gene *amoA* de *Archaea* neste trabalho. O número de UTOs definido pelo programa DOTUR para as diferentes bibliotecas encontra-se listado na tabela a seguir juntamente com o número de clones sequenciados e válidos.

Tabela 3.1 - Número total de clones sequenciados, clones válidos e UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais)

Biblioteca	Clones sequenciados	Clones válidos	Número de UTOs*
Floresta Primária	96	81	11
Cultivo Agrícola Tradicional	96	72	9
Pastagem	135	84	14
Floresta Secundária	96	73	4
TOTAL	423	310	38

*Número de UTOs definido pelo programa DOTUR com base em *cutoff* de 95% de similaridade

Todas as sequências referentes aos clones válidos foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados do *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando o programa *nucleotide blast* do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). As Tabelas 3.2 e 3.3 mostram o número de sequências componentes de cada UTO definida pelo programa DOTUR e apresentam algumas informações referentes às sequências depositadas no banco de dados com valor de identidade igual e superior a 95% quando alinhadas com as sequências dos clones válidos pertencentes a cada biblioteca analisada.

Tabela 3.2 - Resultado das comparações das seqüências do gene *amoA* de *Archaea* referentes aos clones válidos das bibliotecas de floresta primária e cultivo agrícola tradicional com seqüências depositadas no *GenBank* do NCBI

	Nº Acesso	Nº seq/UTO	UTOs	<i>evalue</i>	Organismo	Ambiente - Autor
Floresta Primária	FJ601580	11, 3	A, B	0,0	Uncultured crenarchaeote clone MS_49A7 ammonia monoxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Sedimentos estuarinos tropical – Singh et al. (2009)
	EU885696	22, 4, 6	C, D, E	0,0	Uncultured crenarchaeote clone 3063-A-27 putative ammonia monoxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Sedimento tropical do Oeste Pacífico – Dang et al. (2009)
	EU667885	10	F	0,0	Uncultured crenarchaeote clone MAR_AOA_11 putative ammonia monoxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Sedimentos de rio – Herrman et al. (2009)
	EU885578	8	G	0,0	Uncultured crenarchaeote clone 3043-A-33 putative ammonia monoxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Sedimento tropical do Oeste Pacífico – Dang et al. (2009)
	EU885702	3	H	0,0	Uncultured crenarchaeote clone 3063-A-33 putative ammonia monoxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Sedimento tropical do Oeste Pacífico – Dang et al. (2009)
	EU885576	3, 3	I, J	0,0	Uncultured crenarchaeote clone 3043-A-31 putative ammonia monoxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Sedimento tropical do Oeste Pacífico – Dang et al. (2009)
	FJ227780	8	K	0,0	Uncultured crenarchaeote clone WBMO50405_45P6G10 putative ammonia monoxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Sedimentos estuarinos – Bano et al. (2008)
Cultivo Agrícola Tradicional	EU885672	16	A	0,0	Uncultured crenarchaeote clone 3063-A-03 putative ammonia monoxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Sedimento tropical do Oeste Pacífico – Dang et al. (2009)
	EU885557	1	B	0,0	Uncultured crenarchaeote clone 3043-A-12 putative ammonia monoxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Sedimento tropical do Oeste Pacífico – Dang et al. (2009)
	EU885677	1	C	0,0	Uncultured crenarchaeote clone 3063-A-08 putative ammonia monoxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Sedimento tropical do Oeste Pacífico – Dang et al. (2009)
	EU590184	38	D	0,0	Uncultured ammonia-oxidizing archaeon clone BGA-S46 ammonia monoxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Solo protegido – Liu & Xie (2008)
	EU885689	3	E	0,0	Uncultured crenarchaeote clone 3063-A-20 putative ammonia monoxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Sedimento tropical do Oeste Pacífico – Dang et al. (2009)
	EF207223	2	F	0,0	Uncultured crenarchaeote clone QY-A47 ammonia monoxygenase (<i>amoA</i>) gene	Solo agrícola na China – He et al. (2007)
	EU885578	2	G	0,0	Uncultured crenarchaeote clone 3043-A-01 putative ammonia monoxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Sedimento tropical do Oeste Pacífico – Dang et al. (2009)
	FJ601580	3	H	0,0	Uncultured crenarchaeote clone MS_49A7 ammonia monoxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Sedimentos estuarinos tropical – Singh et al. (2008)
	FJ601602	6	I	0,0	Uncultured crenarchaeote clone ZS_2B1 ammonia monoxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Sedimentos estuarinos tropical – Singh et al. (2008)

Tabela 3.3 - Resultado das comparações das seqüências do gene *amoA* de *Archaea* referentes aos clones válidos das bibliotecas de pastagem e floresta secundária com seqüências depositadas no *GenBank* do NCBI

	Nº Acesso	Nº seq/UTO	UTOs	<i>evalue</i>	Organismo	Ambiente - Autor
Pastagem	FJ517350	25	A	0,0	Uncultured crenarchaeote clone AOA-R19 ammonia monooxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Solos sob diferentes usos da terra na China – Ying et al. (2008)
	FJ227738	10	B	0,0	Uncultured crenarchaeote clone WBF050405_42P1D2 putative ammonia monooxygenase subunit A (<i>amoA</i>)	Sedimentos estuarinos – Bano et al. (2008)
	EU885696	2	C	0,0	Uncultured crenarchaeote clone 3063-A-27 putative ammonia monooxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Sedimento tropical do Oeste Pacífico – Dang et al. (2009)
	FJ227773	1	D	0,0	Uncultured crenarchaeote clone WBF050405_42P2B8 putative ammonia monooxygenase subunit A (<i>amoA</i>)	Sedimentos estuarinos – Bano et al. (2008)
	EF207214	1	E	0,0	Uncultured crenarchaeote clone AOA-R12 ammonia monooxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Solos sob diferentes usos da terra na China – Ying et al. (2008)
	FJ601602	9	F	0,0	Uncultured crenarchaeote clone ZS_2B1 ammonia monooxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Sedimentos estuarinos tropical – Singh et al. (2008)
	EU885578	19	G	0,0	Uncultured crenarchaeote clone 3043-A-33 putative ammonia monooxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Sedimento tropical do Oeste Pacífico – Dang et al. (2009)
	EU885576	10	H	0,0	Uncultured crenarchaeote clone 3043-A-31 putative ammonia monooxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Sedimento tropical do Oeste Pacífico – Dang et al. (2009)
	FJ601586	1	I	0,0	Uncultured crenarchaeote clone MS_55G7 ammonia monooxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Sedimentos estuarinos tropical – Singh et al. (2008)
	EU885672	1	J	0,0	Uncultured crenarchaeote clone 3063-A-03 putative ammonia monooxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Sedimento tropical do Oeste Pacífico – Dang et al. (2009)
	EU590184	1	k	0,0	Uncultured ammonia-oxidizing archaeon clone BGA-546 ammonia monooxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Solo protegido – Liu & Xie (2008)
	EU590564	2	L	0,0	Uncultured ammonia-oxidizing archaeon clone SGX-523 ammonia monooxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Solo protegido – Liu & Xie (2008)
	FJ227705	1	M	0,0	Uncultured crenarchaeote clone WBF050405_42A10 putative ammonia monooxygenase subunit A (<i>amoA</i>)	Sedimentos estuarinos – Bano et al. (2008)
	EU885689	1	N	0,0	Uncultured crenarchaeote clone 3063-A-20 putative ammonia monooxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Sedimento tropical do Oeste Pacífico – Dang et al. (2009)
Floresta Secundária	EF207210	53	A	0,0	Uncultured crenarchaeote clone QY-A34 ammonia monooxygenase (<i>amoA</i>) gene	Solo sob práticas de fertilização – He et al. (2007)
	EU885672	2	B	0,0	Uncultured crenarchaeote clone 3063-A-03 putative ammonia monooxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Sedimento tropical do Oeste Pacífico – Dang et al. (2009)
	EU590313	9	C	0,0	Uncultured ammonia-oxidizing archaeon clone BGA-152 ammonia monooxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Solo protegido – Liu & Xie (2008)
	EU885571	10	D	0,0	Uncultured crenarchaeote clone 3043-A-26 putative ammonia monooxygenase subunit A (<i>amoA</i>) gene	Sedimento tropical do Oeste Pacífico – Dang et al. (2009)

A relação entre o número de clones válidos e o número de UTOs observado foi expressa para cada biblioteca do gene *amoA* de *Archaea* usando o método da rarefação (Figura 3.2). As curvas representaram graficamente as diferenças observadas na riqueza de UTOs das bibliotecas referentes aos sistemas de uso da terra estudados. A biblioteca do gene *amoA* de *Archaea* dos solos sob pastagem mostrou maior riqueza de UTOs em comparação com as demais bibliotecas. Apenas quatro UTOs foram definidas para a biblioteca dos solos sob floresta secundária, tendo sido esta a que apresentou menor riqueza de UTOs. Com base no número de clones válidos considerados nesta análise de riqueza, a biblioteca dos solos sob floresta primária apresentou riqueza de UTOs inferior apenas à evidenciada para os solos sob pastagem. As curvas de rarefação referentes às bibliotecas dos solos sob floresta primária e floresta secundária atingiram a assíntota com 50 clones e 30 clones, respectivamente. A curva plotada para a biblioteca dos solos sob cultivo agrícola tradicional mostrou tendência de atingir a assíntota, sendo que a curva referente à biblioteca dos solos sob pastagem sugeriu a existência de UTOs não amostradas.

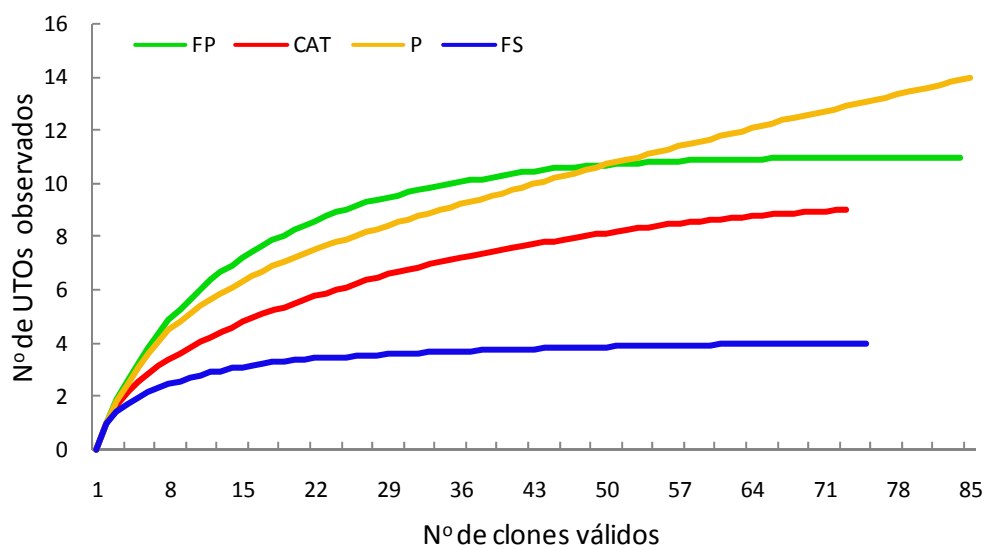


Figura 3.2 - Curvas de rarefação indicando a riqueza de UTOs em bibliotecas do gene *amoA* de *Archaea* derivadas de solos sob floresta primária (FP), cultivo agrícola tradicional (CAT), pastagem (P) e floresta secundária em estágio avançado de regeneração (FS). As UTOs foram definidas com base em sequências que diferiram $\leq 5\%$ ao nível do DNA

A riqueza de UTOs nas bibliotecas do gene *amoA* de *Archaea* foi analisada usando também os métodos não-paramétricos ACE (*Alternating Conditional Expectation Analysis*), Chao1 e Jackknife. Os valores de estimativa de riqueza foram apresentados na Tabela 3.4 juntamente com as medidas de heterogeneidade calculadas pela função de *Shannon-Wiener* e pelo índice de *Simpson*.

Tabela 3.4 - Estimativas de riqueza de UTOs e medidas de heterogeneidade referentes às sequências do gene *amoA* de *Archaea* das bibliotecas geradas para os diferentes sistemas de uso da terra

Biblioteca	Estimativas de riqueza de UTOs*			Medidas de heterogeneidade*	
	ACE	Chao1	Jackknife	Shannon-Wiener	Simpson
Floresta Primária	11,00	11,00	11,00	1,9901	0,1718
Cultivo Agrícola Tradicional	10,28	9,33	11,00	1,4613	0,3309
Pastagem	28,31	21,00	21,00	2,1486	0,1366
Floresta Secundária	4,00	4,00	4,00	0,8633	0,5405

*Medidas de diversidade calculadas com base em *cutoff* de 95% de similaridade entre as sequências do gene *amoA* de *Archaea*

Os estimadores de riqueza ACE, Chao1 e Jackknife retrataram numericamente as diferenças na riqueza de UTOs nas bibliotecas do gene *amoA* de *Archaea* mostradas pelas curvas de rarefação. O valor elevado expresso pelo estimador Jackknife para a biblioteca dos solos sob pastagem (21,00) foi devido ao número de UTOs únicas (representadas por apenas uma sequência do gene *amoA* de *Archaea*) encontrado nesta biblioteca (ver Tabelas 3.2 e 3.3). O cálculo do estimador Jackknife foi estabelecido com base na frequência de UTOs únicas na biblioteca.

As medidas de heterogeneidade combinam dois componentes da diversidade biológica, riqueza e equitatividade (distribuição da abundância das UTOs nas bibliotecas), a fim de fornecer, no âmbito deste estudo, uma medida da organização das bibliotecas de clones. O índice de *Simpson* sugere que a diversidade é inversamente relatada pela probabilidade de que duas sequências do gene *amoA* pertençam à mesma UTO. Por sua vez, a função *Shannon-Wiener* expressa a dificuldade de se predizer corretamente a UTO a qual irá pertencer uma determinada sequência no decorrer do processo de análise. Com base nessas informações, os valores calculados para essas duas medidas de heterogeneidade com base nas bibliotecas do gene *amoA* de *Archaea* revelaram maior diversidade de *Archaea* oxidadora de amônia para os solos sob

pastagem, seguido por menor diversidade deste grupo funcional nos solos sob floresta primária, cultivo agrícola tradicional e floresta secundária, consecutivamente.

As análises das bibliotecas pelo programa J-Libshuff mostraram diferença significativa ($P=0.0000$) ao analisar comparativamente as sequências do gene *amoA* de *Archaea* das bibliotecas geradas para cada sistema de uso da terra.

3.2.2.2 Análises filogenéticas

Para a realização de análises filogenéticas, inicialmente foram selecionadas 29 sequências referência do gene *amoA* de *Archaea* com base em agrupamentos filogenéticos estabelecidos por Francis et al. (2005) e Park et al. (2006). A Tabela C.1 (ANEXO C) apresenta informações obtidas no *GenBank* para as sequências referência utilizadas neste trabalho.

Os agrupamentos filogenéticos definidos após o alinhamento múltiplo das sequências referência e das sequências do gene *amoA* de *Archaea* obtidas dos clones válidos, e traduzidas *in silico* para proteína, pertencentes às bibliotecas dos solos sob floresta primária, cultivo agrícola tradicional, pastagem e floresta secundária em estágio avançado de regeneração, são apresentados nas Figuras 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6, respectivamente.

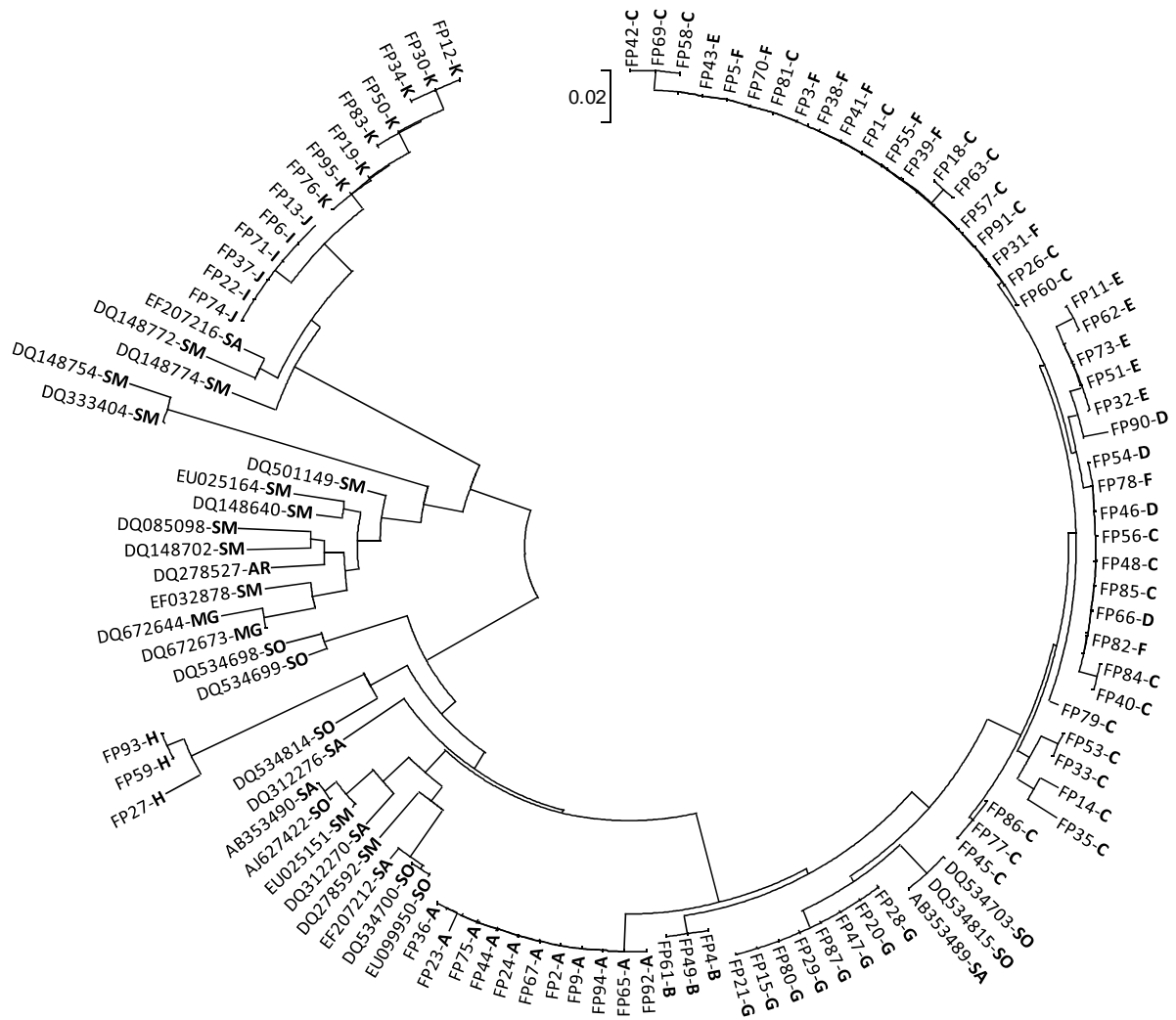


Figura 3.3 - Agrupamento filogenético gerado a partir do alinhamento múltiplo das seqüências referência e das 81 seqüências do gene *amoA* de *Archaea* obtidas dos clones válidos, e traduzidas *in silico* para proteína, pertencentes à biblioteca dos solos sob floresta primária. As letras em caixa alta e negrito associadas à denominação dos clones indicam a UTO à qual pertencem, conforme definido pelo programa DOTUR com base em *cutoff* de 5% de dissimilaridade entre as seqüências. As abreviações (SA, SO, SM, MG e AR) remetem aos ambientes de procedência das seqüências referência (Solo Agrícola, Solo, Sedimento Marinho, Mina Geotérmica e Águas Residuais, respectivamente)

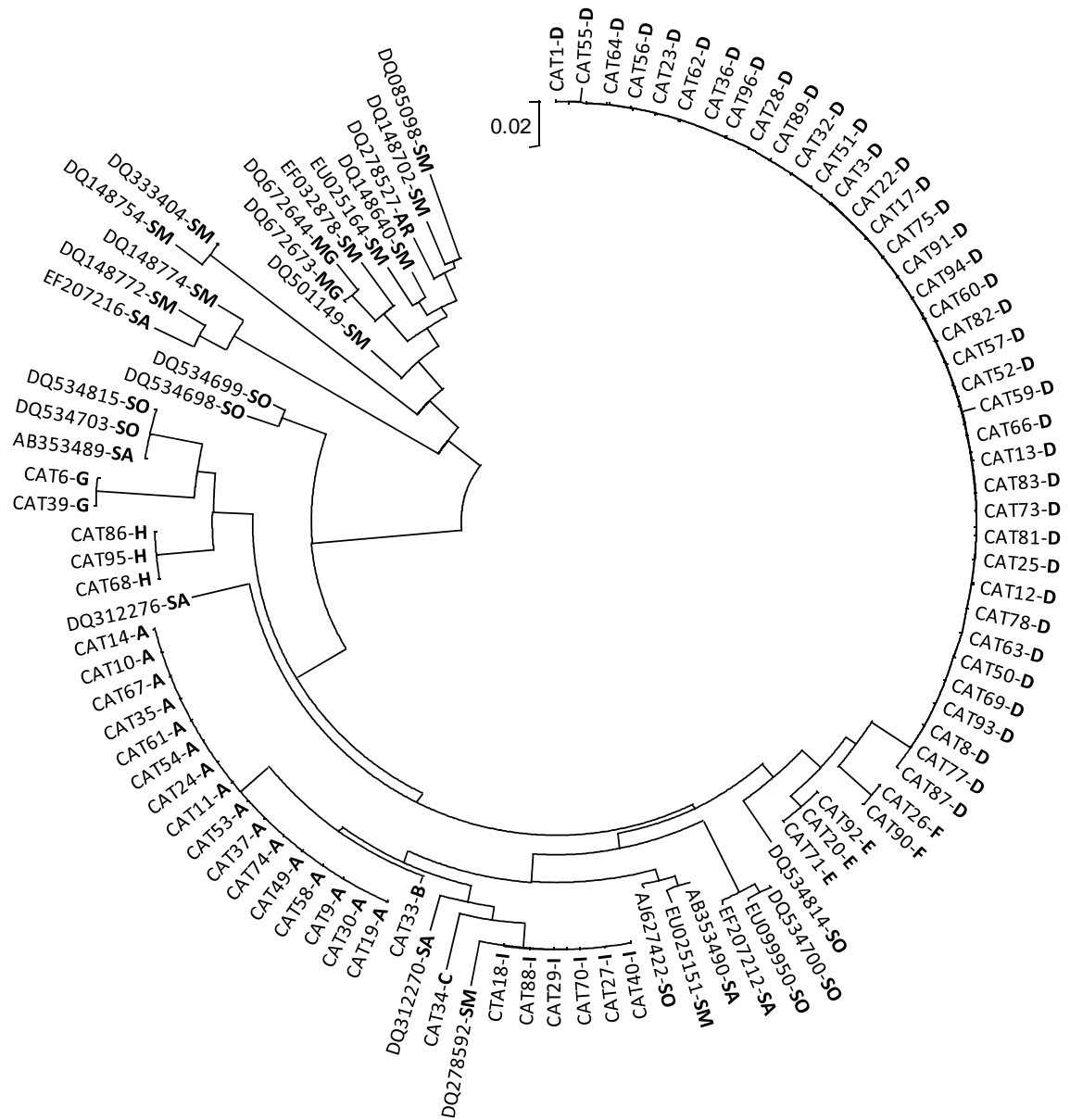


Figura 3.4 - Agrupamento filogenético gerado a partir do alinhamento múltiplo das sequências referência e das 72 sequências do gene *amoA* de *Archaea* obtidas dos clones válidos, e traduzidas *in silico* para proteína, pertencentes à biblioteca dos solos sob cultivo agrícola tradicional. As letras em caixa alta e negrito associadas à denominação dos clones indicam a UTO à qual pertencem, conforme definido pelo programa DOTUR com base em *cutoff* de 5% dissimilaridade entre as sequências. As abreviações (SA, SO, SM, MG e AR) remetem aos ambientes de procedência das sequências referência (Solo Agrícola, Solo, Sedimento Marinho, Mina Geotérmica e Águas Residuais, respectivamente)

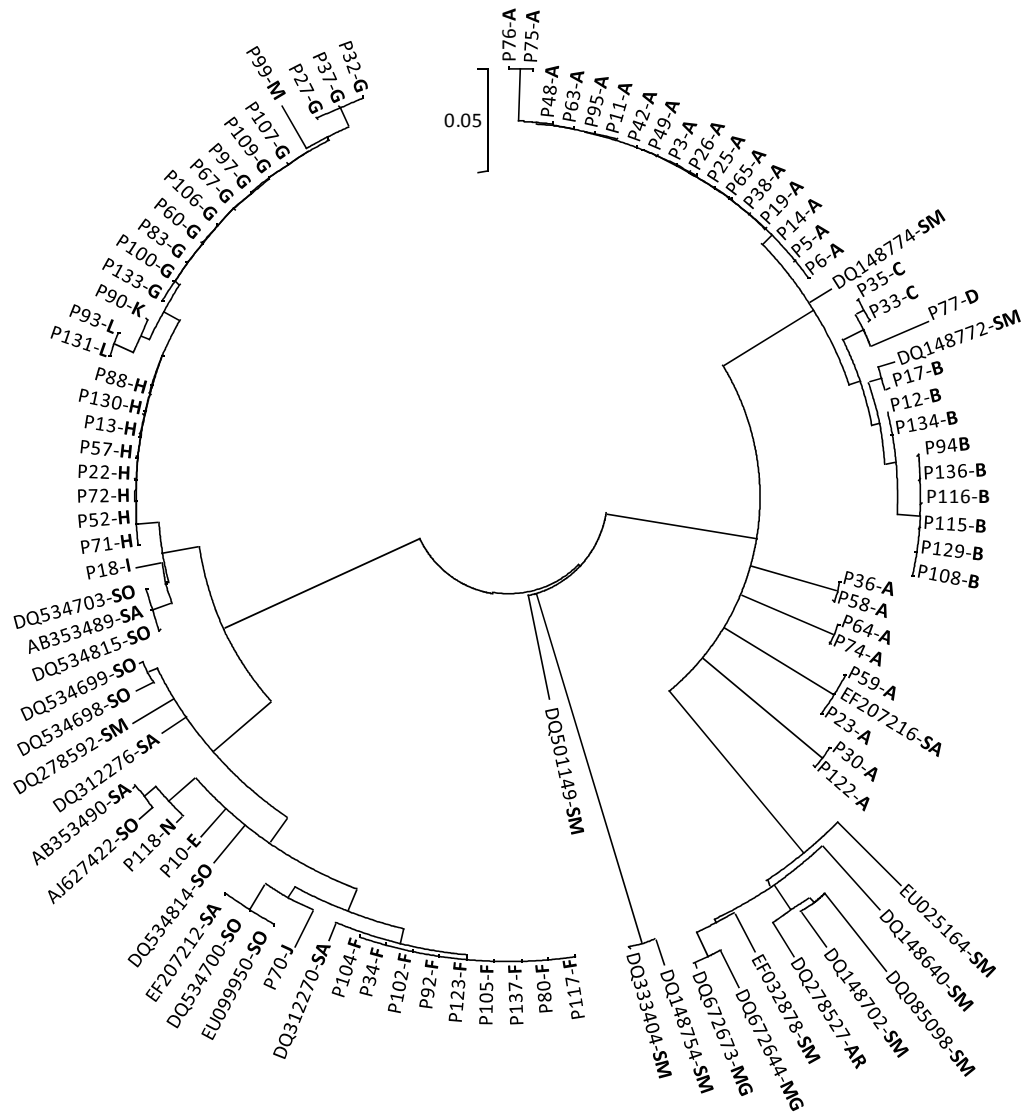


Figura 3.5 - Agrupamento filogenético gerado a partir do alinhamento múltiplo das sequências referência e das 84 sequências do gene *amoA* de *Archaea* obtidas dos clones válidos, e traduzidas *in silico* para proteína, pertencentes à biblioteca dos solos sob pastagem. As letras em caixa alta e negrito associadas à denominação dos clones indicam a UTO à qual pertencem, conforme definido pelo programa DOTUR com base em *cutoff* de 5% de dissimilaridade entre as sequências. As abreviações (SA, SO, SM, MG e AR) remetem aos ambientes de procedência das sequências referência (Solo Agrícola, Solo, Sedimento Marinho, Mina Geotérmica e Águas Residuais, respectivamente)

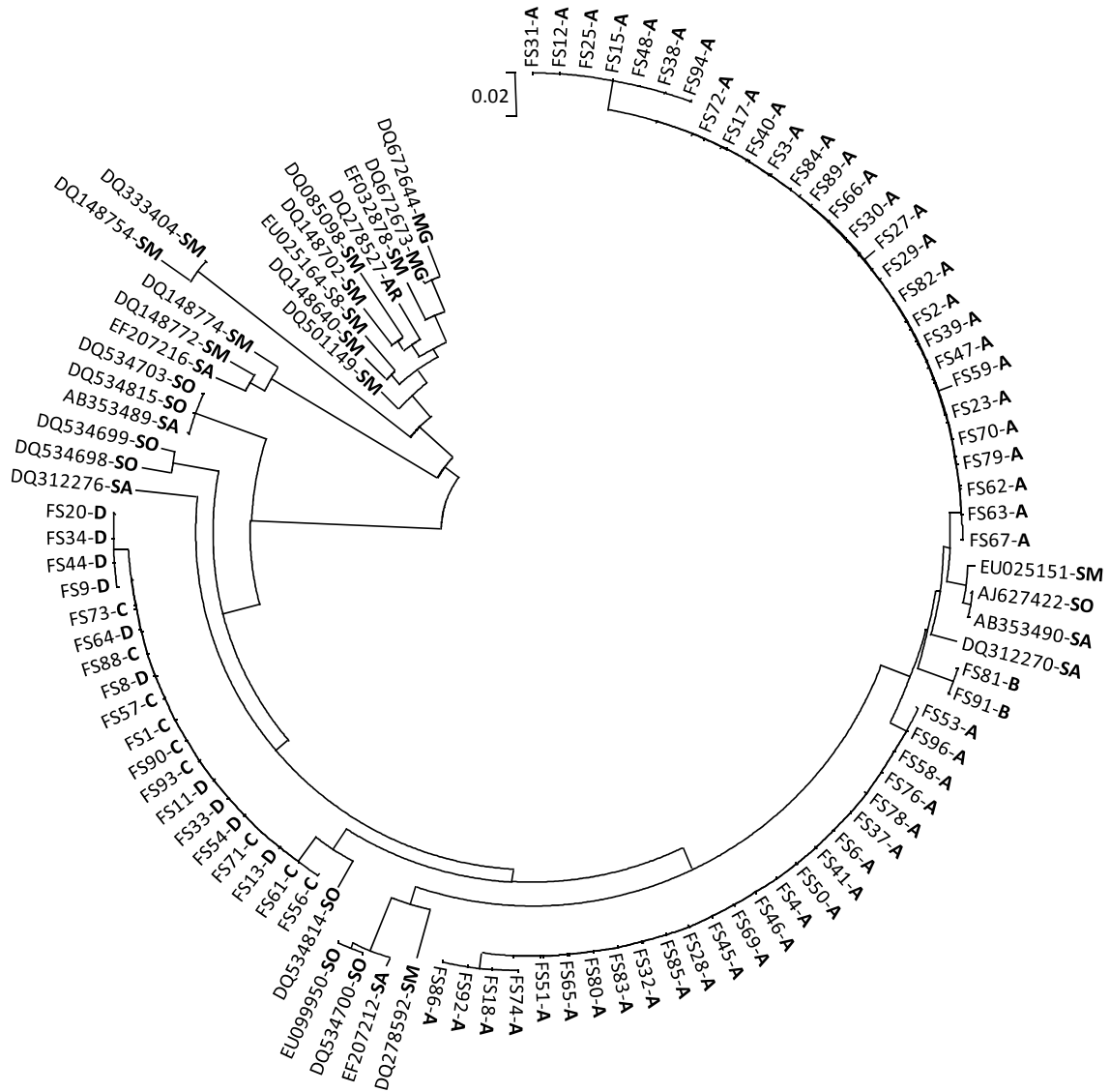


Figura 3.6 - Agrupamento filogenético gerado a partir do alinhamento múltiplo das seqüências referência e das 73 seqüências do gene *amoA* de *Archaea* obtidas dos clones válidos, e traduzidas *in silico* para proteína, pertencentes à biblioteca dos solos sob floresta secundária em estágio avançado de regeneração. As letras em caixa alta e negrito associadas à denominação dos clones indicam a UTO à qual pertencem, conforme definido pelo programa DOTUR com base em *cutoff* de 5% de dissimilaridade entre as seqüências. As abreviações (SA, SO, SM, MG e AR) remetem aos ambientes de procedência das seqüências referência (Solo Agrícola, Solo, Sedimento Marinho, Mina Geotérmica e Águas Residuais, respectivamente)

O agrupamento filogenético gerado a partir do alinhamento múltiplo de representantes das diferentes UTOs definidas pelo programa DOTUR ao nível de 5% de dissimilaridade, com base nas 310 seqüências obtidas a partir dos clones válidos, e nas seqüências referência, revelaram clara diferença na composição das comunidades de *Archaea* oxidadoras de amônia dos solos sob floresta primária em comparação aos demais solos e usos da terra analisados (Figura 3.7).

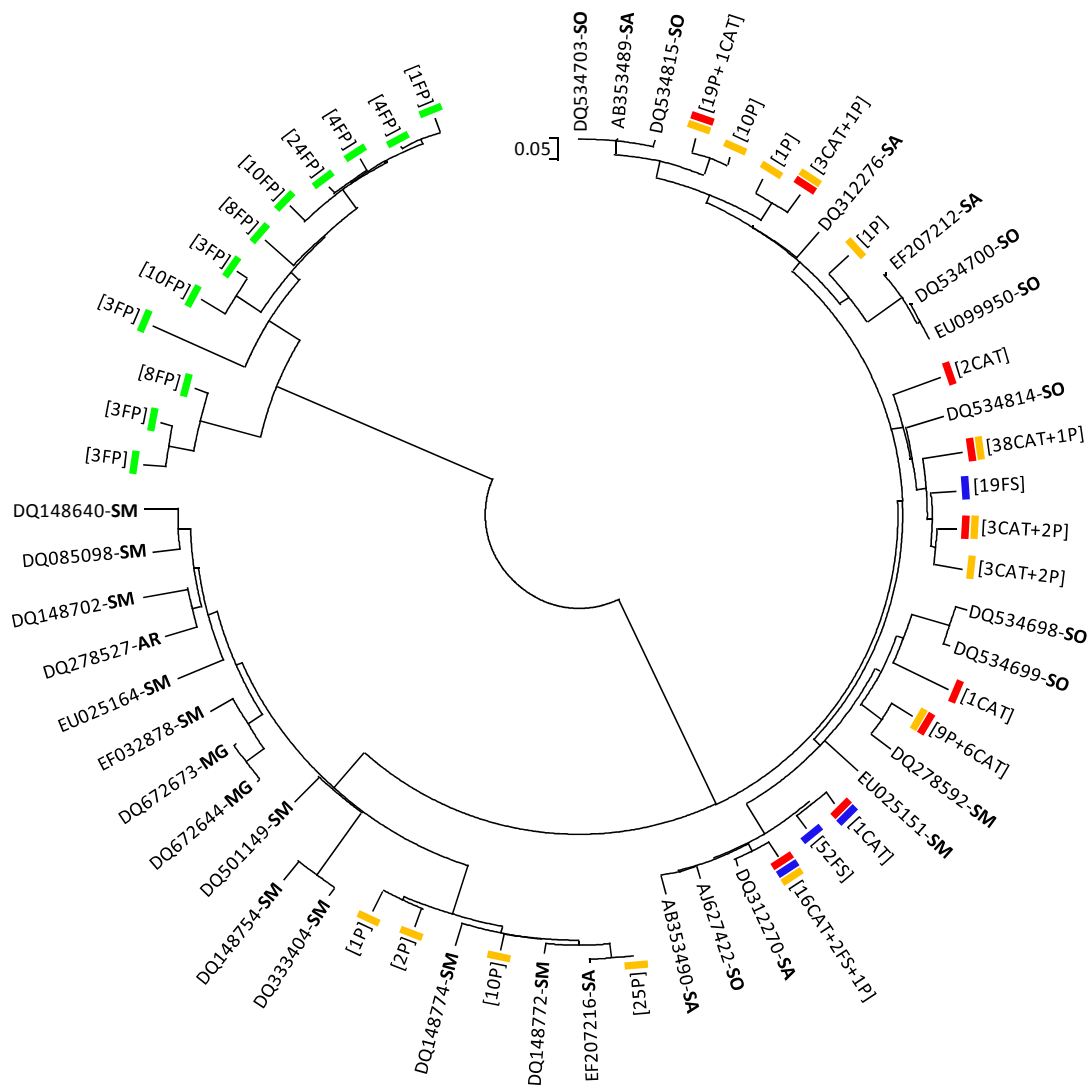


Figura 3.7 - Relações filogenéticas entre as seqüências do gene *amoA* de *Archaea* (retângulos) e seus solos de origem (cores). Os valores numéricos e abreviações entre colchetes indicam o número de clones em cada UTO (*cutoff* de 5% de dissimilaridade) e suas respectivas origens. As abreviações (SA, SO, SM, MG e AR) remetem aos ambientes de procedência das seqüências referência (Solo Agrícola, Solo, Sedimento Marinho, Mina Geotérmica e Águas Residuais, respectivamente) (ver Tabela C.1, ANEXO C). Agrupamento filogenético não enraizado. (■) Floresta Primária (FP), (■) Cultivo Agrícola Tradicional (CAT), (■) Pastagem (P) e (■) Floresta Secundária (FS)

As UTOs das bibliotecas dos solos sob cultivo agrícola tradicional, pastagem e floresta secundária em estágio avançado de regeneração formaram agrupamentos monofiléticos com sequências de AOA selecionadas do *GenBank* e originárias de solos sob diferentes usos e sedimento marinho. As sequências do gene *amoA* de *Archaea* dos solos sob floresta primária agruparam-se em um único clado. As análises de *bootstrap* (valores não apresentados nos agrupamentos) apoiaram a topologia representada (100% em *Neighbor-joining*) e confirmaram que as distâncias evolutivas foram suficientes para considerar o clado com as sequências obtidas dos solos sob floresta primária (Figura 3.7) como um grupo separado, distinto das demais sequências de AOA envolvidas na análise.

As sequências das bibliotecas dos solos sob floresta primária, cultivo agrícola tradicional, pastagem e floresta secundária, quando analisadas em agrupamentos filogenéticos separados (Figuras 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6), também mostraram relações evolutivas com as sequências referência selecionadas. Contudo, agrupamentos monofiléticos contendo apenas sequências obtidas neste estudo ocorreram notoriamente nas quatro filogenias representadas. De modo geral, clados contendo sequências referência e sequências do gene *amoA* de *Archaea* obtidas com este trabalho apresentaram valores de *bootstrap* inferiores a 50%. Valores de *bootstrap* superiores a 50% estiveram associados à clados monofiléticos contendo apenas sequências referência ou sequências obtidas dos clones válidos de cada biblioteca analisada.

3.2.3 Discussão

À medida que novos estudos são realizados com as comunidades de AOA presentes no solo, novas informações são apresentadas com relação à ubiquidade e diversidade de membros desse grupo funcional de micro-organismos. Neste estudo, um clado filogenético único foi mostrado para as sequências de AOA dos solos sob floresta primária tropical úmida da Amazônia onde é desconhecida a ocorrência de eventos de perturbação antrópica. Agrupamentos monofiléticos mostraram a associação de sequências do gene *amoA* de *Archaea* obtidas de solos sob diferentes usos subsequentes ao desmatamento da vegetação florestal primária, sugerindo que ações antrópicas associadas à implantação de pastagens, ao manejo agrícola tradicional e ao

abandono de áreas cultivadas, seguido da regeneração natural, podem influenciar a diversidade genética das populações de AOA nos solos estudados.

Nicol et al. (2008) relataram que a diversidade e abundância de AOA são influenciadas pelo pH do solo, e apontaram que a presença de diversos filotipos e a maior abundância de AOA em relação às *Bacteria* oxidadoras de amônia sugerem que a oxidação autotrófica de amônia em solos ácidos pode ser em grande parte atribuída às AOA. As Tabelas A.1 e A.2 (ANEXO A) apresentam os valores de pH dos solos estudados. Jesus et al. (2009) indicaram que o uso da terra é o principal fator responsável pelas mudanças nos atributos dos solos, inclusive do pH, ao estudar as mesmas áreas amostrais deste trabalho no município de Benjamin Constant.

Várias UTOs, mas não todas, pertencentes às bibliotecas do gene *amoA* de *Archaea* dos solos sob cultivo agrícola tradicional, pastagem e floresta secundária mostraram relação filogenética com sequências de AOA recuperadas de ambiente marinho e terrestre de diferentes regiões do globo, mostrando considerável sobreposição genômica (regiões de alta similaridade) no alinhamento. Alguns autores têm reportado que membros do Domínio *Archaea* presentes nos solos compartilham capacidade metabólica com AOA de uma variedade de ambientes terrestres e marinhos (SCHLEPER et al., 2005; HE et al., 2007; FRANCIS et al., 2005).

No entanto, das 11 UTOs definidas a partir de 81 sequências do gene *amoA* de *Archaea* dos solos sob floresta primária tropical, nenhuma delas apresentaram sequência pertencente aos clones obtidos dos solos sob cultivo agrícola tradicional, pastagem e floresta secundária, e nem evidenciaram relação filogenética com as sequências referência selecionadas. Como consequência, foi notado clado único para as sequências do gene *amoA* de *Archaea* dos solos sob floresta primária tropical ao relacioná-las filogeneticamente com as sequências obtidas para os solos sob os demais usos da terra e as sequências referência (Figura 3.7). Este posicionamento filogenético sugere que as sequências obtidas para os solos sob floresta primária tropical pertencem a um grupo de AOA de ambiente terrestre não descrito previamente, ainda que tenham apresentado alta similaridade com clones de AOA depositados por Dang et al. (2009) recuperados de sedimentos da margem continental do Oeste Pacífico (Tabela 3.2).

As medidas de diversidade revelaram maior riqueza e heterogeneidade para as comunidades de *Archaea* oxidadoras de amônia encontradas nos solos sob pastagem, seguido por

menor riqueza e diversidade deste grupo funcional nos solos sob floresta primária, cultivo agrícola tradicional e floresta secundária em estágio avançado de regeneração, consecutivamente (Figura 3.2 e Tabela 3.4). Esta constatação pode estar associada, dentre outros fatores, aos conteúdos de nitrogênio no solo.

Moraes et al. (2002) avaliaram o impacto do desmatamento e implantação de pastagens nos estoques de carbono e nitrogênio e na dinâmica da matéria orgânica do solo, em cronossequências com florestas e pastagens na região oeste da bacia amazônica brasileira e constataram que os conteúdos de carbono e nitrogênio aumentaram em pastagem com 20 anos de implantação. No Pará também foram encontradas relações claras entre os estoques de nitrogênio no solo e a idade das pastagens, mostrando que os estoques de nitrogênio no solo aumentam com a idade da pastagem (BUSCHBACHER et al., 1988). Na região deste estudo, as áreas com pastagem são consequências de políticas governamentais da década de 70, tendo sido implantadas com capim imperial (*Axonopus scoparius*) atualmente substituído por *Brachiaria brizantha*, *B. humidicola*, grama batatais (*Paspalum notatum flugge*) e espécies invasoras.

Ao atentar para os valores expressos pelas medidas de diversidade para as comunidades de AOA dos solos sob cultivo agrícola tradicional (Tabela 3.4), é importante tomar como consideração o conteúdo de nitrogênio geralmente detectado nos solos sob a prática agrícola de corte-e-queima, uma vez que tal prática é adotada pelas comunidades locais na área de estudo. Os resíduos resultantes da queima da palha retornam nitrogênio orgânico na forma de nitrato para o solo. No entanto, devido o fato de o nitrogênio não ser reciclado eficientemente em terras agrícolas, a colheita repetida leva a perdas de nitrogênio do ecossistema. Townsend et al. (2006) apontam vários motivos pelos quais os nitratos são lixiviados mais facilmente destas áreas quando comparado com áreas sob vegetação natural, destacando os períodos de pousio com pouca ou nenhuma vegetação. Hölscher et al. (1997) estimam que 97% dos estoques de nitrogênio no solo se perdem com a queima, cultivo e pousio. Essa exaustão do estoque de nitrogênio em solos cultivados pode auxiliar na compreensão da baixa riqueza e diversidade de AOA detectada nos solos sob cultivo agrícola tradicional nas áreas de estudo no município de Benjamin Constant.

No que se refere aos solos sob florestas em regeneração, Duynisveld et al. (1988) atentam para o fato da biomassa dessas áreas manter-se abaixo do seu máximo por muito anos. Para

Gehring (2003), a demanda da vegetação por nitrogênio aumenta rapidamente com o acúmulo de biomassa, diminuindo, assim, a disponibilidade de nitrogênio no solo. Dessa forma, a baixa riqueza de UTOs e a diversidade pouco expressiva de AOA em solos sob floresta secundária nas áreas de estudo podem estar relacionadas, dentre outros fatores, à baixa disponibilidade de nitrogênio no solo ocasionada pelo aumento da demanda por nitrogênio em estádios avançados da regeneração florestal. Muitos autores afirmam que áreas com vegetação primária mantêm-se num “estado de equilíbrio”, com baixas perdas e ganhos de nitrogênio (ODUM, 1969; VITOUSEK & REINERS, 1975; SNEDAKER, 1980; SPRENT, 1987; JORDAN, 1989).

Ainda que alguns estudos tenham sido realizados a fim de compreender a dinâmica do nitrogênio mediante a conversão do uso da terra na bacia amazônica, conforme referenciados nos parágrafos anteriores e até mesmo não relatados neste texto, a descoberta recente de guildas microbianas associadas ao ciclo do nitrogênio não permitiu, até o presente momento, investigações conjuntas dos aspectos biogeoquímicos e microbianos nas paisagens antropizadas da Amazônia. Os resultados apresentados neste estudo constituem o primeiro relato da implicação de diferentes usos da terra na composição de comunidades de *Archaea* envolvidas na oxidação de amônia presentes em solos da Amazônia. As medidas de diversidade calculadas com base em informações obtidas com a análise de sequências do gene *amoA* expressaram a estreita relação mantida pelo grupo microbiano estudado com as atividades antrópicas de cultivo agrícola, pastagem e floresta em regeneração, instigando novas pesquisas capazes de considerar a biogeoquímica conjuntamente aos objetivos contemplados por estudos como este relatado e apontando tal grupo como um sensível bioindicador da qualidade dos solos nas áreas de estudo.

4 CONCLUSÕES

Com base no delineamento amostral e nas técnicas de *fingerprinting* (DGGE e ARISA), bibliotecas de clones e estatísticas multivariadas, concluiu-se que o desmatamento de áreas com floresta primária tropical da Amazônia e uso subsequente com cultivo agrícola tradicional e pastagem na região do Alto Solimões é capaz de influenciar as estruturas de comunidades de *Archaea*, *Bacteria* e microfungos, e também a composição e diversidade de um grupo funcional de *Archaea* envolvido no processo de oxidação de amônia nos ambientes do solo.

Adicionalmente, este trabalho revelou que as comunidades de *Archaea* oxidadoras de amônia podem ser consideradas importantes bioindicadores do grau de perturbação antrópica na paisagem estudada, mostrando-se sensíveis à restauração dos ecossistemas amazônicos após desmatamento e uso da terra para fins agropecuários.

A fim de cumprir com a resiliência dos ecossistemas amazônicos no contexto de recomposição da paisagem na região do Alto Solimões, constatou-se que um longo período de abandono das áreas é necessário para superar o efeito antropogênico de desmatamento e uso da terra, com cultivo agrícola tradicional e pastagem, nas comunidades microbianas do solo, cujo tempo de restauração florestal não foi determinado neste estudo.

Quanto à adequação das técnicas moleculares utilizadas, a técnica de DGGE confirmou o seu valor na caracterização da dinâmica de populações microbianas em função de variações ambientais. A eletroforese capilar automatizada desenvolvida pela técnica de ARISA mostrou ser sensível na detecção de mudanças na organização das populações microbianas de solos tropicais da Amazônia.

Em síntese, as implicações do desmatamento e uso da terra com práticas agrícolas e pecuária nas comunidades microbianas do solo, mapeadas por sensoriamento remoto e avaliadas por técnicas moleculares e estatísticas multivariadas, juntamente com os atributos físicos e químicos dos solos, forneceram informações para o manejo sustentável dos ecossistemas amazônicos na paisagem estudada na região do Alto Solimões, Amazônia Ocidental.

Referências

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.L. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 215, p. 403-410, 1990.
- BEMAN, J.M.; FRANCIS, C.A. Diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the sediments of a hypernutrified subtropical estuary: Bahia del Tobari, Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 12, p. 7767-7777, 2006.
- BIERREGAARD JUNIOR, R.O.; LOVEJOY, T.E.; KAPOS, V.; DOS SANTOS, A.A.; HUTCHINGS, R.W. The biological dynamics of tropical rainforest fragments. **American Institute of Biological Sciences**, Washington, v. 42, p. 859-866, 1992.
- BINTRIM, S.B. ; DONOHUE T.J.; HANDELSMAN, J.; ROBERTS, G.P.; GOODMAN, R.M.; Molecular phylogeny of Archaea from soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 94, n.1, p. 277-282, 1997.
- BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 7, p. 1513-1522, 1979.
- BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E.W. Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 2647-2653, 1997.
- BUCKLEY, D.H.; GRABER, J.R.; SCHMIDT, T.M. Phylogenetic analysis of nonthermophilic members of the kingdom crenarchaeota and their diversity and abundance in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 11, p. 4333-4339, 1998.
- BUSCHBACHER, R.; UHL, C.; SEMITO, A.S. Abandoned pastures in eastern Amazonia. II. Nutrient stocks in the soil and vegetation. **Journal Ecology**, Oxford, v. 76, p. 682-699, 1988.
- CHABAN, B., NG S.Y.M.; JARRELL, K.F. Archaeal habitats – from the extreme to the ordinary. **Canadian Journal of Microbiology**, Ontario, v. 52, p. 73-116, 2006.
- DANG, H.; LI, J.; ZHANG, X.; LI, T.; TIAN, F.; JIN, W. Diversity and spatial distribution of *amoA*-encoding archaea in the deep-sea sediments of the tropical West Pacific Continental Margin. **Journal Applied Microbiology**, Bedford, v. 106, n. 5, p. 1482-1493, 2009.
- DIDHAM, R.K. An overview of invertebrate responses to habitat fragmentation. In: WATT, A.; STORK, N.E.; HUNTER, M. (Ed.). **Forests and insects**. London: Chapman and Hall, 1997. p. 201-218.
- DUYNISVELD, W.H.M.; STREBEL, O.; BOTTCHEER, J. Are nitrate leaching from arable and nitrate pollution of groundwater avoidable? **Ecological Bulletins**, Lund, v. 39, p. 116-125, 1988.

- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II errorprobabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 186-194, 1998.
- EWING, B.; HIJJER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 175-185, 1998.
- FELSENSTEIN, J. PHYLIP—Phylogeny Inference Package (Version 3.65). **Cladistics**, New York, v. 5, p. 164-166, 1989.
- FIERER, N.; BREITBART, M.; NULTON, J.; SALAMON, P.; LOZUPONE, C.; JONES, R.; ROBESON, M.; EDWARDS, R.A.; FELTS, B.; RAYHAWK, S.; KNIGHT, R.; ROHWER, F.; JACKSON, R.B. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 7059-7066, 2007.
- FRANCIS, C.A.; ROBERTS, K.J.; BEMAN, J.M.; SANTORO, A.E.; OAKLEY, B.B. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 102, p. 14683-14688, 2005.
- FRIEDRICH, M. W., SCHMITT-WAGNER, D.; LUEDERS, T.; BRUNE, A. Axial differences in community structure of Crenarchaeota and Euryarchaeota in the highly compartmentalized gut of the soil-feeding termite *Cubitermes orthognathus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 10, p.4880-4890, 2001.
- GEHRING C. **O papel da fixação biológica de nitrogênio em floresta secundária e primária da Amazônia Central**. Tese (Doutorado em Ecologia) – Faculdade de Agronomia Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn, Bonn , 2003.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a geographical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 195-202, 1998.
- HE, J.Z.; SHEN, J.P.; ZHANG, L.M.; ZHU, Y.G.; ZHENG, Y.M.; XU, M.G.; DI, H. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 9, p. 2364-2374, 2007.
- HERNDL, G.J.; REINTHALER T.; TEIRA, E.; VAN AKEN, H.; VETH, C.; PERNTHALER, A.; PERNTHALER, J. Contribution of Archaea to total prokaryotic production in the deep Atlantic Ocean. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 5, p.2303-2309, 2005.
- HÖLSCHER, D.; MOELLER, R.F.; DENICH, M.; FÖLSTER, H. Nutrient input-output budget of shifting agriculture in eastern Amazonia. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Netherlands, v. 47, p. 49-57, 1997.

JESUS, E.C.; MARSH, T.L.; TIEDJE, J.M.; MOREIRA, F.M.S. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **International Society for Microbial Ecology Journal**, on-line, 2009.

JETTEN, M.S.M. The microbial nitrogen cycle. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 10, p. 2903-2909, 2008.

JORDAN, C.F. **An Amazonian rain forest - the structure and function of a nutrient stressed ecosystem and the impact of slash-and-burn agriculture**. Park Ridge, NJ: UNESCO, MAB Series, 1989.

JUKES, T.H.; CANTOR, C.R. Evolution of protein molecules. In: MUNRO, H.H. (Ed.). **Mammalian protein metabolism**. New York: Academic Press, 1969. p.21-132.

JURGENS, G., LINDSTRÖM K.; SAANO, A. Novel group within the kingdom *Crenarchaeota* from boreal forest soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 2, p. 803-805, 1997.

JURGENS, G.; GLÖCKNER, F.; AMANN, R.; SAANO, A.; MONTONEN, L.; LIKOLAMMI, M.; MUNSTER, U. Identification of novel *Archaea* in bacterioplankton of a boreal forest lake by phylogenetic analysis and fluorescent in situ hybridization. **FEMS Microbial Ecology**, Amsterdam, v. 34, n. 1, p. 45-56, 2000.

KÖNNEKE, M.; BERNHARD, A.E.; DE LA TORRE, J.R.; WALKER, C.B.; WATERBURY, J.B.; STAHL, D.A.; Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. **Nature**, London, v. 437, n. 7058, p. 543-546, 2005.

KUYPERS, M.B.P.; ERBACHER, J.; KINKEL, H.; PANCOST, R.D.; SCHOUTEN, S.; SINNINGHE DAMSTE, J.S. Massive expansion of marine archaea during a mid-Cretaceous oceanic anoxic event. **Science**, Washington, v. 293, n. 5527, p. 92-95, 2001.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS D.G. ClustalW2 and ClustalX version 2. **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.

LAURANCE, W.F.; VASCONCELOS, H.L.; LOVEJOY, T.E. Forest loss and fragmentation in the Amazon: implications for wildlife conservation. **Oryx**, Cambridge, v. 34, n. 1, p. 39-45, 2000.

LAURANCE, W.F.; BIERREGAARD JUNIOR, R.O. **Tropical Forest Remnants: Ecology, Management and Conservation of Fragmented Communities**. Chicago: University of Chicago Press, 1997.

LEININGER, S., URICH, T.; SCHLOTTER, M.; SCHWARK, L.; QI, J.; NICOL, G.W.; PROSSER, J.I.; SCHUSTER, S.C.; SCHLEPER, C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. **Nature**, London, v. 442, n. 7104, p. 806-809, 2006.

LOVEJOY, T.E., BIERREGAARD, R.O. JR., RYLANDS, A.B., MALCOLM, J.R., QUINTELA, C.E., HARPER, L.H. Edge and other effects of isolation on Amazon forest fragments. In: SOULE, M.E. (Ed.). **Conservation biology: the science of scarcity and diversity**. underland, MA: Sinauer, 1986. p. 257-285.

MORAES, J.F.L.; NEILL, C.; VOLKOFF, B.; CERRI, C.C.; MELILLO, J.; LIMA, V.C.; STEUDLER, P.A. Soil carbon and nitrogen stocks following forest conversion to pasture in the Western Brazilian Amazon Basin. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 5, p. 1369-1376, 2002.

NICOL, G.W.; L.A. GLOVER, PROSSER, J.I. The impact of grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 152-162, 2003.

NICOL, G.W.; SCHLEPER, C. Ammonia-oxidising *Crenarchaeota*: important players in the nitrogen cycle? **Trends in Microbiology**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 207-212, 2006.

NICOL, G.W.; LEININGER, S.; SCHLEPER, C.; PROSSER, J. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 10, n. 11, p. 2966-2978, 2008.

ODUM E.P. The strategy of ecosystem development. **Science**, Washington, v. 164, p. 262-270, 1969.

PARK, H.D.; WELLS, G.F.; BAE, H.; CRIDDLE, C.S.; FRANCIS, C.A. Occurrence of Ammonia-Oxidizing *Archaea* in Wastewater Treatment Plant Bioreactors. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 8, p. 5643-5647, 2006.

PEARSON, A.; MCNICHOL, A.P.; BENITEZ-NELSON, B.C.; HAYES, J.M.; EGLINTON, T.I. Origins of lipid biomarkers in Santa Monica Basin surface sediment: a case study using compound-specific $\Delta^{14}\text{C}$ analysis. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, London, v. 65, n. 18, p. 3123-3137, 2001.

PRESTON, C.M.; WU, K.Y.; MOLINSKI, T.F.; DeLONG, E.F. A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 93, n. 13, p. 6241-6246, 1996.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 4, p. 406-425, 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. Cold Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 999 p.

SCHLEPER, C.; HOLBEN, W.; KLENK, H.P. Recovery of crenarchaeotal ribosomal DNA sequences from freshwater-lake sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 1, p. 321-323, 1997.

SCHLEPER, C.; JURGENS, G.; JONUSCHEIT, M. Genomic studies of uncultivated archaea. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 6, p. 479-488, 2005.

SCHLOSS, P.D.; LARGET, B.R.; HANDELSMAN, J. Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 9, p. 5485-5492, 2004.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

SINGLETON, D.R.F.; RATHBUN, S.L.; WHITMAN, W.B. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 9, p. 4374-4376, 2001.

SNEDAKER, S.C. Successional immobilization of nutrients and biologically mediated recycling in tropical forests. **Biotropica**, Washington, v. 12, p. 16-22, 1980.

SPRENT, J.I. **The ecology of the nitrogen cycle**. Cambridge: Cambridge University Press, 1987.

STROUS, M.; JETTEN, M.S. Anaerobic oxidation of methane and ammonium. **Annual Review Microbiology**, El Camino Way, v. 58, p. 99-117, 2004.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TOWNSEND, C.R.; BEGON, M.; HARPER, J.L. **Fundamentos em ecologia**. Tradução Gilson Rudinei Pires Moreira 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 592 p.

TREUSCH, A.H.; LEININGER, S.; KLETZIN, A.; SCHUSTER, S.C.; KLENK, H.P.; SCHLEPER, C. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 12, p. 1985-1995, 2005.

VAN DER MAAREL, M.J.; ARTZ, R.R.; HAANSTA, R.; FORNEY, L.J. Association of marine archaea with the digestive tracts of two marine fish species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 8, p. 2894-2498, 1998.

VENTER, J.C.; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J.F.; HALPERN, A.L.; RUSCH, D.; EISEN, J.A.; WU, D.; PAULSEN, I.; NELSON, K.E.; NELSON, W. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. **Science**, Washington, v. 304, n. 5667, p. 66-74, 2004.

VETRIANI, C.; JANNASCH, H.W.; MACGREGOR, B.J.; STAHL, D.A.; REYESENBACH, A.L. Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic Archaea in deep-sea sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 10, p. 4375-4384, 1999.

VITOUSEK, P.M.; REINERS, W.A. Ecosystem succession and nutrient retention: a hypothesis. **American Institute of Biological Sciences**, Washington, v. 25, n. 6, p. 376-381, 1975.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. Wisconsin-Madison, v. 51, p. 221-227, 1987.

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms. Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eukarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 87, p. 4576-4579, 1990.

WUCHTER, C.; ABBAS, B.; COOLEN, M.J.L.; HERFORT, L.; VAN BLEIJSWIJK, J.; TIMMERS, P.; STROUS, M.; TEIRA, E.; HERNDL, G.J.; MIDDELBURG, J.J.; SCHOUTEN, S.; DAMSTÉ, J.S.S. Archaeal nitrification in the ocean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 103, n. 33, p. 12317-12322, 2006.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela A.1 - Resultado das análises químicas e físicas das amostras de solos coletadas na campanha de 2008 sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental

	Floresta Primária			Floresta Secundária			Cultivo Agrícola Tradicional			Pastagem		
	04	10	16	60	70 ₁	77	19	23	37	84	92	93
Ptos. amostrais (CSM-BGBD) →												
pH (CaCl ₂)	3,7	3,8	4,5	5	4,7	3,7	5,5	3,9	5,1	4	3,9	3,9
MO (g.dm ⁻³)	22	19	46	25	58	21	55	24	39	21	38	23
P (mg.dm ⁻³)	6	4	19	6	13	5	11	5	12	5	8	5
K⁺ (mg.dm ⁻³)	1,8	0,9	1,6	2,1	1,7	1,2	2,9	1,4	1,4	4,8	1,1	0,5
Ca⁺² (mmolc.dm ⁻³)	9	6	40	63	89	16	83	21	63	7	9	5
Mg⁺² (mmolc.dm ⁻³)	4	2	12	10	15	2	17	5	20	4	5	1
H+Al (mmolc.dm ⁻³)	228	166	52	25	64	281	25	228	31	98	166	121
SB (mmolc.dm ⁻³)	14,8	8,9	53,6	75,1	105,7	19,2	102,9	27,4	84,4	15,8	15,1	6,5
CTC (mmolc.dm ⁻³)	242,8	174,9	104,6	100,1	169,7	300,2	127,9	255,4	115,4	113,8	181,1	127,5
V (%)	6	5	51	75	62	6	80	11	73	14	8	5
Fe (mg.dm ⁻³)	32	185	262	106	141	81	125	15	25	56	81	62
Mn (mg.dm ⁻³)	4,5	0,7	1,3	0,8	2,6	1	2,7	1,1	3,1	2,2	3,8	1,6
Zn (mg.dm ⁻³)	1,8	0,5	1	0,4	1,6	0,2	0,5	0,7	1,8	0,7	0,7	0,2
Argila (<0,002mm)	358	222	351	239	491	337	288	239	245	204	325	234
Silte (0,053-0,002mm)	502	538	509	421	419	533	452	591	565	346	485	266
Areia Total	140	240	140	340	90	130	260	170	190	450	190	500
Areia Grossa (2,00-0,21mm)	10	10	10	10	20	10	10	40	30	10	10	0
Areia Fina (0,21-0,053mm)	130	230	130	330	70	120	250	130	160	440	180	500

(--) Resultado < 0,1; Cu, Fe, Mn, Zn (DTPA – TEA; pH 7,3; B = BaCl₂.2H₂O 0,125% microondas (10mL TFSA/20mL BaCl₂ 0,125%).

Tabela A.2 - Resultado das análises químicas e físicas das amostras de solos coletadas na campanha de 2009 sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental

	Floresta Primária			Floresta Secundária			Cultivo Agrícola Tradicional			Pastagem		
	04	10	16	60	701	77	19	23	37	84	92	93
Ptos. amostrais (CSM-BGBD) →												
pH (CaCl ₂)	4,2	3,8	4,2	3,9	4,3	3,7	4,4	3,8	4,9	3,9	3,8	3,8
MO (g.dm ⁻³)	43	27	27	33	24	22	22	15	40	28	42	24
P (mg.dm ⁻³)	15	11	7	7	6	5	8	4	16	5	12	3
K⁺ (mg.dm ⁻³)	1,4	1,2	1,2	1,2	1,7	0,8	4,1	0,7	1,4	1,6	2,5	0,7
Ca⁺² (mmolc.dm ⁻³)	42	14	73	46	45	15	35	10	130	12	14	7
Mg⁺² (mmolc.dm ⁻³)	10	5	7	10	13	4	10	2	45	6	13	2
H+Al (mmolc.dm ⁻³)	98	135	80	98	47	135	52	80	42	98	150	109
SB (mmolc.dm ⁻³)	53,4	20,2	81,2	57,2	59,7	19,8	49,1	12,7	176,4	19,6	29,5	9,7
CTC (mmolc.dm ⁻³)	151,4	155,2	161,2	155,2	106,7	154,8	101,1	92,7	218,4	117,6	179,5	118,7
V (%)	35	13	50	37	56	13	49	14	81	17	16	8
Fe (mg.dm ⁻³)	86	102	91	87	50	72	60	87	77	111	218	113
Mn (mg.dm ⁻³)	46,4	35	10,8	45,8	35,2	41,2	87,6	15	75	23,6	49	7,3
Zn (mg.dm ⁻³)	1,6	1,4	0,6	5,4	4,1	1,3	1,4	1,8	1,8	1,5	2,5	0,8
Argila (<0,002mm)	421	320	311	372	484	230	198	164	308	218	378	225
Silte (0,053-0,002mm)	459	461	519	428	406	470	532	126	582	402	512	225
Areia Total	120	219	170	200	110	300	270	710	110	380	110	550
Areia Grossa (2,00-0,21mm)	0	10	30	10	10	10	20	20	0	0	20	0
Areia Fina (0,21-0,053mm)	120	209	140	190	100	290	250	690	110	380	90	550

(--) Resultado < 0,1; Cu, Fe, Mn, Zn (DTPA – TEA; pH 7,3; B = BaCl₂.2H₂O 0,125% microondas (10mL TFSA/20mL BaCl₂ 0,125%).

ANEXO B

Tabela B.1 – Resultado da análise comparativa das sequências dos amplicons excisados dos géis de DGGE de *Bacteria* com sequências depositadas no banco de dados do *Ribosomal Database Project* (RDP II) pelo programa *Classifier*

Banda	SUT/ano	Total de clones ^a	Classificação <i>Ribosomal Database Project</i> ^b	Nº de clones ^c
1	FP/2008	10	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae</i>	8
			<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae</i>	2
2	CAT/2008	8	<i>Unclassified Bacteria</i>	8
3	FP/2009	8	<i>Bacteria; Firmicutes; "Bacilli"; "Lactobacillales"; "Carnobacteriaceae"</i>	6
			<i>Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae</i>	1
			<i>Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae</i>	1
4	P/2009	10	<i>Bacteria; Firmicutes; "Bacilli"; "Lactobacillales"; "Carnobacteriaceae"</i>	6
			<i>Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae</i>	4
5	FP/2008	7	<i>Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae</i>	5
			<i>Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae</i>	2
6	FP/2008	12	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae</i>	7
			<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae</i>	3
7	FP/2008	9	<i>Bacteria; Firmicutes; "Bacilli"; Bacillales; Bacillaceae</i>	9
8	FP/2009	8	<i>Bacteria; Firmicutes; "Bacilli"; "Lactobacillales"; Carnobacteriaceae"</i>	5
			<i>Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae</i>	2
			<i>Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae</i>	1
9	FS/2008	17	<i>Bacteria; Firmicutes; "Bacilli"; "Lactobacillales"; Carnobacteriaceae"</i>	12
			<i>Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae</i>	3
			<i>Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae</i>	2
10	FS/2009	11	<i>Bacteria; Firmicutes; "Bacilli"; "Lactobacillales"; Carnobacteriaceae"</i>	8
			<i>Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae</i>	2
			<i>Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae</i>	1

^a número total de clones obtido para cada banda excisada do gel de DGGE.

^b identidade >96% em todos os níveis taxonômicos apresentados.

^c número de clones com sequências igualmente classificadas pelo RDP.

Tabela B.1 – Resultado da análise comparativa das sequências dos amplicons excisados dos géis de DGGE de *Archaea* com sequências depositadas no banco de dados do *Greengenes*

Banda	SUT/ano	Total de clones ^a	Classificação <i>Greengenes</i>	Nº de clones ^b
1	CAT/2008	10	<i>Archaea; Crenarchaeota; Candidatus Nitrososphaera</i>	10
2	FP/2008	8	<i>Archaea; Crenarchaeota; Thermoprotei; Caldisphaerales; Caldisphaeraceae; Caldisphaera</i>	8
3	CAT/2009	7	<i>Archaea; Crenarchaeota; Thermoprotei; Caldisphaerales; Caldisphaeraceae; Caldisphaera</i>	7
4	FP/2008	9	<i>Archaea; Euryarchaeota; Thermoplasmata; Thermoplasmatales; Unclassified</i>	9
5	P/2008	10	<i>Archaea; Crenarchaeota; Candidatus Nitrososphaera</i>	10
6	FP/2009	10	<i>Archaea; Crenarchaeota; Thermoprotei; Caldisphaerales; Caldisphaeraceae; Caldisphaera</i>	10
7	P/2009	9	<i>Archaea; Crenarchaeota; Thermoprotei; Caldisphaerales; Caldisphaeraceae; Caldisphaera</i>	9
8	P/2008	9	<i>Archaea; Crenarchaeota; Thermoprotei; Caldisphaerales; Caldisphaeraceae; Caldisphaera</i>	9
9	FS/2009	8	<i>Archaea; Crenarchaeota; Thermoprotei; Caldisphaerales; Caldisphaeraceae; Caldisphaera</i>	8
10	FS/2008	10	<i>Archaea; Euryarchaeota; Thermoplasmata; Thermoplasmatales; Ferroplasmaceae; Ferroplasma</i>	10

^a número total de clones obtido para cada banda excisada do gel de DGGE.

^b número de clones com sequências igualmente classificadas pelo *Greengenes*.

ANEXO C

Tabela C.1 - Informações disponíveis no *GenBank* do NCBI sobre as sequências referência do gene *amoA* de *Archaea* utilizadas nos agrupamentos filogenéticos

Nº Acesso	Organismo	Ambiente
DQ312276	<i>Uncultured crenarchaeote clone JR128c15 putative ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene</i>	solo agrícola
EF207212	<i>Uncultured crenarchaeote clone QY-A36 ammonia monoxygenase (amoA)gene</i>	solo agrícola
DQ312270	<i>Uncultured crenarchaeote clone JR128c6 putative ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene</i>	solo agrícola
AB353490	<i>Uncultured crenarchaeote amoA gene for ammonia monoxygenase subunit A, clone: DGGE_AOA_1</i>	solo agrícola
AB353489	<i>Uncultured crenarchaeote amoA gene for ammonia monoxygenase subunit A, clone: UAS_4050_C.17_1</i>	solo agrícola
EF207216	<i>Uncultured crenarchaeote clone QY-A40 ammonia monoxygenase (amoA) gene</i>	solo agrícola
DQ534698	<i>Uncultured crenarchaeote clone Alpine2 putative ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene</i>	solo
DQ534699	<i>Uncultured crenarchaeote clone Alpine3 putative ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene</i>	solo
DQ534700	<i>Uncultured crenarchaeote clone Alpine4 putative ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene</i>	solo
AJ627422	<i>Uncultured crenarchaeote genomic fragment 54d9</i>	solo
DQ534703	<i>Uncultured crenarchaeote clone Grass2 putative ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene</i>	solo
DQ534815	<i>Uncultured crenarchaeote clone KRO1 ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene</i>	solo
DQ534814	<i>Uncultured crenarchaeote clone RUD20 ammonia monoxygenase subunit A (amoA) mRNA</i>	solo
EU099950	<i>Uncultured crenarchaeote clone A32 ammonia monoxygenase subunit A(amoA) gene</i>	solo
DQ333404	<i>Uncultured crenarchaeote isolate PCR-amplicon HF4000_G2 putative ammonia monoxygenase subunit A gene</i>	sedimento marinho
DQ148754	<i>Uncultured crenarchaeote clone ETNP_11 putative ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene</i>	sedimento marinho
DQ278592	<i>Uncultured crenarchaeote clone SouthBay-CR-25 putative ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene</i>	sedimento marinho
EU025151	<i>Uncultured crenarchaeote clone S7-A-12 putative ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene</i>	sedimento marinho
DQ148774	<i>Uncultured crenarchaeote clone ES_HI_5 putative ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene</i>	sedimento marinho
DQ148772	<i>Uncultured crenarchaeote clone ES_HI_3 putative ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene</i>	sedimento marinho
DQ148702	<i>Uncultured crenarchaeote clone BS15.8_3 putative ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene</i>	sedimento marinho
EF032878	<i>Uncultured crenarchaeote clone Nevada_EV_32 ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene</i>	sedimento marinho
DQ085098	<i>Candidatus Nitrosopumilus maritimus putative archaeal ammonia monoxygenase subunit A gene</i>	sedimento marinho
EU025164	<i>Uncultured crenarchaeote clone S8-A-11 putative ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene</i>	sedimento marinho
DQ148640	<i>Uncultured crenarchaeote clone SF_NB1_8 putative ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene</i>	sedimento marinho
DQ501149	<i>Uncultured crenarchaeote clone MX_2_OCT_4 putative ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene</i>	sedimento marinho
DQ278527	<i>Uncultured crenarchaeote clone DI-20 putative ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene</i>	águas residuais
DQ672644	<i>Uncultured crenarchaeote clone A11 ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene</i>	mina geotérmica
DQ672673	<i>Uncultured crenarchaeote clone D06 ammonia monoxygenase subunit A (amoA) gene</i>	mina geotérmica