

Universidade de São Paulo
Centro de Energia Nuclear na Agricultura

**Diversidade funcional em solos de Terra Preta de Índio da Amazônia e
carvão pirogênico**

Mariana Gomes Germano Silva

Piracicaba
2011

Mariana Gomes Germano Silva

**Diversidade funcional em solos de Terra Preta de Índio da Amazônia e carvão
pirogênico**

**Tese apresentada ao Centro de Energia
Nuclear na Agricultura, Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Doutor em
Ciências.**

**Área de Concentração: Biologia na
Agricultura e no Ambiente**

Orientadora: Profa. Dra. Siu Mui Tsai

**Piracicaba
2011**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Silva, Mariana Gomes Germano

Diversidade funcional em solos de Terra Preta de Índio da Amazônia e carvão pirogênico / Mariana Gomes Germano Silva; orientadora Siu Mui Tsai. - - Piracicaba, 2011.

187 p.: il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Bacteria 2. Biologia molecular 3. Ecologia microbiana 4. Solos I. Título

CDU 579.26:631.461

*Para Julio,
pelo amor que é partilha,
pela festa e pela luz
que iluminam a minha vida*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À querida Dra. Siu Mui Tsai, minha orientadora e amiga, pessoa especial que gentilmente me permitiu conviver e compartilhar com ela incríveis cinco anos. Por acreditar que daria tudo certo..

À FAPESP-Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de estudos para a realização deste trabalho (Processo n. 2006/59344-7).

À Adriana Martineli e a Pós-graduação do Cena, Neuda, Sonia, Claudia e Alzira, por toda a ajuda durante o doutorado, pela paciência e compreensão.

À Marília Henyei, pela imensa ajuda com referências e normas, pela bondade de colocar tudo no lugar certo.

À Dra. Vivian H. Pellizari, pela ajuda infinita na realização deste trabalho e pela gentileza sempre.

Aos Drs. James M. Tiedje e John F. Quensen, à Dra. Qiong Wang e especialmente à Dra. Shoko Iwai, da Michigan State University (MSU-EUA), por toda a ajuda e suporte na realização do pirosequenciamento. *Cheers!*

Às minhas queridas amigas do começo, Cami e Jeane, que me acolheram e me ensinaram ‘o início de tudo’ com tanto carinho. Aos outros ‘do começo’, Ju Martinati, Gladys, Lu Ferreira, Samanta, Othon, Medau, André, Mateus, Marquinho, pelas boas risadas.

Ao querido amigo Ézio Nalin, pela ‘consultoria para assuntos especiais de informática’ e pela parceria em tantos trabalhos. Pela companhia nas *happy hours!*

À Ludi, por tudo, por resolver tantos problemas, pelas gargalhadas, pela alegria sempre.

Às minhas amigas, parceiras, Fabica, Amandita e Maju.. vocês moram no meu coração. Obrigado por tanta ajuda, pelas discussões, por me permitirem ensinar e principalmente *aprender*. Adoro vocês.

Aos queridos Acaciolino e Lucas, meus amigos mais sabidos, mais esforçados, mais desprendidos. Obrigado por compartilharem dúvidas e conhecimento comigo, por me ensinarem tanto. Mil ‘obrigados’ seriam pouco..

À ‘tchurma do feijão’, Enéas, Gustavo, Milena, Aline e Ana Be (*querida amiga!*), vocês são tudo de bom. Depois de vocês, ‘The Big Bang Theory’ nunca mais será o mesmo pra mim. À Dani Caldas, pelas longas conversas, pelas aulas incríveis, pelas boas risadas.

Ao pessoal ‘lá de baixo’, Elias, Wagnão, Lina, Aline, Caio, Bibi Furlan (*obrigada por tudo amore!*), Fe Nakamura, Clóvis, Naíssa, Lilian, Ademir, Rodrigo Taketani (*obrigada por tantas dicas, por novas ideias*), Jane, Fe Campana, Bia Ferrari, Marcela, Monita e tantos outros.. obrigada pelos bons momentos, pela alegria compartilhada.

Aos queridos técnicos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Fábio Duarte e Chico, pela ajuda sempre, pela disposição, pela amizade. Chiquinho, seu café é inesquecível! *Força amigo..*

À Leticia, por dividir sua casa comigo.

Em especial à minha família, meus pais Alfredo e Celina, e minha irmã Dani, pelo amor que é lição, pelo amor que é herança. À querida D. Julia, pelo carinho sempre.

Em especial ao meu querido Ju, por estar sempre ao meu lado e pelo bom humor todos os dias.

*QUEM ME DERA que eu fosse o pó da estrada
E que os pés dos pobres me estivessem pisando...*

*Quem me dera que eu fosse os rios que correm
E que lavadeiras estivessem à minha beira...*

*Quem me dera que eu fosse os choupos à margem do rio
E tivesse só o céu por cima e a água por baixo...*

*Quem me dera que eu fosse o burro do moleiro
E que ele me batesse e me estimasse...*

*Antes isso que ser o que atravessa a vida
Olhando para trás de si e tendo pena...*

(Fernando Pessoa)

RESUMO

SILVA, M. G. G. Diversidade funcional em solos de Terra Preta de Índio da Amazônia e carvão pirogênico. 2011. 187 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Solos com horizonte superficial antrópico, conhecidos como Terra Preta Antropogênica (TPA), Terra Preta de Índio (TPI) ou simplesmente Terra Preta, representam um dos mais marcantes registros da antiga ocupação humana na região amazônica, sendo comumente localizados ao longo de rios e interflúvios, ocupando várzeas, elevações marginais adjacentes e terra firme. Um dos principais fatores responsáveis pelo comportamento diferenciado dos solos TPI é a maior quantidade e a diferença qualitativa da sua matéria orgânica, que consiste em, aproximadamente, 35% de carvão pirogênico. A presença de material orgânico estável e a atividade biológica indicam que as TPI podem ser sítios de alta diversidade microbiana. O manejo da matéria orgânica visando à conservação e melhoria da qualidade do solo é fundamental na ciclagem de nutrientes e na manutenção da sustentabilidade dos agroecossistemas tropicais. Nesse contexto, os processos de biodegradação regem grande parte do ciclo do carbono, cuja fração biológica é dependente de enzimas microbianas como as dioxigenases, que utilizam compostos orgânicos presentes no solo como fonte de carbono e energia. A caracterização e o isolamento de bactérias potencialmente degradadoras de resíduos orgânicos em solos TPI pode gerar dados indicativos da qualidade biológica desse solo, além de prover informações sobre a diversidade genética destes micro-organismos. Da mesma forma, o estudo da diversidade de genes catabólicos pode facilitar a compreensão das bases adaptativas de micro-organismos funcionais do carvão pirogênico e seu papel no equilíbrio da fertilidade das TPI, além de determinar sua influência nas comunidades biológicas destes solos. Este estudo analisou a diversidade de comunidades bacterianas associadas a processos de degradação de compostos aromáticos em amostras de solo TPI e carvão pirogênico na Amazônia Central, coletadas nos sítios do Caldeirão sob capoeira e sob cultivo agrícola, Costa do Açutuba, Hatahara e Balbina, por meio de técnicas de cultivo e técnicas moleculares. Estes sítios são caracterizados por diferentes épocas de ocupação pelas populações indígenas, que variam desde 1200 anos atrás (Caldeirão) até mais de 2000 anos, como o Costa do Açutuba. Os isolados obtidos a partir do enriquecimento apresentaram grande diversidade de gêneros e espécies, extensamente descritas como degradadores de vários substratos aromáticos, tanto naturais quanto xenobióticos. As bibliotecas de clones contendo genes funcionais mostraram que a

diversidade microbiana no carvão pirogênico foi frequentemente maior em relação aos solos TPI. A grande maioria dos *clusters* gerados no pirosequenciamento (98%) reuniu sequências de dioxigenases obtidas unicamente neste estudo. A abundância de genes catabólicos foi determinada por PCR quantitativo. Os resultados deste estudo apresentaram uma diversidade de genes associados à ciclagem de C ainda não descrita em solos antrópicos da Amazônia, demonstrando o papel fundamental das comunidades microbianas funcionais na manutenção da fertilidade dos solos TPI.

Palavras-chave: *Bacteria*, Biologia molecular, Ecologia microbiana, Solo

ABSTRACT

SILVA, M. G. G. Functional diversity in Amazonian Dark Earth soils and black carbon. 2011. 187 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Antropogenic Dark Earth or Amazonian Dark Earth soils (ADE) represents one of the most important records of pre-Colombian settlements in Brazilian Amazon region, commonly located along rivers and interfluves. One of the main factors responsible for the singular features of these soils is the presence of high amounts of pyrogenic black carbon or biochar, consisting of approximately 35% along anthropogenic surface. The presence of stable organic matter and biological activity are indicative that ADE soils may be *hotspots* of microbial diversity. The management of organic matter with the aim of conserving and improving soil quality is critical to nutrient cycling and maintenance of sustainable tropical agroecosystems. In this context, the biodegradation processes govern most of the carbon biogeochemical cycle, which quite depends on microbial enzymes such as dioxygenases, which use organic compounds in soil as carbon source and energy. The characterization and isolation of potentially degrader bacteria from ADE soils can generate indicative data of the biological quality of these soils, as well as provide information of the genetic diversity of these microorganisms. Likewise, studies involving diversity of catabolic genes may facilitate the understanding of the role of functional microorganisms present in black carbon in the balance of the fertility of ADE soils, besides the evaluation of their influence on biological communities in these soils. This study assessed the diversity of bacterial communities associated with degradation processes of aromatic compounds in ADE soils and black carbon in Central Amazon through cultivation and molecular techniques. The samples were collected in *Caldeirão Experimental Station* (Embrapa-CPAA) under secondary forest and manioc culture, along with Costa do Açutuba, Hatahara and Balbina sites. These TPI sites are characterized by distinct ages of occupation by pre-Colombian populations, ranging from 1,200 years ago (Caldeirão sites) to more than 2,000 years, such Costa do Açutuba site. The isolates obtained from enrichment showed great diversity of species and genera, widely described as potentially degraders of a wide range of aromatic substrates, both natural and xenobiotic. The clone libraries containing functional genes showed that the microbial diversity in black carbon was often greater in relation to soil ADE. The vast majority of *clusters* generated by pyrosequencing (98%) grouped dioxygenases sequences obtained solely in this study. The abundance of catabolic genes was determined by quantitative PCR. The

results of this study showed great diversity of genes associated with C cycling, not previously reported in Amazonian anthropogenic soils, proving the essential role of functional microbial communities supporting the fertility of ADE soils.

Keywords: *Bacteria*, Molecular biology, Microbial ecology, Soil

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Revisão de Literatura	17
1.1.1 Os solos de Terra Preta de Índio da Amazônia e o carvão pirogênico	17
1.1.2 Distribuição das Terras Pretas na Amazônia e as áreas de estudo	22
1.1.3 Estudos sobre diversidade funcional em solos TPI	28
1.1.4 Cultivo de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos aromáticos	34
1.1.5 Técnicas moleculares para estudos de diversidade funcional microbiana	39
REFERÊNCIAS	45
2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS POTENCIALMENTE DEGRADADORAS DE COMPOSTOS AROMÁTICOS EM SOLOS DE TERRA PRETA DE ÍNDIO DA AMAZÔNIA	53
RESUMO	53
ABSTRACT	54
2.1 INTRODUÇÃO	55
2.2 Desenvolvimento	56
2.2.1 Material e Métodos	57
2.2.1.1 Áreas de estudo	57
2.2.1.2 Amostragem dos solos	58
2.2.1.3 Preparo das placas seletivas contendo meio sólido e HPAs	58
2.2.1.4 Produção dos microcosmos para incubação do solo na presença de HPAs	59
2.2.1.5 Caracterização genética dos isolados obtidos pelo enriquecimento	62
2.2.1.6 Processamento de dados (Análise das sequências)	65
2.2.1.7 Construções filogenéticas	65
2.2.2 Resultados e Discussão	65
2.2.2.1 Coleta e Caracterização dos Solos	65
2.2.2.2 Isolamento de bactérias a partir do ensaio de enriquecimento em meio com HPAs	69
2.2.2.3 Caracterização genética dos isolados e análise das sequências	73
2.2.2.4 Construções filogenéticas	87
2.3 Conclusões	94
REFERÊNCIAS	96
3 DIVERSIDADE DE GENES DE DIOXIGENASES AROMÁTICAS EM SOLOS DE TERRA PRETA DE ÍNDIO E CARVÃO PIROGÊNICO	102
RESUMO	102
ABSTRACT	103
3.1 INTRODUÇÃO	104
3.2 Desenvolvimento	106
3.2.1 Material e Métodos	107
3.2.1.1 Áreas de estudo	107
3.2.1.2 Amostragem dos solos	107
3.2.1.3 Caracterização genética das comunidades microbianas	107
3.2.1.4 Análises das sequências, parâmetros ecológicos e medidas de diversidade, e construções filogenéticas.....	112
3.2.2 Resultados e Discussão	114
3.2.2.1 Coleta e Caracterização dos Solos	114
3.2.2.2 Caracterização genética da comunidade microbiana do solo e do carvão pirogênico	114
3.2.2.3 Análises das sequências, parâmetros ecológicos e medidas de diversidade, e construções filogenéticas.....	118
3.3 Conclusões	133
REFERÊNCIAS	135

4 ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE GENES FUNCIONAIS EM SOLOS DE TERRA PRETA DE ÍNDIO E CARVÃO PIROGÊNICO POR PIROSEQUENCIAMENTO E PCR QUANTITATIVO	141
RESUMO	141
ABSTRACT	142
4.1 INTRODUÇÃO	143
4.2 Desenvolvimento	145
4.2.1 Material e Métodos	147
4.2.1.1 Áreas de estudo	147
4.2.1.2 Amostragem dos solos	148
4.2.1.3 Caracterização genética das comunidades microbianas	148
4.2.1.4 Pirosequenciamento de genes funcionais em solos TPI e carvão pirogênico	148
4.2.1.5 Análises das sequências, parâmetros ecológicos e medidas de diversidade	151
4.2.1.6 PCR quantitativo em tempo real	152
4.2.2 Resultados e discussão	153
4.2.2.1 Coleta e Caracterização dos Solos	153
4.2.2.2 Caracterização genética da comunidade microbiana do solo e do carvão pirogênico	156
4.2.2.3 Pirosequenciamento de genes funcionais em solos TPI e carvão pirogênico	157
4.2.2.4 Parâmetros ecológicos e medidas de diversidade	161
4.2.2.5 PCR quantitativo em tempo real	176
4.3 Conclusões	180
REFERÊNCIAS	184

1 INTRODUÇÃO

Antrossolos associados a assentamentos pré-colombianos na região amazônica são exemplos de como as atividades antrópicas podem promover a diversidade metabólica das populações microbianas no solo. Os solos de “Terra Preta de Índio” da Amazônia (TPI) são normalmente encontrados em sítios arqueológicos onde viveram grupos indígenas pré-históricos e possuem altas concentrações de nutrientes, matéria orgânica e elevada quantidade de carvão pirogênico (CP) em relação aos solos adjacentes.

Estes solos antrópicos constituem um nicho de alta diversidade microbiana e um ambiente específico para processos de biossíntese e biodegradação, cuja fração biológica é amplamente dependente de enzimas microbianas que utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono e energia.

Nesse sentido, a caracterização de genes funcionais em solos TPI pode gerar informação sobre a influência da microbiota no equilíbrio da fertilidade desses solos e seu envolvimento nos ciclos biogeoquímicos. Além disso, o isolamento de micro-organismos envolvidos em processos de degradação de compostos aromáticos a partir de solos TPI pode fornecer dados indicativos da qualidade biológica desse solo e sobre a diversidade genética destes organismos. A compreensão das funções exercidas pelas comunidades de *Bacteria* no solo e as interações com outros componentes da biodiversidade, pode gerar benefícios econômicos e estratégicos, bem como a descoberta de micro-organismos potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos e a sustentabilidade da agricultura familiar na região.

Neste contexto, este estudo teve como objetivo analisar a diversidade funcional de genes catabólicos de degradação bacteriana de hidrocarbonetos aromáticos em solos TPI e carvão pirogênico através de técnicas moleculares independentes de cultivo, além de isolamento a partir de enriquecimento em meio mineral.

Desta forma, o capítulo introdutório apresenta uma revisão de literatura sobre os solos de Terra Preta de Índio da Amazônia e o carvão pirogênico, e sobre o uso da técnica de cultivo em meio seletivo para isolamento de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos aromáticos a partir de solos TPI. Além disso, apresenta técnicas moleculares independentes do cultivo, como a construção de bibliotecas metagenômicas

contendo o gene funcional de biodegradação microbiana e a técnica de sequenciamento em larga escala ou pirosequenciamento, utilizadas para estimar a diversidade funcional de genes catabólicos em solos TPI e carvão pirogênico.

1.1 Revisão de Literatura

1.1.1 Os solos de Terra Preta de Índio da Amazônia e o carvão pirogênico

A Amazônia, maior floresta do mundo, espalha-se por seis países da América Latina e representa a vigésima parte de toda a superfície continental da Terra. Com frequência, a Amazônia é vista como um ambiente uniforme de alta pluviosidade e altas temperaturas, representado pela floresta tropical úmida densa com solos que estão entre os mais jovens e os mais antigos do mundo. Do ponto de vista agrônômico, esses solos são ácidos, saturados por alumínio tóxico e deficientes na maioria dos nutrientes minerais, fatos que, segundo Meggers (1996), teriam sido uma limitação natural (determinismo ecológico) imposta ao desenvolvimento humano na Amazônia.

Na realidade, as condições ambientais na Amazônia são muito mais diversificadas, e a ampla diversidade das condições climáticas é acompanhada por variações na vegetação, nos tipos e nas propriedades dos solos (SOMBROEK, 2000). Estes dados podem parecer contraditórios à primeira vista, pois nesses solos encontram-se os ecossistemas florestais com maior riqueza de espécies arbóreas do mundo (GENTRY, 1988). A explicação reside no fato de as plantas terem desenvolvido, ao longo dos anos, estratégias eficientes de uso e estoque dos nutrientes reciclados da liteira decomposta da pela fauna do solo, sobre tudo pela ação de micro-organismos; assim, a perda de nutrientes é mínima e a contribuição da microbiota do solo fundamental para a manutenção e funcionamentos desses ecossistemas naturais.

Evidências arqueológicas indicam que atividades humanas antigas nos habitats amazônicos transformaram significativamente as paisagens na vizinhança dos seus assentamentos, notadamente no período pré-histórico tardio. Em muitas regiões, sociedades indígenas formaram extensos depósitos de resíduos, para muitos simplesmente rejeitos, que alteraram as propriedades do solo (LEHMANN et al., 2003), incrementando ou diminuindo suas aptidões. Sabe-se há muito tempo que a paisagem e os ambientes geológicos estão em

constante transformação, e avaliar qual o impacto humano sobre eles, especialmente no curto e recente passado geológico, é especialmente importante para entender como modificações no ambiente podem influenciar a diversidade biológica de um determinado habitat (COSTA et al., 2009).

Solos com horizonte superficial antrópico, conhecidos como Terra Preta Antropogênica (TPA), Terra Preta de Índio (TPI) ou simplesmente Terra Preta (KAMPF; KERN, 2005) (Figura 1.1), representam um dos mais marcantes registros da antiga ocupação humana na região amazônica, e encontram-se distribuídos aleatoriamente, comumente localizados ao longo de rios e interflúvios, ocupando várzeas, elevações marginais adjacentes e terra firme. Estima-se que os solos TPI representem de 0,1 a 0,3% (de 6 a 18 mil km²) da Bacia Amazônica (SOMBROEK et al., 2003).



Figura 1.1 - Perfil típico de solo de TPI, no sítio Hatahara

Fonte: National Geographic, *Amazônia ano 100*

Uma vez que a grande maioria da região Amazônica é sustentada por solos ácidos e com baixa fertilidade natural para a agricultura, os solos TPI são considerados peças-chave na busca de soluções para a sustentabilidade dos sistemas de produção agrícola na Amazônia, pois consistem em pequenas manchas escuras de solo que podem variar de um hectare ou

menos até várias centenas de hectares, e apresentam visível distribuição de fragmentos de cerâmica e artefatos líticos, cujas concentrações condicionam características físicas e hídricas específicas nas TPI (PETERSEN et al., 2001). Além disto, estes solos apresentam altas concentrações de nutrientes e matéria orgânica, provavelmente pelo manejo de restos orgânicos de origem vegetal (folhas e talos de palmeiras diversas, cascas de mandioca e sementes) e de origem animal (ossos, sangue, gordura, fezes, carapaças de quelônios e conchas), e do fogo pelas populações pré-colombianas (KERN; COSTA, 1997).

Esse grande aporte de material orgânico, provavelmente, tenha contribuído para a formação de solos altamente férteis, com teor elevado de matéria orgânica estável de origem pirogênica. As TPI apresentam elevados teores de fósforo, cálcio e alguns micronutrientes, como o manganês e o zinco, além de pH mais elevado, baixa saturação por Al e Fe, e elevados níveis de capacidade de troca catiônica (CTC) (KERN; KÄMPF, 1989). Da mesma forma, os teores de matéria orgânica estável são superiores em até três vezes em relação aos solos adjacentes inférteis. Isto se deve provavelmente às características mineralógicas desses solos orgânicos ou devido à presença de maior quantidade de carvão pirogênico (carvão vegetal ou orgânico), que pode chegar a 70 vezes mais em relação aos solos de origem, onde ocorre rápida decomposição da matéria orgânica devido às altas temperaturas, precipitações elevadas e deficiência de minerais estáveis (MCCANN et al., 2001; GLASER, 2007).

Aparentemente, o carvão pirogênico é encontrado em todos os ambientes, e isso tem importantes implicações para o ciclo global do carbono (SIMPSON; HATCHER, 2004). Em solos brasileiros, quantidades significativas de carvão pirogênico são encontradas em solos com histórico de incêndios naturais ou provocados, como nos casos do Cerrado (ROSCOE et al., 2001) e ambientes rupestres altimontanos (BENITES et al., 2005). Glaser et al. (2000; 2001) mostraram que, em solos antrópicos da Amazônia como as TPI, a matéria orgânica consiste em, aproximadamente, 35% de carvão pirogênico ao longo do espesso horizonte A antrópico, sendo que estes valores aumentam com o aumento do conteúdo de argila. Nos solos vizinhos às manchas de Terra Preta, os latossolos com outros tipos de horizonte A, o carvão pirogênico ocorre somente nos primeiros centímetros do perfil constituindo cerca de 14% da matéria orgânica do solo.

O carvão pirogênico constitui uma forma altamente recalcitrante de carbono orgânico em função de sua estrutura poliaromática, sendo resistente à oxidação termal, química e foto-oxidação. Embora sofra alguma degradação natural no ambiente, sua incorporação no solo é

um mecanismo muito importante de sequestro de carbono (SCHMIDT et al, 2000). O carvão vegetal presente na TPI se originou provavelmente de queimadas periódicas de lavouras e restos de atividade diária carbonizados, e foi incorporado ao solo pelo homem e pela atividade biológica no decorrer dos anos (MADARI et al., 2006). As queimadas em sistemas florestais e agrícolas, com conseqüente produção de carvão pirogênico, frequentemente exercem importantes efeitos sobre a fertilidade dos solos (WARDLE et al., 1998; KLEINMAN et al., 1995), incluindo o aumento da decomposição da matéria orgânica mais lábil com o conseqüente aumento da disponibilidade de cátions e dos valores de pH (TAMM, 1991).

Glaser et al. (2003) sugeriram que os processos de oxidação do carbono aromático, presente em grande quantidade na superfície do carvão, podem ser a principal razão para a elevada CTC observada em solos TPI, levando à formação de grupos carboxil entre outros grupos funcionais, com carga líquida negativa na escala de pH dos solos. Alguns trabalhos sugerem o efeito positivo dos carvões sobre propriedades físico-hídricas de solos (PICCOLO et al., 1996; TEIXEIRA et al., 2009), onde a presença de fragmentos de carvão pirogênico pode aumentar significativamente a capacidade de retenção de água, especialmente em solos de textura arenosa, em função de sua estrutura altamente porosa, uma vez que cerca de 70 a 80% do volume do carvão é formado por poros (Figura 1.2). Em virtude de sua conformação porosa, Pietikainen et al. (2000) sugeriram que fragmentos de carvão podem ser utilizados como micro-habitat pelos organismos do solo.

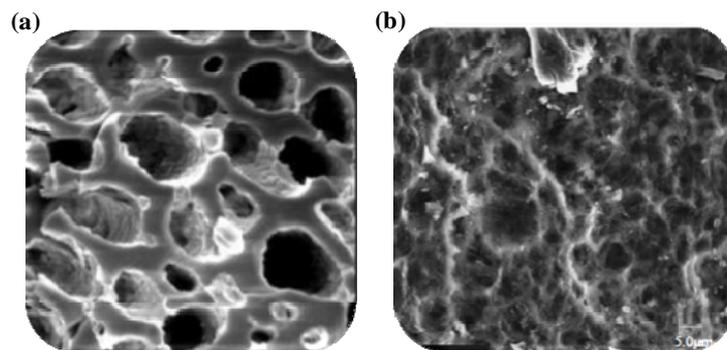


Figura 1.2 - (a) e (b) Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de fragmento de carvão pirogênico. (a) Imagem cedida por Mateus de Souza Terceti e (b) Glaser (2007)

Nesse contexto, a incorporação antrópica de fragmentos de carvão pirogênico nas TPI pode ter contribuído para favorecer a atividade microbiana e reduzir a lixiviação de nutrientes, mantendo estável a fertilidade do solo e, conseqüentemente, a produtividade agrícola e a

sustentabilidade (GLASER et al. 2003; STEINER et al., 2004). Comunidades microbianas do solo respondem de forma complexa ao fogo e à presença do carvão vegetal (PIETIKAINEN et al., 2000); contudo, a interação dos micro-organismos com o carvão não é ainda bem compreendida, e este fato pode justificar a necessidade de estudos envolvendo a avaliação da estrutura de comunidades microbianas presentes neste micro-habitat e seu papel na manutenção das propriedades físicas, químicas e das características biológicas dos solos TPI.

Devido à elevada e duradoura fertilidade, as áreas de TPI são frequentemente procuradas pelas populações locais para cultivos de subsistência. As variações de profundidade, que vão de 30 a 60 cm, podendo eventualmente chegar a 2 metros, estão diretamente relacionadas com o padrão de assentamento do homem pré-histórico, por causa das diferenças de intensidade, duração e a natureza das atividades culturais que formaram estes solos, bem como os processos naturais e outras atividades ocorridas após o abandono dos sítios (SCHMIDT; NOACK, 2000).

As TPIs possuem também maior atividade biológica que os solos adjacentes originais, onde não houve ação antrópica, e esta atividade pode estar relacionada, entre outros atributos, aos elevados valores de pH nestes solos (KERN; KÄMPF, 1989). A população microbiana exerce um papel fundamental nos ciclos biogeoquímicos e está intimamente relacionada com as taxas de decomposição da matéria orgânica e com a persistência da fertilidade nos solos de TPI. Entretanto, pouco se conhece sobre a magnitude e estrutura da diversidade microbiana e o verdadeiro papel dos micro-organismos na manutenção da capacidade produtiva destes solos.

Nos ecossistemas amazônicos, os micro-organismos (principalmente fungos e bactérias) atuam em grande número na liteira em decomposição sobre o solo a fim de garantir a incorporação dos elementos minerais no perfil do solo. A presença de material orgânico estável e a grande atividade biológica indicam que os solos TPI podem ser sítios de alta diversidade microbiana, constituindo uma extensa fonte de germoplasma microbiano, segundo Tsai et al. (2003), que avaliaram a diversidade bacteriana em TPI com base no sequenciamento do gene 16S rRNA e encontraram alta ocorrência de clones homólogos a bactérias não cultivadas. Isto demonstra a necessidade de se intensificar estudos nesses ambientes, que podem ser fontes de diversidade bacteriana e de produtos biotecnológicos ainda pouco conhecidos e não explorados até o presente momento.

As TPI formam micro-ecossistemas próprios que não se esgotam rapidamente, mesmo nas condições tropicais em que estão expostos ou sob atividade agrícola. Atualmente são poucas as informações detalhadas e organizadas sobre esta diversidade, assim como estudos sobre o efeito de manejo da TPI que caracterizem a função específica da diversidade microbiana no desenvolvimento da fertilidade sustentável destes solos. Além disso, a elaboração de uma prospecção da diversidade microbiana dos solos de TPI é de suma importância para o conhecimento da extensão da diversidade deste bioma tropical e para a sustentabilidade da agricultura familiar na região. Estudos sobre a diversidade funcional microbiana podem fornecer dados para a compreensão das funções exercidas pelas comunidades no solo e o conhecimento das suas interações com outros componentes da biodiversidade, além de benefícios econômicos e estratégicos, como a descoberta de micro-organismos potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos.

1.1.2 Distribuição das Terras Pretas na Amazônia e as áreas de estudo

Os solos com Terra Preta na Amazônia estão distribuídos em praticamente todas as ecorregiões. Esses ambientes apresentam características bióticas e abióticas diferenciadas e normalmente coincidem com os grandes interflúvios. A grande maioria dos sítios arqueológicos está localizada nas margens de rios, tanto os de águas brancas como Purus, Madeira, Juruá, Solimões e Amazonas; como os de águas claras, a exemplo do Trombetas, Tapajós e Mapuera; ou ainda nas margens de rios de águas negras como o Rio Negro, Urubu, Caxiuanã e Mapuá (KERN et al., 2003). Levando-se em consideração a representatividade das Terras Pretas nos mais diversos ecossistemas, pode-se deduzir que o homem pré-histórico, que produziu esses solos, teve condições de se adaptar aos diversos habitats.

Do ponto de vista ecológico, a importância de se analisar a diversidade funcional de grupos microbianos diretamente envolvidos nos ciclos biogeoquímicos consiste em avaliar o papel dos solos TPI e do carvão pirogênico na manutenção de comunidades bacterianas que atuam em processos específicos no solo e do uso de resíduos vegetais carbonizados como condicionadores do solo no Brasil (STEINER et al., 2004). A alta atividade biológica observada nas Terras Pretas de Índio sugere que a transformação dos resíduos da carbonização deve ser mediada por organismos, seja pela ação direta sobre o carvão ou ainda

pela liberação de enzimas capazes de transformar quimicamente esses substratos (BENITES et al., 2009).

Neste sentido, a busca de micro-organismos com elevado potencial biotecnológico para degradação de compostos aromáticos é de suma importância para viabilizar a descontaminação biológica de ambientes (biorremediação), que implica em diminuição de gastos e impacto ambiental em relação aos processos de remediação química e física, e principalmente para a geração de dados sobre a diversidade microbiana em solos tropicais, com níveis elevados nas TPI.

Dentro deste contexto, foram avaliados cinco sítios de TPI com idades de formação e ocupação bastante variáveis, e com históricos diferentes de uso da terra. O sítio Hatahara (03° 16' 28.45"S - 60° 12' 17.14"W, Figura 1.3) foi descoberto em 1997 e possui uma área de 1600m² (16 hectares), estando localizado sobre um terraço adjacente à várzea da margem esquerda do Rio Solimões na Amazônia central, na região de Iranduba, muito próximo a Manaus (AM). A cobertura atual é de áreas de pasto e de cultivo de mamão e banana geralmente. Na superfície é visível uma alta densidade de material cerâmico associada às TPI. O sítio Hatahara compreende um dos sítios arqueológicos mais explorados por arqueólogos e geólogos para estudo da formação e caracterização das TPI e sua idade está estimada em 600 a 1000 anos (NEVES et al., 2003; LIANG et al., 2006).

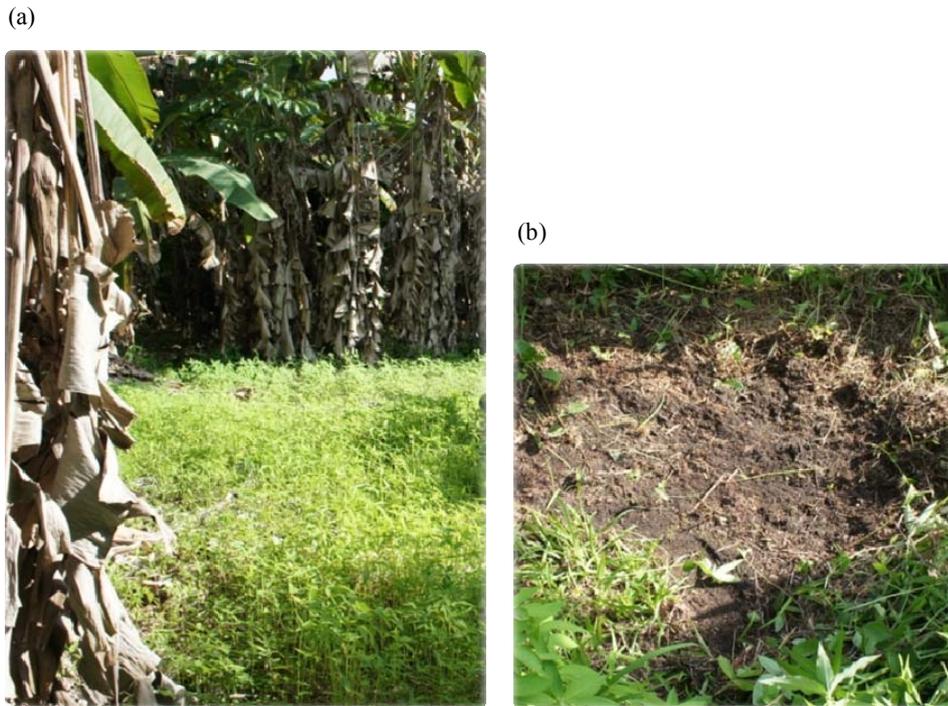


Figura 1.3 - (a) Sítio de TPI Hatahara (Irاندوبا, AM). (b) detalhe da superfície do solo de TPI

Fotos: Fabiana Cannavan

O sítio Costa do Açutuba ($03^{\circ} 05' 53.92''S$ - $60^{\circ} 21' 19.90''W$), também na região de Irاندوبا (AM), foi localizado em 1994 e se estende por aproximadamente 3 km ao longo da margem direita do rio Negro, cerca de 40 km à montante de sua foz (Figura 1.4). O sítio tem cerca de 90 hectares de área e foi ocupado por populações indígenas em pelo menos quatro episódios distintos desde 300 anos AC até o século XVI DC. A estas ocupações se associam depósitos sedimentares de TPI, com espessuras que superam 1m, indicando intensa atividade antrópica (HECKENBERGER et al., 1999). Atualmente a superfície do sítio é coberta por áreas de cultivo e de vegetação secundária.

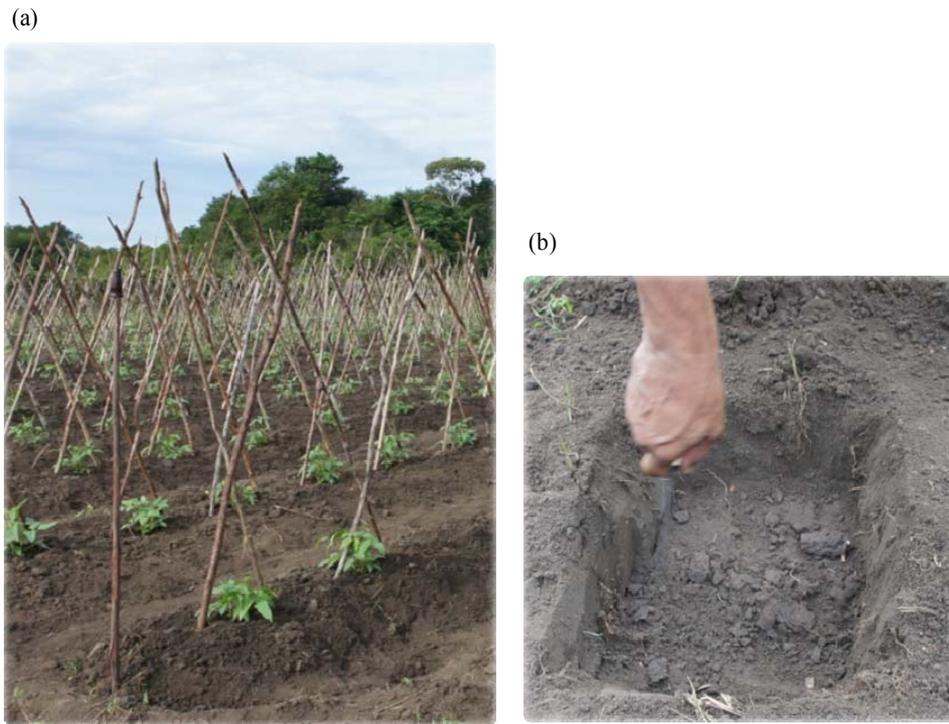


Figura 1.4 - (a) Sítio de TPI Costa do Açutuba (Iranduba, AM). (b) detalhe da superfície do solo de TPI

Fotos: Fabiana Cannavan

Ainda no município de Iranduba, a Estação Experimental do Caldeirão ($03^{\circ}26'S$, $60^{\circ}23'W$), localizada na EMBRAPA Amazônia Ocidental (CPAA-AM) a aproximadamente 22 km de Manaus, compreende uma área de 208,14 ha onde são conduzidas pesquisas com grãos, hortaliças, mandioca, silvicultura e piscicultura. No Caldeirão estão localizados dois sítios de TPI analisados neste trabalho, distintos em relação ao sistema de uso da terra. O sítio TPI Capoeira ($03^{\circ}15'11''S$ - $60^{\circ}13'43''W$, Figura 1.5) está sob floresta secundária há mais de 20 anos. A vegetação natural é de floresta tropical úmida com precipitação anual de 2530 mm (1971 - 1997) sendo o valor máximo sazonal entre dezembro e maio, e a temperatura média anual é de $25,8^{\circ}C$ (1987 - 1997), com umidade relativa de 85% (CORREIA; LIEBEREI, 1998). O sítio sob cultivo ($03^{\circ}15'09''S$ - $60^{\circ}13'42''W$, Figura 1.6), principalmente de mandioca (TPI Cultivada), compreende uma área de TPI onde se desenvolve intensa atividade agrícola há pelo menos 30 anos.



Figura 1.5 - (a) Sítio de TPI sob floresta secundária (capoeira) na Estação experimental do Caldeirão (Iranduba, AM). (b) detalhe do perfil de TPI sob capoeira

Fotos: Mariana Germano.

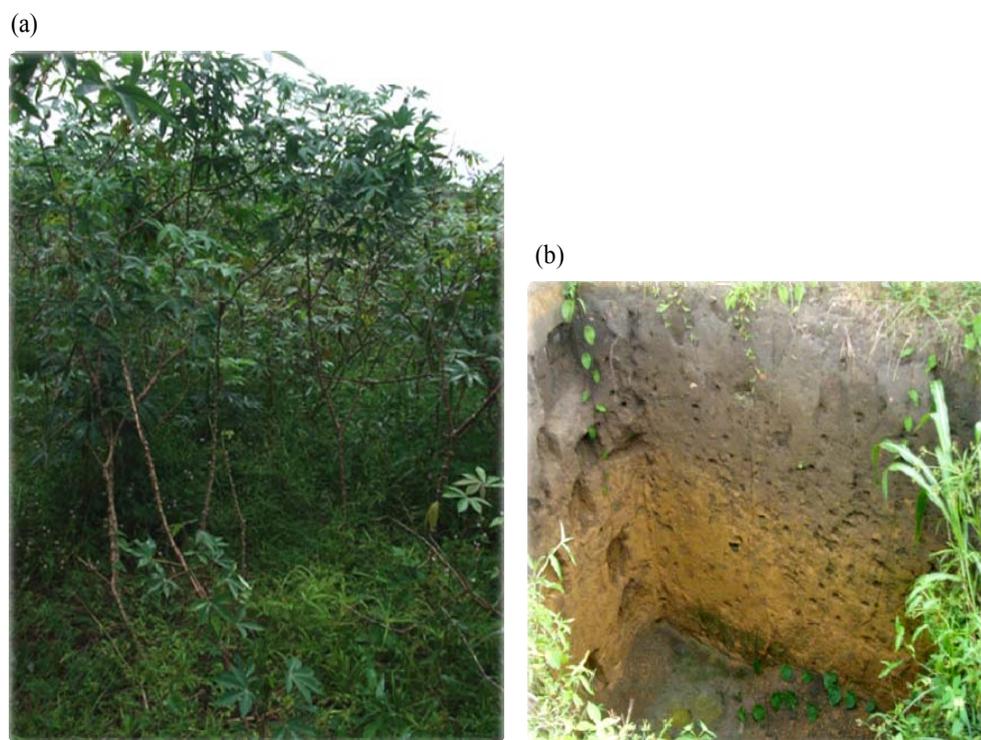


Figura 1.6 - (a) Sítio de TPI sob cultivo de mandioca (cultivada) na Estação experimental do Caldeirão (Iranduba, AM). (b) detalhe do perfil de TPI sob cultivo

Fotos: Mariana Germano.

O sítio Balbina (01°30'26,4"S - 60°05'34"W), a última área de estudo, está localizada próxima à Comunidade Rumo Certo no município de Presidente Figueiredo (AM), às margens da lagoa da Hidroelétrica Balbina, na Amazônia Central. A vegetação é formada por floresta tropical, com grande predominância de terras acidentadas, e o solo apresenta características arenosas nas áreas mais altas e argilosas nas áreas mais baixas. Este sítio é considerado um “modelo” de solo TPI original, uma vez que não tem sido cultivado ou perturbado (desmatado) por mais de 20 anos (Figura 1.7).



Figura 1.7 - (a) Sítio de TPI Balbina (Presidente Figueiredo, AM). (b) detalhe do perfil de TPI no sítio

Fonte: Cannavan, 2007.

De modo geral, as TPI são cultivadas na região amazônica por pequenos agricultores, principalmente na forma de agricultura de subsistência, no sistema de agricultura itinerante de corte e queima. A maior diferença no uso da terra nas TPI, em comparação com os Latossolos ou Argissolos adjacentes, refere-se à produtividade de alguns cultivos, como o mamão, milho, melancia, feijão (*Phaseolus vulgaris*) e hortaliças, que são cultivados com produções satisfatórias nestas áreas, com ausência ou baixo uso de insumos, o que não ocorre nos solos adjacentes. As TPI apresentam níveis elevados da maioria dos nutrientes essenciais ao crescimento das plantas, muito superiores aos níveis críticos para a maioria das plantas cultivadas na Amazônia, mesmo após longos períodos de cultivo.

A importância deste tipo de solo antropogênico reside na grande diversidade biológica e riqueza arqueológica desse ambiente, além de seu impacto na sustentabilidade de sistemas agrícolas na região amazônica. Apesar de constituírem pequenas ‘manchas’ de solo, com pouco ou nenhum potencial de exploração para a agricultura, as características biológicas, químicas e físicas e das TPI, com destaque para a grande quantidade de carvão presente nestes solos, podem servir como modelo para a busca de soluções na recuperação de solos degradados e na manutenção da resiliência da fertilidade em ambientes que sofrem ações antrópicas para exploração com finalidades econômicas.

1.1.3 Estudos sobre diversidade funcional em solos TPI

Um dos principais fatores responsáveis pelo comportamento diferenciado dos solos antrópicos como as TPI, comparado aos solos adjacentes sem horizonte A antrópico, é a maior quantidade e, principalmente, a diferença qualitativa da sua matéria orgânica (MADARI et al., 2009). O manejo da matéria orgânica visando à conservação e melhoria da qualidade do solo é fundamental na ciclagem de nutrientes e na manutenção da sustentabilidade dos agroecossistemas tropicais; entretanto, sua dinâmica no ambiente é ainda pouco conhecida.

Nas Terras Pretas, a distribuição da matéria orgânica difere em muito de solos sem interferência antropogênica, sendo que as frações mais recalcitrantes (por exemplo, humina e ácidos húmicos) predominam em relação às frações mais solúveis, como os ácidos fúlvicos (SOUZA et al., 2003). De modo geral, as TPI não são homogêneas e apresentam diferenças quanto à fertilidade e potencial produtivo (LEHMANN et al., 2003). Apesar disto, algumas propriedades importantes ligadas ao grau de fertilidade dos solos são comuns para a maioria das TPI, como o alto teor de carvão pirogênico, com propriedades físico-químicas particulares e elevada concentração de estruturas poliaromáticas, além de elevados teores de fósforo e cálcio quando comparadas a solos adjacentes.

Em solos brasileiros, a matéria orgânica pode contribuir para até 80% das cargas negativas do solo, e isso explica o fato de a CTC estar, em grande parte, associada à matéria orgânica do solo. Assim, uma variação na quantidade e qualidade da matéria orgânica, presente em altas concentrações nas TPI, pode causar grande efeito sobre as propriedades e os processos metabólicos específicos que ocorrem no sistema do solo (KERN; KÄMPF, 1989).

Os processos de biodegradação, juntamente com a biossíntese, regem grande parte do ciclo do carbono, cuja fração biológica é amplamente dependente de enzimas microbianas que utilizam compostos orgânicos presentes no solo como fonte de carbono e energia (WACKETT, 2004). Estes processos funcionais são influenciados por uma série de fatores bióticos e abióticos que determinam a taxa de degradação e a atividade do metabolismo microbiano sobre o composto-alvo. A toxicidade do composto para o micro-organismo, suas propriedades físico-químicas (solubilidade, peso molecular, reatividade química, disponibilidade, substituintes, concentração) e as variáveis ambientais (oxigênio dissolvido, pH favorável, temperatura, salinidade) são fatores determinantes do metabolismo destes substratos.

Os principais substratos orgânicos nas reações de biodegradação por micro-organismos são os hidrocarbonetos, compostos formados exclusivamente de carbono e hidrogênio, também chamados hidrocarburetos, carboidretos, carbetos, carburetos ou carbonetos de hidrogênio, aos quais se podem juntar átomos de oxigênio (O), nitrogênio (N) ou enxofre (S), dando origem a diferentes compostos de outros grupos funcionais. Estão presentes na constituição da matéria orgânica de origem vegetal e animal como na superfície cerácea das folhas, óleos vegetais, componentes de fito e zooplâncton, cutículas de insetos e lipídeos de micro-organismos, além de serem os principais constituintes do petróleo e de produtos derivados do óleo, e originam-se da diagênese de precursores naturais, como compostos orgânicos esteróides, da erosão de sedimentos continentais e da exudação de petróleo a partir de fendas oceânicas (UNEP, 1991).

Os hidrocarbonetos presentes no ambiente são degradados principalmente por bactérias e fungos. Embora amplamente presentes nos ecossistemas terrestre e aquáticos, a fração total da comunidade heterótrofa representada por bactérias e fungos que utilizam hidrocarbonetos é altamente variável, com frequências variando de 6% a 82% para fungos do solo, 0,13% a 50% de bactérias do solo, e 0,003% a 100% para bactérias marinhas. Organismos individuais podem metabolizar apenas uma gama limitada de hidrocarbonetos como substratos, de forma que comunidades microbianas mistas com ampla capacidade enzimática são necessárias para degradar misturas complexas de hidrocarbonetos, como o petróleo bruto (BRITTON, 1984).

A geração dos hidrocarbonetos no ambiente ocorre naturalmente e de forma contínua, pela combustão incompleta da matéria orgânica, da biomassa vegetal, da madeira e de outros

materiais orgânicos. Porém a contaminação ambiental está associada à geração antropogênica destes compostos, que ocorre através das indústrias petroquímicas, que produzem hidrocarbonetos aromáticos para serem utilizados na fabricação de corantes, de fibras sintéticas, de preservantes de madeira e outros. Além disso, as atividades de produção de carvão vegetal, de extração e gaseificação do carvão mineral e a cadeia de extração, transporte, refino, transformação e utilização do petróleo e seus derivados são também responsáveis pela introdução de grandes quantidades de hidrocarbonetos aromáticos no ambiente (BAMFORTH; SINGLETON, 2005).

A capacidade de degradar e/ou utilizar hidrocarbonetos aromáticos é exibida por uma grande variedade de gêneros bacterianos e fungos. Floodgate (1984) listou 25 gêneros de bactérias e 27 gêneros de fungos degradadores de hidrocarbonetos, que foram isolados do ambiente marinho; uma compilação semelhante por Bossert e Bartha (1984) para isolados do solo inclui 22 gêneros de bactérias e 31 gêneros de fungos. Com base no número de publicações, os mais importantes gêneros de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos em ambientes marinho e no solo são *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, e *Pseudomonas* spp., sendo que entre os fungos, isolados de *Mortierella* e *Trichoderma* spp. são predominantes nos solos, além de *Aspergillus* e *Penicillium* spp. A medida da participação de bactérias, leveduras e fungos filamentosos na biodegradação de hidrocarbonetos e da predominância de um ou outro domínio na realização desta função, parece estar intimamente relacionada às características do ecossistema e das condições ambientais locais (LEAHY; COLWELL, 1990).

É bastante conhecida a ação de enzimas catabólicas expressas por espécies bacterianas filogeneticamente distintas na degradação de compostos biogênicos (por exemplo, a lignina e compostos celulares), compostos antropogênicos e compostos derivados de reações abióticas (hidrocarbonetos aromáticos gerados em sedimentos por diagênese, entre outros) (WACKETT, 2004). Entretanto, a grande maioria das enzimas catabólicas ainda não foi identificada, purificada e caracterizada, embora existam ao menos 10 milhões de substratos orgânicos conhecidos por serem biodegradáveis. Deste total, apenas 10.000 têm sido estudados em relação ao micro-organismo capaz de metabolizá-lo, e em torno de 0,001% destes compostos foi caracterizada detalhadamente, até o presente momento.

Em ambientes aeróbios, as enzimas oxigenases codificadas por genes funcionais distribuídos em plasmídeos bacterianos, no cromossomo ou em ambos, iniciam o processo

de degradação através da incorporação de um ou dois átomos de oxigênio aos substratos, tornando-os suscetíveis ao metabolismo para um grande número de micro-organismos. A evolução dessas enzimas em bactérias, tanto Gram positivas como Gram negativas, pode ser observada como resultado da adaptação microbiana frente a novos compostos químicos inseridos no ambiente (WACKETT, 2004).

Os processos iniciais da degradação bacteriana de inúmeros compostos aromáticos são similares e envolvem a ação de dioxigenases aromáticas (Figura 1.8) (BARRIAULT et al., 1998). As dioxigenases aromáticas são enzimas-chave no processo de degradação aeróbica de compostos orgânicos no ambiente, uma vez que constituem sistemas enzimáticos periféricos multicomponentes que incorporam oxigênio molecular no núcleo aromático, clivando o anel hidroxilado (MISHRA et al., 2001). Este processo resulta na produção de succinato, acetilCoA, ácido pirúvico, ácido acético e aldeídos, utilizados pelos micro-organismos na síntese de constituintes celulares e energia.

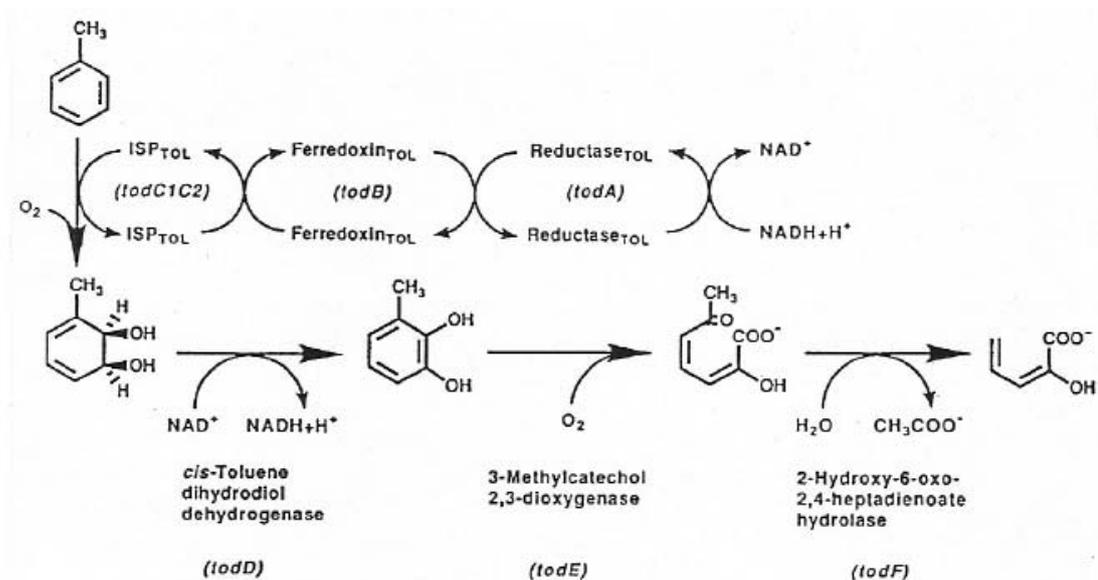


Figura 1.8 - Início da via de degradação do tolueno pela ação da dioxigenase em *Pseudomonas putida* F1

Fonte: Zylstra e Gibson (1991)

A família das dioxigenases aromáticas ou ARHDs (do inglês, *Aromatic Ring Hydroxylating Dioxygenases*) é composta por sequências bastante diversas, devido provavelmente à dispersão destes genes via *transposons* e plasmídeos, proporcionando mobilidade e acelerando o potencial evolucionário destes genes (KUMAMARU et al., 1998). As dioxigenases que degradam hidrocarbonetos poliaromáticos possuem uma ou mais

proteínas envolvidas no transporte de elétrons, dependendo do substrato e da origem da enzima, sendo geralmente uma redutase e uma ferredoxina, além de duas subunidades de proteína ferro-enxofre: e a subunidade beta (menor) e a subunidade alfa (maior), que pode ser dividida em dois domínios: um centro catalítico Rieske-[2Fe-2S] e um átomo de ferro mononuclear (CERNIGLIA, 1992). Paralelamente, as dioxigenases para degradação de benzoato, bifenil, tolueno e benzeno são complexos enzimáticos formados por três ou quatro subunidades protéicas, que catalisam uma reação redox dependente de NADH.

Os principais substratos das dioxigenases parecem ser derivados de óleo bruto e lignina, uma vez que constituem as maiores fontes de compostos aromáticos no ambiente; entretanto, uma enorme quantidade e diversidade de outros compostos podem ser degradadas por estas enzimas. Estudos em relação às subunidades alfa e beta das dioxigenases e sua importância no reconhecimento do substrato, indicam que a subunidade maior pode desempenhar individualmente o controle desta função e, devido às suas características conservadas, esta subunidade tem sido utilizada como alvo para detecção de micro-organismos envolvidos na degradação de hidrocarbonetos aromáticos em ambientes contaminados ou não por estes compostos (WILSON et al., 1999).

As evidências em relação à conservação da subunidade alfa de dioxigenases aromáticas, juntamente com o reconhecimento de sua função como sítio catalítico, permitiram o uso destes genes como marcadores moleculares em análises de diversidade funcional de genes catabólicos, pelo desenvolvimento de *primers* degenerados para a amplificação de uma gama muito maior de dioxigenases. Paralelamente, esta ferramenta tornou possível a identificação de micro-organismos degradadores de inúmeros substratos orgânicos em vários ecossistemas, além da descrição de novas sequências de ARHDs em micro-organismos cultivados e não cultivados (KIM; CROWLEY, 2007).

Nesse contexto, a compreensão da diversidade funcional associada com a degradação da matéria orgânica, não somente nas TPI, mas nos solos em geral, pode constituir um grande desafio para o entendimento de processos, como uma tentativa de descrever a diversidade taxonômica real desses ambientes. A variedade e a complexidade bioquímica dos resíduos orgânicos no ecossistema do solo são claramente relacionadas com as espécies microbianas e sua diversidade metabólica, e medir as comunidades microbianas associadas com classes distintas de carbono no solo pode esclarecer como as TPI mantêm a fertilidade estável por centenas de milhares de anos (TSAI et al., 2009).

Nas TPI, o carvão pirogênico parece desempenhar um papel-chave na retenção de nutrientes e na estabilização da matéria orgânica, como resíduo de decomposição ou dentro de células vivas (SOMBROEK et al., 2003), apesar das intensas condições climáticas que levam à formação de solos altamente lixiviados nos trópicos úmidos (LEHMANN et al., 2003).

Assim, o papel central da comunidade microbiana neste solo único deve ser atribuído às alterações na composição do solo antrópico, principalmente a presença de carvão pirogênico, que pode aumentar a fertilidade pela diminuição da densidade do solo, melhorando a retenção de umidade e aumentando o pH. Além disso, as propriedades de carga na superfície do carvão pirogênico provavelmente são responsáveis por aumentar a CTC, reduzindo assim a lixiviação de nutrientes (GLASER et al., 2002).

Devido à sua resiliência nas TPI, além das características físico-químicas únicas, o carvão pirogênico é considerado elemento fundamental na biogeoquímica destes solos. Enquanto o carvão atua diretamente na ciclagem de nutrientes nas TPI, os fluxos de matéria orgânica no solo compreendem uma interação dinâmica de fatores físicos e químicos que afetam os processos biológicos (CHAPIN et al., 2002).

A Figura 1.9 apresenta microscopia de fluorescência da superfície do carvão previamente separado de um solo TPI, onde é possível observar a presença de micro-organismos vivos (em verde), indicando que fragmentos de carvão pirogênico podem ser utilizados pelas comunidades microbianas do solo diretamente como habitat ou como plataforma de troca de nutrientes para os micro-organismos, apesar de sua recalcitrância química (ABU-SALAH et al., 1996; CHITRA et al., 1996). Ainda, Pietikainen et al. (2000) e Zackrisson et al. (1996) reportaram que a adição de elevadas concentrações de carvão pirogênico alterou a estrutura das comunidades microbianas tanto do solo quanto da cobertura vegetal, mas pouco ainda se conhece sobre o impacto do carvão nas comunidades biológicas da interação planta-solo (rizosfera) por exemplo.

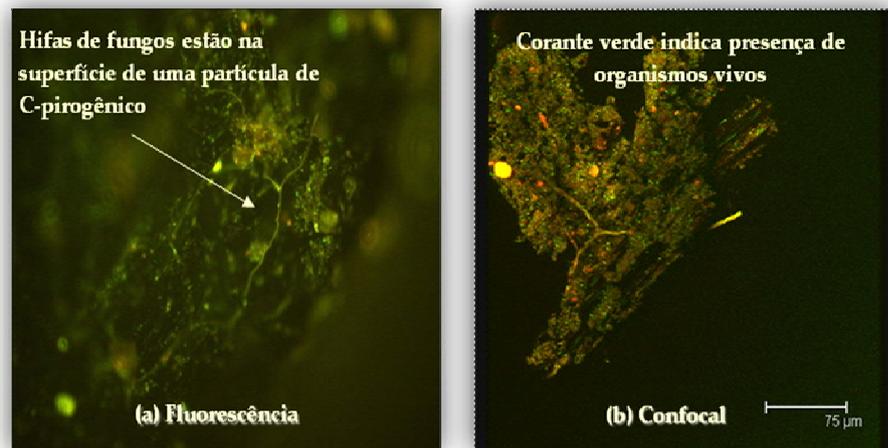


Figura 1.9 - Imagens por microscopia (a) Fluorescente e (b) confocal, demonstram presença de micro-organismos vivos na superfície do carvão pirogênico

Fonte: Grossman et al. (2006)

O carvão pirogênico claramente imprime um grande impacto sobre a dinâmica de nutrientes do solo e os processos ecológicos (ZACKRISSON et al., 1996). O que ainda permanece pouco elucidado é como enorme variedade de espécies de carbono no solo e suas características químicas impactam as populações microbianas e qual a medida da interação dos micro-organismos do solo com o carvão pirogênico.

Estas evidências podem justificar estudos envolvendo as TPI e seu carvão pirogênico na determinação de diversidade funcional em solos antrópicos da Amazônia. Compreender os processos biogeoquímicos envolvidos na manutenção da fertilidade dos solos TPI pode levar ao desenvolvimento de novas tecnologias de manejo do solo nos trópicos (GLASER et al., 2002), além de fornecer uma nova estratégia para a mitigação de CO₂ atmosférico pelo sequestro de carbono (carvão pirogênico), que também pode funcionar como um núcleo para a melhoria da fertilidade do solo.

A conservação de sequências de aminoácidos de centros ativos de inúmeros tipos de enzimas catabólicas pode fornecer uma base sólida para a identificação de proteínas e variantes gênicas que executam a mesma reação ou reações similares. Neste ponto reside a importância do uso de técnicas baseadas em similaridade de sequência para a identificação e isolamento de genes que codificam variantes enzimáticas envolvidas na biotransformação de compostos aromáticos: estudos de amostras ambientais podem resultar na identificação de enzimas biodegradativas capazes de aumentar características

cinéticas relevantes para processos de biorremediação e ciclagem de nutrientes (GALVÃO et al., 2005).

Existem inúmeros gêneros bacterianos capazes de degradar hidrocarbonetos por expressarem genes catabólicos de dioxigenases e outras enzimas envolvidas nos processos de biodegradação, e a caracterização destes análogos distintos pode permitir aos pesquisadores responder questões referentes à significância ecológica, distribuição relativa e transmissão de diferentes oxigenases intra e interespécies ou mesmo entre gêneros distintos, como resultado de uma possível resposta adaptativa aos diferentes ambientes e à especificidade a certas classes de substratos, como uma alternativa ao sequenciamento completo do genoma do organismo (BALDWIN et al., 2003).

Técnicas moleculares combinadas com práticas tradicionais de cultivo de micro-organismos, principalmente baseadas em enriquecimento de culturas em meio seletivo, tem sido muito utilizadas com o objetivo de identificar populações bacterianas que são funcionalmente importantes nos processos de biodegradação de compostos orgânicos (CHADHAIN et al., 2006). Nesse sentido, a caracterização e o isolamento de bactérias potencialmente degradadoras em solos TPI na Amazônia, que apresentam alta atividade antrópica, pode gerar dados indicativos da qualidade biológica desse solo, além de prover informações sobre a diversidade genética destes micro-organismos, fornecendo evidências sobre eventos de transferência horizontal e de transposição destes genes.

Da mesma forma, o estudo da diversidade funcional de genes catabólicos pode facilitar a compreensão das bases adaptativas dos micro-organismos do carvão pirogênico e seu papel no equilíbrio da fertilidade das TPI, além de determinar sua influência nos atributos biológicos destes solos antrópicos, tão favoráveis à agricultura sustentável na região amazônica.

1.1.4 Cultivo de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos aromáticos

Os micro-organismos do solo são componentes essenciais para o funcionamento sustentável dos ecossistemas, sendo fundamentais no processo de fragmentação e decomposição da matéria orgânica e na disponibilização de nutrientes do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). Nesse contexto, a qualidade do solo é totalmente dependente da

manutenção da diversidade metabólica das comunidades microbianas, que desempenham papéis essenciais principalmente nos processos de biossíntese e biodegradação de compostos por meio de catálise enzimática, para obtenção de carbono e energia (BORNEMAN et al., 1996).

Os hidrocarbonetos aromáticos não são degradados pela grande maioria dos micro-organismos, devido à complexidade de sua estrutura química e baixa solubilidade em água. Para a seleção dos micro-organismos com comprovada capacidade de degradação destes compostos, faz-se necessário fornecer condições adequadas de disponibilidade de água, de nutrientes inorgânicos, de pH e de temperatura. Os micro-organismos degradadores utilizam vias bioquímicas complexas para transformar os hidrocarbonetos aromáticos em intermediários comuns do seu catabolismo e, a partir daí, em fonte de carbono e energia para o seu crescimento (BAMFORTH; SINGLETON, 2005).

Dentro deste contexto, vários micro-organismos isolados de solos TPI foram cultivados em meio seletivo no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA-USP, onde foi possível observar uma extensa predominância de Actinomicetos e proteobactérias, principalmente bactérias do gênero *Pseudomonas* (FERREIRA, 2007). Essas bactérias são comumente encontradas no solo e têm sido extensivamente descritas como micro-organismos potencialmente produtores de enzimas e metabólitos envolvidos em processos biocatalíticos, principalmente na biodegradação de compostos aromáticos, presentes em ambientes onde há intensa atividade metabólica de compostos orgânicos (WILSON; JONES, 1993).

As técnicas de enriquecimento *in vitro* de grupos ou consórcios bacterianos funcionais têm sido comumente utilizadas para o isolamento de degradadores bacterianos a partir de ambientes terrestres, marinhos e sedimentos (MAcCORMACK; FRAILE, 1997; HEAD, 1998; YAKIMOV et al., 2003). O ensaio de enriquecimento a partir do solo consiste geralmente na inoculação de uma pequena quantidade do sistema em meio mineral contendo unicamente hidrocarbonetos aromáticos como fonte de carbono e energia. O microcosmo é então submetido a condições de incubação por períodos que podem variar de poucos dias a vários meses, até o novo subcultivo para diluição da mistura inicial, que irá culminar nas diluições seriadas para isolamento de colônias puras e identificação taxonômica.

Frequentemente, os resultados dos ensaios de isolamento permitem a aquisição de informação específica, como por exemplo, a identificação taxonômica de degradadores

microbianos potenciais e de vias metabólicas de interesse comercial. Entretanto, devido às dificuldades associadas ao cultivo de micro-organismos ambientais, a utilização de DNA de culturas obtidas por enriquecimento em meio contendo hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia, pode favorecer estudos envolvendo novos isolados microbianos, além de aumentar o acesso a novas fontes de genes de interesse biotecnológico (ENTCHEVA et al., 2001).

De modo geral, existem inúmeras aplicações para o ensaio de enriquecimento em meio seletivo, tanto no contexto da biologia molecular, que envolve técnicas avançadas para identificação e caracterização de micro-organismos com potencial biotecnológico, quanto em termos de práticas convencionais de cultivo e aplicação da microbiota do solo, que já foram reportadas por vários autores. Recentemente, Chadhain et al. (2006) relataram o uso da técnica de cultivo em meio contendo hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) como fonte de C e energia, para monitorar mudanças na estrutura da comunidade microbiana em presença do substrato.

Posteriormente, os mesmos autores utilizaram técnicas de DNA *fingerprinting* como DGGE (do inglês, *Denaturing Gel Gradient Electrophoresis*) e ARDRA (do inglês, *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), além da detecção do gene catabólico por meio de PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) para classificar a atividade da comunidade funcional, cuja diversidade e riqueza de espécies foram determinadas para os consórcios bacterianos obtidos pelo enriquecimento. A técnica possibilitou a observação das diferenças na diversidade da comunidade quando comparada ao solo original, principalmente em relação ao tipo de substrato utilizado (número de anéis benzênicos condensados), como foi reportado nas análises de rarefação e nos valores de heterogeneidade encontrados para os consórcios microbianos.

A capacidade das bactérias para utilizar HPAs como fonte de carbono e energia tem sido amplamente documentada ao longo das últimas décadas (CERNIGLIA, 1992; AHN et al., 1999). Embora estes estudos tenham sido essencial para o estabelecimento de vias metabólicas para a biodegradação de HPAs individuais, há também um interesse crescente na compreensão de como poluentes orgânicos afetam a estrutura global das comunidades microbianas.

Iwai et al. (2005) reportaram a utilização do enriquecimento em meio mineral para o isolamento e a caracterização de um novo isolado bacteriano YA, do gênero *Janibacter* sp. (filo *Actinobacteria*), que utiliza o dibenzofuran (1-chloro-dibenzo-p-dioxin) no metabolismo de carbono. Este composto constitui um hidrocarboneto aromático considerado poluente orgânico persistente (POP), assim como os bifenilos policlorinados ou PCBs (do inglês, *Polychlorinated Biphenyls*) e os hexaclorobenzenos. Os autores descreveram ainda ao menos duas vias metabólicas oxidativas diferentes para a degradação de dibenzofuran no isolado YA, o que demonstra a grande diversidade metabólica bacteriana na biotransformação de moléculas e na ciclagem de carbono no solo.

Os xenobióticos são moléculas orgânicas que constituem compostos altamente tóxicos e persistentes no ambiente. Nesse contexto, a atividade de bactérias do solo desempenha um papel chave no catabolismo destes hidrocarbonetos; para isso, se faz necessário a elucidação das vias metabólicas de degradação microbiana para compreender os processos de biodegradação natural destes compostos no solo, além de favorecer a cinética de transformação e incorporação dos produtos no ciclo biogeoquímico do carbono (IWAI et al., 2005).

Mais recentemente, os mesmos autores produziram microcosmos para crescimento de consórcios microbianos a partir de vários tipos de solo, distintos em relação ao sistema de uso da terra, além de solos contaminados com petróleo (IWAI et al., 2008). Os microcosmos variaram em função da quantidade de benzeno adicionado. As sequências dos clones obtidos a partir do enriquecimento permitiram a construção de sondas para microarranjos moleculares, onde os autores puderam monitorar alterações na população de degradadores em relação ao aumento da concentração do poluente. Paralelamente, os novos *primers* (sondas) permitiram a obtenção de sequências de genes catabólicos ainda não descritas para este substrato.

Técnicas moleculares avançadas como o SIP (do inglês, *Stable Isotope Probing*), que envolve o uso de isótopos estáveis de carbono ou nitrogênio como traçadores da comunidade microbiana metabolicamente ativa, podem ser utilizadas para determinar se a diversidade de bactérias degradadoras de HPAs em um solo altamente contaminado é afetada pela adição de exsudatos radiculares de plantas (CÉBRON et al., 2010). Esta técnica também se baseia na construção de microcosmos contendo o solo ou o sedimento, juntamente com o substrato marcado com o isótopo estável, cujo peso molecular difere do natural e pode ser detectado

após a extração do DNA genômico do solo, permitindo a identificação da comunidade funcional ativa no processo de mineralização do composto.

As culturas de enriquecimento podem ainda ser utilizadas como inoculantes ambientais para aumentar a velocidade e o rendimento de processos biológicos (bioestimulação), uma vez que as interações planta-micro-organismo constituem um tópico muito importante na ecologia de restauração de sistemas biológicos (VENOSA et al., 1996; HARRIS, 2009). A utilização de inoculantes microbianos para plantas compõe uma abordagem segura para promover o crescimento vegetal e os processos de fitorremediação de ambientes contaminados (GERMAINE et al., 2006).

Neste contexto, o desenvolvimento de técnicas de enriquecimento baseadas em isolamento de consórcios bacterianos com habilidade de colonizar e degradar compostos aromáticos poluentes no sistema do solo pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias para recuperação de ambientes, que devem compreender principalmente o restabelecimento da diversidade da microbiota e a remediação de ecossistemas impactados. O primeiro passo nesta promissora direção consiste no isolamento e identificação de componentes microbianos estruturais e funcionais envolvidos nos processos de biossíntese e biodegradação, principalmente onde há elevados níveis de diversidade genética de micro-organismos, como os solos de Terra Preta de índio da Amazônia e o carvão pirogênico (TSAI et al., 2003).

1.1.5 Técnicas moleculares para estudos de diversidade funcional microbiana

Os microrganismos representam as formas de vida mais abundantes do planeta e detêm a maior proporção da diversidade genética global estimada. A microbiota dos solos é responsável por transformações fundamentais nos ciclos biogeoquímicos, reciclando a matéria orgânica, degradando xenobiontes, fixando N_2 atmosférico e produzindo gases relacionados ao efeito estufa, entre outras transformações conhecidas e muitas ainda por serem descobertas. A microbiota do solo está também associada à formação e manutenção da estabilidade de agregados, pela produção de proteínas e polissacarídeos extracelulares, e pode ser fator determinante no controle da diversidade vegetal e de outros organismos que vivem acima do solo (LAMBALIS et al., 2005).

Algumas alterações na estrutura ou nas atividades de comunidades microbianas podem ter efeitos significativos sobre a estabilidade e o funcionamento dos ecossistemas (McGRADY-STEED et al., 1997). Os processos bioquímicos que ocorrem nos solos são definidos em função da organização destas comunidades, que constituem a chave para o funcionamento do sistema solo-planta. Contudo, as relações entre a estrutura das comunidades microbianas e as atividades bioquímicas que ocorrem nos solos são pouco conhecidas, dificultando a plena compreensão dos mecanismos que regulam o funcionamento dessas comunidades.

A falta de conhecimento sobre a diversidade microbiana em amostras ambientais deve-se em grande parte aos métodos tradicionalmente utilizados para o isolamento e cultivo de micro-organismos em laboratório (RANJARD et al., 2000). Amann et al. (1995) sugerem que apenas uma pequena fração dos organismos na natureza, ao redor de 0,1% ou no máximo 10% do total da população, é cultivável através do uso de técnicas microbiológicas tradicionais, deixando uma vasta porção dessa biota desconhecida e não estudada.

A técnica de construção e sequenciamento de bibliotecas de clones é uma ferramenta de alta sensibilidade no estudo de comunidades microbianas (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005), e a maioria dos trabalhos utiliza como alvo os genes ribossomais, com posterior comparação entre genótipos de micro-organismos presentes em diferentes amostras e determinação da estrutura das comunidades da microbiota do solo. No entanto, o estudo destes genes não fornece dados sobre a funcionalidade metabólica de grupos microbianos no ambiente avaliado. Diversos grupos funcionais de micro-organismos têm sido estudados por meio da clonagem e sequenciamento de *amplicons* provenientes de DNA de amostras ambientais e, nesse sentido, novos genes vêm sendo utilizados em estudos de ecologia molecular, sendo alvo para o desenvolvimento de *primers* específicos, que permitem o estudo da diversidade e papel do grupo funcional no ambiente, seja por meio de *fingerprint* ou por sequenciamento de bibliotecas de clones.

A técnica de produção de bibliotecas metagenômicas contendo genes funcionais (metagenoma gene-específico, IWAI et al., 2010) consiste de uma abordagem alternativa para a caracterização de comunidades microbianas complexas relacionadas a um processo específico. O método consiste na amplificação de um fragmento específico do gene de interesse, na clonagem em vetor apropriado e no sequenciamento dos insertos. Após o sequenciamento dos clones contendo o gene funcional de amostras ambientais, uma grande

quantidade de informações é gerada, na forma de sequências de nucleotídeos, que precisam ser editadas para remoção de contaminações do vetor de clonagem e de bases de baixa qualidade, para posteriormente serem utilizadas em estudos de filogenia e funcionalidade (LAMBAIS et al., 2005).

O tratamento de grandes quantidades de dados exige uma abordagem sistemática e automatizada, havendo necessidade de algoritmos específicos associados a programas de bioinformática para geração do agrupamento e alinhamento múltiplo, com posterior análise das relações filogenéticas entre os dados gerados. A etapa mais limitante para a determinação dos grupos constituídos por sequências similares entre si é a definição do limite de dissimilaridade entre grupos diferentes, já que não existe consenso na literatura sobre o grau de similaridade entre as sequências da maioria dos genes funcionais para definir as Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) ou, no caso da maioria dos genes funcionais, as Famílias Protêicas Operacionais (FPOs).

Kemp e Aller (2004) relatam que a maioria dos estudos considera uma similaridade mínima de 97% entre sequências do gene 16S rRNA para distinguir diferentes UTOs; no entanto, particularidades de determinados grupos microbianos devem ser consideradas, como no caso das enzimas dioxigenases, que constituem genes não constitutivos, altamente sujeitos a mutações e recombinação gênica, além de sofrerem transferência horizontal intra e interespecífica.

Nos estudos de dioxigenases para degradação de compostos aromáticos, os valores de *cutoff* descritos na literatura apresentam valores altamente variáveis. Marcos et al. (2009) avaliaram amostras de sedimento marinho subantártico, onde utilizaram 86,7% de similaridade entre as sequências do mesmo grupo para realizar as análises de diversidade do gene funcional de dioxigenases utilizando o software DOTUR (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005), por considerarem que este limiar é adequado para sequências altamente conservadas do gene, com o objetivo de agrupar filotipos estreitamente relacionados, sem perda de informações potencialmente valiosas pela inclusão de sequências distintas filogeneticamente.

Em um trabalho mais recente, a técnica de pirosequenciamento foi utilizada para determinação da diversidade funcional do gene *bph* em solos contaminados com bifenilos policlorinados (IWAI et al., 2010). Os autores utilizaram um valor de *cutoff* de 0,6 para realizar o agrupamento entre as sequências do mesmo grupo ao nível de aminoácido, considerando a formação de um número gerenciável de *clusters* para realizar as análises e a

interpretação dos resultados, uma vez que a técnica gera uma quantidade muito grande de dados.

O desenvolvimento do sequenciamento de DNA teve impacto crucial sobre as ciências biológicas e biomédicas e, desde seu advento na década de 70 (SANGER et al., 1977), assumiu um papel importante em muitos campos científicos. A técnica é utilizada em áreas muito distintas, como a biologia molecular, a genética, a biotecnologia, a farmacologia, a ciência forense, e mesmo na arqueologia e antropologia. Dadas as novas descobertas que continua a gerar, o sequenciamento de DNA vai continuar a revolucionar os fundamentos conceituais de muitas ciências (FRANCA et al., 2002).

Técnicas moleculares envolvendo sequenciamento em larga escala, como o pirosequenciamento (454 Life Sciences, Roche, EUA), possibilitam a geração de um número muito maior de sequências do gene-alvo, uma vez que aumentam a amostragem de sequências de DNA em várias ordens de grandeza, permitindo a detecção mais precisa dos membros menos abundantes e raros das comunidades microbianas.

A tecnologia de pirosequenciamento constitui um método alternativo para o sequenciamento de segmentos curtos de DNA (RONAGHI, 2001). Embora a técnica tenha certas limitações, como o comprimento relativamente pequeno das sequências geradas, é um método rápido com tempo real de leitura, altamente propício para o sequenciamento de trechos curtos de DNA. Ao contrário do sequenciamento de Sanger, a preparação das amostras antes da análise também é relativamente rápida e os custos são menores, sendo que os reagentes são consideravelmente menos onerosos quando comparado com o sequenciamento tradicional, que se baseia principalmente na construção de bibliotecas genômicas e clonagem do gene-alvo (GHARIZADEH et al., 2002).

Até pouco tempo atrás, a maioria dos estudos de ecologia microbiana baseava-se principalmente na construção de bibliotecas de genes 16S rRNA e posterior sequenciamento do maior número possível de clones únicos da comunidade. Contudo, os custos elevados para a construção das bibliotecas genômicas, a manutenção dos clones e o sequenciamento baseado no método de Sanger, frequentemente limitam o número de sequências produzidas. A detecção dos *taxa* com abundância inferior exige a produção e o sequenciamento de um número muito maior de clones do que as quantidade geralmente descritas na literatura (HUSE et al., 2007).

Neste contexto, técnicas recentes de sequenciamento de DNA como o pirosequenciamento permitem analisar centenas de milhares de seqüências distintas de uma mesma amostra em um curto espaço de tempo. Esta tecnologia tem sido utilizada recentemente com a finalidade de explorar a extensa diversidade microbiana nos mais variados ambientes (HALL, 2007). A nova geração de sequenciadores realiza a leitura do DNA em tempo real e se baseia na técnica de detecção de pirofosfato (PPi) liberado durante a síntese de DNA. Em uma seqüência de reações enzimáticas, a luz visível emitida é utilizada na detecção do nucleotídeo incorporado à seqüência de DNA e, assim, o equipamento possibilita o sequenciamento de milhões de bases em poucas horas (RONAGHI, 2001).

Em um trabalho recente, Gharizadeh et al. (2006), apresentaram resultados relativos à comparação entre o sequenciamento pelo método de Sanger e a tecnologia de sequenciamento em larga escala. Os autores sugerem que a técnica de pirosequenciamento é altamente favorável em relação à redução do tempo de preparo da amostra, facilidade de utilização e economia de custos e de trabalho, embora as taxas de erro de sequenciamento sejam compatíveis para as ambas as tecnologias. Em função do comprimento das seqüências obtidas, a técnica de Sanger ainda constitui boa opção para o sequenciamento de longos trechos de DNA. Ainda que a técnica de pirosequenciamento apresente desafios relativos ao desenvolvimento de softwares para análise de grandes quantidades de seqüências, a acurácia dos resultados pode ser aumentada em pelo menos 90% em relação ao método tradicional, principalmente em relação à amostragem de grupos raros e menos abundantes presentes no ambiente, o que torna a técnica conveniente para uso em diferentes campos científicos.

O estudo da diversidade microbiana nos solos é essencial tanto para a definição de estratégias para preservação de biomassa quanto para o desenvolvimento de sistemas indicadores de alterações ambientais associadas a distúrbios, como a presença de poluentes ou a utilização não sustentável de solos agrícolas, principalmente na região amazônica. De maneira geral, verifica-se que a organização e o funcionamento das comunidades microbianas governam as transformações bioquímicas que ocorrem no solo e a diversidade genética destas comunidades e sua relação com os processos biogeoquímicos definem a diversidade funcional dos ecossistemas (LAMBAIS et al., 2005)

Além disso, o conhecimento dos recursos genéticos da microbiota dos solos pode contribuir para a descoberta de genes codificando novas enzimas ativas em condições ambientais extremas, além de peptídeos com atividades de interesse biotecnológico. Nesse

sentido, um dos primeiros passos para a caracterização de um ecossistema é a descrição dos organismos que o habitam, gerando informações que permitam estimar a diversidade das comunidades e sua relação com as funções e a estabilidade do ambiente (VALINSKY et al., 2002).

Dentro deste contexto reside a importância de se desenvolver estudos incluindo o uso de técnicas moleculares para avaliar a microbiota dos solos TPI e do carvão pirogênico, como a construção de bibliotecas contendo genes funcionais envolvidos em atividades metabólicas e nos ciclos biogeoquímicos, como as dioxigenases aromáticas, quanto o sequenciamento em larga escala de genes catabólicos, que permite acessar mais detalhadamente a diversidade microbiana de sistemas biológicos. Os dados robustos gerados a partir destas análises podem favorecer a compreensão das bases evolutivas da variabilidade genética da microbiota de solos TPI e do carvão pirogênico, além de prover dados que poderão servir como base para estudos envolvendo a bioprospecção de genes de interesse comercial, como produtos da indústria farmacêutica e, principalmente, daqueles envolvidos em processos de biorremediação de ambientes contaminados.

REFERÊNCIAS

- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 59, p. 143–169, 1995.
- BALDWIN, B.R.; NAKATSU, C.H.; NIES, L. Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 3350-3358, 2003.
- BAMFORTH, S.M.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, Oxford, v. 80, n. 7, p. 723-736, 2005.
- BARRIAULT, D.; DURAND, J.; MAAROUFI, H.; ELTIS, L.D.; SYLVESTRE, M. Degradation of polychlorinated biphenyl metabolites by naphthalene-catabolizing enzymes. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, n. 12, p. 4637-4642, 1998.
- BENITES, V.M.; TEIXEIRA, W.G.; REZENDE, M.E.; PIMENTA, A.S. Utilização de carvão e subprodutos da carbonização vegetal na agricultura: aprendendo com as Terras Pretas de Índio. In: TEIXEIRA, W.G.; KERN, D.C.; MADARI, B.E.; LIMA, H.N.; WOODS, W. (Ed.). **As terras pretas de índio da Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009. p. 285-296.
- BENITES, V.M.; MENDONÇA, E.S.; SCHAEFER, C.E.G.R.; NOVOTNY, E.H.; REIS, E.L.; KER, J.C. Properties of black soil humic acids from high altitude rocky complexes in Brazil. **Geoderma**, Amsterdam, v. 127, p. 104-113, 2005.
- BORNEMAN, J.; SKROCH, P.W.; O'SULLIVAN, K.M.; PALUS, J.A.; RUMJANEK, N.G.; JANSEN, J.L.; NIENHUIS J.; TRIPLETT, E.W. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 62, n. 6, p. 1935-1945, 1996.
- BOSSERT, I.; BARTHA, R. The fate of petroleum in marine ecosystems. In: ATLAS, R.M. (Ed.). **Petroleum microbiology**. New York: Macmillan Publishing, 1984. p. 434-476.
- BRITTON, L.N. Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. In: GIBSON, D.T. (Ed.). **Microbial degradation of organic compounds**. New York: Marcel Dekker, 1984. p. 89-129.
- CANNAVAN, F.S. **Diversidade das comunidades bacterianas em solos de Terra Preta Antropogênica da Amazônia Central e Oriental**. 2007. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- CERNIGLIA, C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 3, p. 351-368, 1992.
- CHADHAIN, S.M.N.; NORMAN R.S.; PESCE, K.V.; KUKOR, J.J.; ZYLSTRA, G.J. Microbial dioxygenase gene population shifts during polycyclic aromatic hydrocarbon

biodegradation. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 72, n. 6, p. 4078–4087, 2006.

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

COSTA, M.L.; CARMO, M.S.; OLIVEIRA, E.C.; LIMA, H.; KERN, D.C.; GOESKE, J. A mineralogia e composição química de fragmentos de cerâmicas arqueológicas em sítios de Terra Preta de Índio. In: TEIXEIRA, W. G.; KERN, D. C.; MADARI, B.E.; LIMA, H.N.; WOODS, W. (Ed.). **As terras pretas de índio da Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009. 420p.

ENTCHEVA, P.; LIEBL, W.; JOHANN, A.; HARTSCH, T.; STREIT, W.R. Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, p. 89–99, 2001.

FERREIRA, L. C. **Aspectos bioquímicos e moleculares de bactérias isoladas de Terra Preta Antropogênica (TPA) na região da Amazônia Brasileira**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

FLOODGATE, G. The fate of petroleum in marine ecosystems. In: ATLAS, R.M. (Ed.). **Petroleum microbiology**. New York: Macmillan Publishing, 1984. p. 355-398.

FRANCA, L.T.; CARRILHO, E.; KIST, T.B. **Q. Rev. Biophys.** 2002;35:169–2002.

GALVAO, T.; MOHN, W.W.; DE LORENZO, V. Exploring the microbial biodegradation and biotransformation gene pool. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 23, p. 497–506, 2005.

GENTRY, A.H. Tree species richness of upper Amazonian forests. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 85, p. 156-159, 1988.

GERMAINE, K.; LIU, X.; GARCIA-CABELLOS, G.; HOGAN, J.; RYAN, D.; DOWLING, D. Bacterial endophyte-enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, p. 302-310, 2006.

GHARIZADEH, B.; NORDSTROM, T.; AHMADIAN, A.; RONAGHI, M.; NYREN, P. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 301, p. 82–90, 2002.

GLASER, B. Prehistorically modified soils of central Amazonia: a model for sustainable agriculture in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 362, p. 187–196, 2007.

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

GLASER, B.; GUGGENBERGER, G.; ZECH, W.; RUIVO, M.L. Soil organic matter stability in Amazonian Dark Earths. In: LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GLASER, B.; WOODS, W.I. (Ed.). **Amazonian Dark Earths: Origin, properties, management**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 141–158.

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

GLASER, B.; LEHMANN, J.; ZECH, W. Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soil in the tropics with charcoal – a review. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 35, p. 219-230, 2002.

HALL, N. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 209, p. 1518-1525, 2007.

HARRIS, J. Soil microbial communities and restoration ecology: facilitators or followers? **Science**, Washington, DC, v. 325, p. 573–574, 2009.

HEAD, I.M. Bioremediation: towards a credible technology. **Microbiology**, Reading, v. 144, p. 599-608, 1998.

HECKENBERGER, M.J.; PETERSON, J.B.; NEVES, E.G. Village size and permanence in Amazonia: two archaeological examples from Brasil. **Latin American Antiquity**, Washington, DC, v. 10, p. 535-576, 1999.

HUSE, S.; HUBER, J.; MORRISON, H.; SOGIN, M.; WELCH, D. Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. **Genome Biology**, London, v. 8, p. 143, 2007. Disponível em: <http://genomebiology.com/content/pdf/gb-2007-8-7-r143.pdf>.

IWAI, S.; YAMAZOE, A.; TAKAHASHI, R.; KURISU, F.; YAGI, O. Degradation of Monochlorinated Dibenzo-p-Dioxins by Janibacter sp. Strain YA Isolated from River Sediment. **Current Microbiology**, New York, v. 51, p. 353–358, 2005.

IWAI, S.; KURISU, F.; URAKAWA, H.; YAGI, O.; KASUGA, I.; FURUMAI, H. Development of an oligonucleotide microarray to detect di- and monooxygenase genes for benzene degradation in soil. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 285, p. 111–121, 2008.

IWAI, S.; CHAI, B.; SUL, W.J.; COLE, J.R.; HASHSHAM, S.A.; TIEDJE, J.M. Gene-targeted-metagenomics reveals extensive diversity of aromatic dioxygenase genes in the environment. **The ISME Journal**, London, v. 4, p. 279-285, 2010.

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

KEMP, P.F.; ALLER, J.Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 47, p. 161-177, 2004.

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

KERN, D.C.; COSTA, M.L. Os solos antrópicos. In: LISBOA, P.L.B. (Org.). **Caxiuanã**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1997. p. 105-119.

KERN, D.C.; D'AQUINO, G.; RODRIGUES, T.E.; FRAZÃO, F.J.L.; SOMBROEK, W.; NEVES, E.G. Distribution of Amazonian Dark Earths. In: LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GLASER, B.; WOODS, W.I. (Ed.). **Amazonian Dark Earths: Origin, properties & management**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 1-45.

KIM, J.S.; CROWLEY, D.E. Microbial diversity in natural asphalts of the Rancho La Brea Tar Pits. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 73, n. 14, p. 4579-4591, 2007.

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

KUMAMARU, T.; SUENAGA, H.; MITSUOKA, M.; WATANABE, T.; FURUKAWA, K. Enhanced degradation of polychlorinated biphenyls by directed evolution of biphenyl dioxygenase. **Nature Biotechnology**, New York, v. 16, n. 7, p. 663-666, 1998.

LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.R.; BÜLL, R.C. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa, v. 4. p. 43-84, 2005.

LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 54, n. 3, p. 305-315, 1990.

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

LIANG, B.; LEHMANN, J.; SOLOMON, D.; KINYANGI, J.; GROSSMAN, J.; O'NEILL, B.; SKJEMSTAD, J.O.; THIES, J.; LUIZÃO, F.J.; PETERSEN, J.; NEVES, E.G. Black carbon increases cation exchange capacity in soils. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 70, p. 1719–1730, 2006.

MACCORMACK, W.P.; FRAILE, E.R. Characterization of a hydrocarbon degrading psychrotrophic Antarctic bacterium. **Antarct Science**, Cambridge, v. 9, p. 150–155, 1997.

MADARI, B.E.; COSTA, A.R.; CASTRO, L.M.; SANTOS, J.L.S.; BENITES, V.M.; ROCHA, A.D.O.; MACHADO, P.L.O.A. **Carvão vegetal como condicionador de solo para arroz de terras altas (cultivar Primavera): um estudo prospectivo**. Santo Antonio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. 6 p. (Comunicado Técnico, 125).

- MADARI, B.E.; CUNHA, T.J.F.; NOVOTNY, E.H.; MILORI, D.M.B.P.; NETO, L.M.; BENITES, V.M.; COELHO, M.R.; SANTOS, G.A. Matéria orgânica dos solos antrópicos da Amazônia (Terra Preta de Índio): suas características e papel na sustentabilidade da fertilidade do solo. In: TEIXEIRA, W.G.; KERN, D.C.; MADARI, B.E.; LIMA, H.N.; WOODS, W. (Ed.). **As terras pretas de índio da Amazônia**: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009. 420p.
- McCANN, J.M.; WOODS, W.I.; MEYER, D.W. Organic matter and anthrosols in Amazonia: interpreting the Amerindian legacy. In: REES, R.M., BALL, B.C., CAMPBELL, C.D., WATSON, C.A. (Ed.). **Sustainable management of soil organic matter**. Wallingford, UK: CAB International, 2001. p. 180-189.
- McGRADY-STEED, J.; HARRIS, P.M.; MORIN, P.J. Biodiversity regulates ecosystem predictability. **Nature**, London, 390:162-165, 1997.
- MEGGERS, B.J. **Amazonia**: man and culture in a counterfeit Paradise [1971]. Washington, DC: Smithsonian Institution Press, 1996.
- MISHRA, V.; LAL, R.; SRINIVASAN, V. Enzymes and operons mediating xenobiotic degradation in Bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 27, n. 2, p. 133-166, 2001.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. 626 p.
- NEVES, E.G.; PETERSEN, J.B.; BARTONE, R.N.; SILVA, C.A. The historical and social origins of Amazonian Terras Pretas. In: LEHMAM, J.; KERN, D.C.; GLASER, B.; WOODS, W.I. (Ed.). **Amazonian dark earths**: Origin, properties & management. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 1-45.
- PETERSEN, J.B.; NEVES, E.G.; HECKENBERGER, M.J. Gift from the past: terra preta and prehistoric Amerindian occupation in Amazonia. In: McEWAN, C.; BARRETO, C.; NEVES, E. (Ed.). **Unknown Amazon**: Culture in nature in ancient Brazil. London: The British Museum Press, 2001. p. 86-105.
- PICCOLO, A.; PIETRAMELLARA, G.; MBAGWU, J.S.C. Effects of coal-derived humic substances on water retention and structural stability of Mediterranean soils. **Soil Use and Management**, Malden, v. 12, p. 209-213, 1996.
- PIETIKAINEN, J.; KIIKKILA, O.; FRITZE, H. Charcoal as a habitat for microbes and its effect on the microbial community of the underlying humus. **Oikos**, Kobenhavn, v. 89, p. 231-242, 2000.
- RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiol.**, Paris, v. 151, p. 167-177, 2000.
- RONHAGI, M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. **Genome Research**, Woodbury, v. 11, p. 3-11, 2001.

ROSCOE, R.; BUURMAN, P.; VELTHORST, E.J.; VASCONCELLOS, C.A. Soil organic matter dynamics in density and particle size fractions as revealed by the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio in a Cerrado's oxisol. **Geoderma**, Amsterdam, v. 104, p. 185-202, 2001.

SABGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v.74, p.5463-5467, 1977.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, T.; MANIATIS. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed. Woodbury: Cold spring Harbor Laboratory Press, 1989. p. 1.25-1.30.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 74, p. 5463–5467, 1977.

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

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

SIMPSON, M.J.; HATCHER, P.G. Overestimates of black carbon in soils and sediments. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 91, p. 436-440, 2004.

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

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

SOUZA, L.F.; MADARI, B.; BENITES, V.M.; CUNHA, T.J.; NEVES, E.G. Relação entre a fertilidade e as substâncias húmicas numa terra preta da Amazônia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29., 2003, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: SBCS, 2003. 1 CD-ROM.

STEINER, C.; TEIXEIRA, W.G.; LEHMANN, J.; ZECH, W. Microbial response to charcoal amendments of highly weathered soils and Amazonian Dark Earths in Central Amazonia - Preliminary results. In: GLASER, B.; WOODS, W.I. (Ed.). **Amazonian Dark Earths**: explorations in space and time. Heidelberg: Springer Verlag, 2004. p. 195-212.

TAMM, C.O. **Nitrogen in terrestrial ecosystems**. Berlin: Springer, 1991.

TEIXEIRA, W.G.; MARTINS, G.C.; MACEDO, R.S.; NEVES-JUNIOR, E.F.; MOREIRA, A.; BENITES, V.M.; STEINER, C. As propriedades físicas e hídricas dos horizontes antrópicos das Terras Pretas de Índio na Amazônia Central. In: TEIXEIRA, W.G.; KERN, D.C.; MADARI, B.E.; LIMA, H.N.; WOODS, W. (Ed.). **As Terras Pretas de Índio da**

Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009. 420 p.

TSAI, S.M.; CANNAVAN, F.S.; SILVA JUNIOR, J.P.; CHAVES, M.G.; PASSIANOTO, C.C.; BORGES, C.P. Diversidade bacteriana em terra preta de índio baseada em sequenciamento do gene 16S rRNA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29., 2003, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: SBCS, 2003. 1 CD-ROM.

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

UNEP - UNITED ENVIRONMENTAL PROGRAMME. **Determinations of petroleum hydrocarbons in sediments:** reference methods for marine pollution studies. Geneva, 1991. 97 f.

VALINSKY, L.; VEDOVA, G.D.; SCUPHAM, A.J.; ALVEY, S.; FIGUEROA, A.; YIN, B.; HARTIN, R.J.; CHROBAK, M.; CROWLEY, D.E.; JIANG, T.; BORNEMAN, J. Analysis of bacterial community composition by oligonucleotide fingerprinting of rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, p. 3243-3250, 2002.

VENOSA, A.D.; SUIDAN, M.T.; WRENN, B.A.; STROHMEIER, K.L.; HAINES, J.R.; EBERHART, B.L.; KING, D.; HOLDER, E. Bioremediation of an experimental oil spill on the shoreline of Delaware Bay. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 30, p. 1764-1775, 1996.

WACKETT, L.P. Evolution of enzymes for the metabolism of new chemical inputs into the environment. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, p. 41259-41262, 2004.

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

WILSON, M.S.; BAKERMANS, C.; MADSEN, E.L. In Situ, Real-Time Catabolic Gene Expression: Extraction and Characterization of Naphthalene Dioxygenase mRNA Transcripts from Groundwater. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 80-87, 1999.

WILSON, S.C.; JONES, K.C. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. **Environmental Pollution**, London, v. 81, p. 229-249, 1993.

YAKIMOV, M.M.; GIULIANO, L.; GENTILE, G.; CRISAFI, E.; CHERNIKOVA, T.N.; ABRAHAM, W-R.; L'UNSDORF, H.; TIMMIS, K.N.; GOLYSHIN, P.N. *Oleispira antarctica* gen. nov., sp. nov., a novel hydrocarbonoclastic marine bacterium isolated from Antarctic coastal sea water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p. 779-785, 2003.

2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS POTENCIALMENTE DEGRADADORAS DE COMPOSTOS AROMÁTICOS EM SOLOS DE TERRA PRETA DE ÍNDIO DA AMAZÔNIA

RESUMO

As atividades da microbiota do solo são essenciais para a ciclagem da matéria orgânica, podendo contribuir para a alteração da disponibilidade de nutrientes e elementos tóxicos no solo, a concentração de gases associados ao efeito estufa na atmosfera, bem como para a alteração dos atributos físicos dos solos. O objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar geneticamente bactérias potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos em solos de quatro sítios de Terra Preta de Índio da Amazônia, Brasil. Para isto, utilizou-se uma combinação de métodos cultivo-dependentes, como o isolamento a partir do enriquecimento em meio seletivo, juntamente com técnicas moleculares aplicadas ao estudo das populações de bactérias isoladas do ambiente, incluindo a detecção e o sequenciamento de genes 16S rRNA. Foram obtidos 100 isolados para cada sítio de TPI analisado, num total de 400. A distribuição dos gêneros bacterianos encontrados em cada sítio de TPI foi bastante heterogênea, sendo que alguns isolados foram altamente similares a bactérias derivadas de clones ambientais. Gêneros bacterianos como *Pseudomonas*, que são micro-organismos altamente adaptados e amplamente distribuídos na maioria dos ambientes, foram encontrados em todos os quatro solos de TPI analisados. Alguns gêneros, como por exemplo *Ochrobactrum* e *Starkeya*, foram isolados somente a partir de solo do Caldeirão sob capoeira. Paralelamente, os gêneros *Achromobacter*, *Caulobacter* e *Cellulomonas* foram isolados somente a partir do solo TPI Caldeirão-Cultivado, e isolados de *Gordonia* foram encontrados exclusivamente no Hatahara. Os resultados demonstraram o imenso potencial das bactérias dos solos de TPI para processos de importância biotecnológica. A natureza bastante singular destes solos, com elevada quantidade de carvão pirogênico, pode favorecer o desenvolvimento de novas vias metabólicas a partir dos micro-organismos, com capacidade competitiva em ações de biorremediação e biodegradação de ambientes impactados.

Palavras-chave: *Bacteria*, Isolamento, microcosmos, 16S rRNA

ABSTRACT

Soil microbial activities are essential for the organic matter cycling, contributing to the availability of nutrients and changing the availability of toxic elements in soil as well as the concentration of greenhouse gases in the atmosphere and modifying the soils physical attributes. The aim of this study was to isolate and characterize potentially hydrocarbon degrading bacteria from four Amazonian Dark Earth (ADE) sites in the Central Amazon, Brazil. a combination of cultivation-dependent methods were used, such as enrichment and isolation, together with molecular techniques applied to study populations of bacteria isolated from the environment, including the detection and sequencing of 16S rRNA gene. One-hundred isolates were obtained for each ADE site, in a total of 400. The distribution of bacterial genera found at each ADE site was quite heterogeneous, with some isolates highly similar to bacterial environmental clones. Bacterial genera such as *Pseudomonas*, which are highly adapted micro-organisms widely distributed in most environments, were found in all four ADE soils analyzed. Some bacteria such as *Ochrobactrum* and *Starkeya* were isolated only from the *Caldeirão Experimental Station* under secondary forest. In addition, *Achromobacter*, *Caulobacter* and *Cellulomonas* were isolated only from the *Caldeirão* site under agriculture cover, as well as *Gordonia* isolates, which were found exclusively in Hatahara. The results demonstrated the enormous potential of ADE soil bacteria for biotechnological applications. The quite unique nature of these soils with high amount of pyrogenic black carbon can promote the development of new microbial pathways, with competitive ability for bioremediation and biodegradation activities regarding impacted environments.

Keywords: *Bacteria*, Isolation, microcosm, 16S rRNA

2.1 INTRODUÇÃO

Os micro-organismos são altamente eficientes e versáteis em sua capacidade de degradar hidrocarbonetos (HEAD et al., 2006). A microbiota com capacidade de biodegradar hidrocarbonetos poliaromáticos, monoaromáticos e hidrocarbonetos alifáticos é relativamente fácil de isolar, particularmente a partir de ambientes contaminados com petróleo (NAIR et al., 2008). O isolamento de bactérias que degradam hidrocarbonetos foi realizado pela primeira vez há quase um século, e uma revisão recente enumera 79 gêneros bacterianos que podem usar hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia. A maioria do nosso conhecimento sobre a diversidade intra-espécie de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos é baseada em apenas parte destes gêneros, geralmente os mais abundantes, tais como *Pseudomonas* (BHATTACHARYA et al., 2003), *Acinetobacter* (WHYTE et al., 1997), *Sphingomonas* (LEYS et al., 2004), *Mycobacterium* (LEYS et al., 2005) e *Rhodococcus* (IRVINE et al., 2000).

A manutenção da diversidade dos micro-organismos no ambiente está baseada principalmente em sua notável versatilidade metabólica e adaptabilidade genética (KURTBOKE et al., 2004), o que os torna uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento sustentável. Os micro-organismos têm papel essencial nos ciclos biogeoquímicos, dos quais muitos aspectos ainda são pouco conhecidos, muito embora exista um entendimento dos mecanismos gerais que controlam cada ciclo.

As atividades da microbiota do solo são essenciais para a ciclagem da matéria orgânica, a formação do húmus, a nitrificação e a fixação biológica do N₂, entre outros processos, os quais podem contribuir para a alteração da disponibilidade de nutrientes e elementos tóxicos no solo, a concentração de gases associados ao efeito estufa na atmosfera, bem como para a alteração dos atributos físicos dos solos. Nesse sentido, novos isolados bacterianos e novas vias metabólicas microbianas têm sido constantemente descritas, e tem contribuindo, portanto, para um melhor entendimento da dinâmica dos ciclos do C, N, Fe, Mn e As (NEUBAUER et al., 2002; OREMLAND; STOLZ, 2003).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar geneticamente bactérias potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos em solos de Terra Preta de Índio da Amazônia, Brasil. Para isto, utilizou-se uma combinação de métodos cultivo-dependentes,

como o isolamento a partir do enriquecimento em meio seletivo, juntamente com técnicas moleculares aplicadas ao estudo das populações de bactérias isoladas do ambiente, incluindo a detecção e o sequenciamento de genes 16S rRNA, para a identificação dos gêneros com potencial de degradação de hidrocarbonetos aromáticos. Estes dados podem gerar informações sobre a medida da participação destes micro-organismos na manutenção da resiliência da fertilidade dos solos de TPA, na estabilidade da matéria orgânica e na conservação das características físico-químicas favoráveis à agricultura sustentável na região amazônica.

2.2 Desenvolvimento

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) não são degradados pela maioria dos micro-organismos, devido à complexidade de sua estrutura química e baixa solubilidade em água. Para a seleção dos micro-organismos com comprovada capacidade de degradação destes compostos, faz-se necessário fornecer condições adequadas de disponibilidade de água, de nutrientes inorgânicos, de pH e de temperatura. Os micro-organismos degradadores utilizam vias bioquímicas complexas para transformar os HPAs em intermediários comuns do seu catabolismo e, a partir daí, em fonte de carbono e energia para o seu crescimento (BAMFORTH; SINGLETON, 2005).

O ensaio de enriquecimento foi realizado segundo Ma et al. (2006), com algumas adaptações. Foram preparados microcosmos compostos do meio mínimo Bushnell-Haas (Difco™) adicionado dos hidrocarbonetos naftaleno e fenantreno (em grânulos) em uma mistura a 0,05%, segundo Furukawa et al. (1978). Os hidrocarbonetos foram esterilizados utilizando-se uma solução de NaOH 1M, por filtração, além de exposição por 2 a 3 horas em câmara de fluxo laminar com lâmpada UV.

O bioensaio de enriquecimento utilizando meio mínimo e uma mistura de HPAs como única fonte de carbono teve como principal objetivo selecionar bactérias potencialmente degradadoras presentes em solos de TPI. Este ensaio caracteriza-se pela incubação do solo em meio mínimo contendo hidrocarbonetos aromáticos como única fonte de carbono e energia. Desta forma, espera-se selecionar micro-organismos que possuam no genoma os genes catabólicos responsáveis por processos de biodegradação, através da indução da expressão gênica por meio de uso de substrato indutor.

2.2.1 Material e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, CENA/USP, Piracicaba-SP.

2.2.1.1 Áreas de estudo

Amostras de solos de Terra Preta de Índio foram coletadas em quatro sítios distintos na região central da Amazônia Ocidental (Figura 2.1), situados nas proximidades de Manaus-AM, sendo dois sítios na Estação Experimental do Caldeirão, na Embrapa CPAA (Iranduba-AM), descritos anteriormente como Caldeirão-Capoeira ($03^{\circ}15'11''\text{S} - 60^{\circ}13'43''\text{W}$) e Caldeirão-Cultivado ($03^{\circ}15'09''\text{S} - 60^{\circ}13'42''\text{W}$), além de dois sítios de TPI mais antigos e analisados extensivamente em expedições pedo-arqueológicas, o Costa do Açutuba ($03^{\circ} 05' 53.92''\text{S} - 60^{\circ} 21' 19.90''\text{W}$) e o sítio Hatahara ($03^{\circ} 16' 28.45''\text{S} - 60^{\circ} 12' 17.14''\text{W}$). Estes últimos são caracterizados pelo uso das TPI para atividades antropogênicas intencionais, baseadas em cultivos intensivos em clareiras (DENEVAN, 1998), com atividade agrícola (permanente ou semipermanente) de longa duração, além do sítio Caldeirão-Cultivado, onde são realizados experimentos agrícolas há pelo menos 20 anos. O sítio Caldeirão-Capoeira, entretanto, constitui uma área de floresta secundária sem perturbação há pelo menos 30 anos.

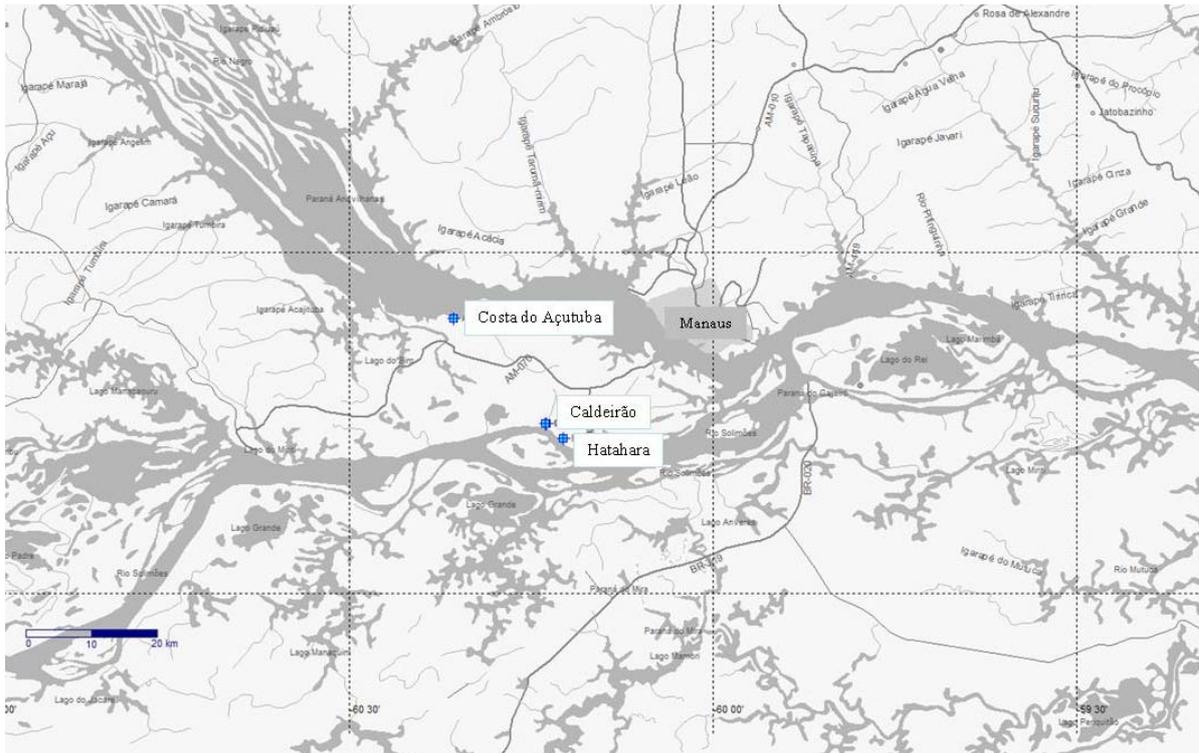


Figura 2.1 - Localização das áreas de coleta dos solos TPI analisados no presente trabalho. Fonte: GPS Trackmaker (<http://www.gpstm.com/>)

2.2.1.2 Amostragem dos solos

Amostras de solo foram coletadas em pontos demarcados nos quatro sítios de TPI, em várias excursões durante os anos de 2009/2010. As amostras de solo foram coletadas em tubos PVC, na profundidade de 0 a 10 cm. Os pontos de coleta foram geo-referenciados (ponto central) e foram coletados mais quatro pontos ao redor de cada ponto central (norte, sul, leste e oeste), com distância de 1,5 metros entre cada ponto. Em seguida, foram coletadas 4 repetições de cada ponto, distantes 30 cm do ponto de coleta. Os tubos foram encaminhados ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura-USP, Piracicaba-SP), sob refrigeração, e mantidos em ultra-freezer a -80°C .

2.2.1.3 Preparo das placas seletivas contendo meio sólido e HPAs

As placas com meio seletivo Bushnell-Haas (Tabela 2.1), utilizadas para o plaqueamento das diluições seriadas obtidas a partir do sub-cultivo de enriquecimento,

foram preparadas pela adição de 1% de ágar em meio líquido, juntamente com 200 µL de uma solução alcoólica de HPAs (naftaleno e fenantreno) a 50ppm (concentração final), e espalhados em cada placa com meio sólido, a fim de produzir um filme de HPAs na superfície, para ser aproveitado como fonte de carbono pelos micro-organismos degradadores (Figura 2.2). Esta concentração foi escolhida para o ensaio por estar dentro dos valores de orientação e intervenção recomendados pela CETESB (www.cetesb.sp.gov.br) para solos agrícolas, residenciais e industriais. Em seguida, as placas foram deixadas abertas em câmara de fluxo laminar por pelo menos uma hora, a fim de evaporar todo o álcool.

Tabela 2.1 - Composição do meio mínimo Bushnell-Haas

Bushnell-Haas (Difco™)	gramas/litro
Sulfato de magnésio	0,2
Cloreto de cálcio	0,02
Fosfato monopotássico	1,0
Fosfato de amônia	1,0
Nitrato de potássio	1,0
Cloreto férrico	0,05

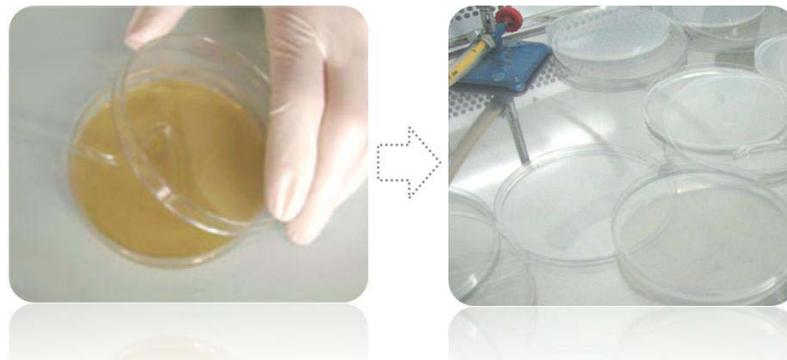


Figura 2.2 - Preparo das placas seletivas contendo o meio mineral e a solução alcoólica de HPAs

2.2.1.4 Produção dos microcosmos para incubação do solo na presença de HPAs

Para produção dos microcosmos contendo o solo e os hidrocarbonetos, foram preparados 50 mL de meio Bushnell-Haas, usado para estudos de utilização microbiana de hidrocarbonetos, e adicionados de um grama de solo, juntamente com uma mistura de naftaleno e fenantreno (em grânulos) em uma concentração final de 0,05% (FURUKAWA

et al., 1978), que foi inserida diretamente no meio. O ensaio foi realizado em triplicata para todos os solos e os microcosmos foram incubados a 30°C sob agitação constante a 300 rpm (Figura 2.3).

Os inóculos iniciais foram mantidos em incubadora por 15 dias e, após este período, um mililitro foi retirado de cada microcosmo para sub-cultivo e adicionado a novo frasco contendo meio de cultura Bushnell-Haas e HPAs, nas mesmas condições citadas anteriormente, por mais 15 dias. Posteriormente, após a sub-cultura, foram feitas diluições em série entre 1×10^1 e 1×10^7 para cada repetição e 200 μ L de cada réplica foram espalhados nas placas contendo o meio seletivo (item 2.2.4), e incubados em estufa a 30°C até aparecimento das colônias.

Em seguida, foram retiradas culturas das placas com diluições onde o crescimento foi de 30 a 300 colônias, com o auxílio de alça de platina e, posteriormente, estas colônias foram novamente inoculadas a 30°C em placas de petri contendo meio Caso-agar (Difco™), para a verificação de possíveis contaminações, que podem ser observadas pelas diferenças morfológicas entre colônias microbianas. As culturas purificadas foram inoculadas em meio Caso-Broth (Difco™) para posterior extração de DNA genômico total e reações de PCR para obtenção de *amplicons* do gene 16S rRNA e consequente sequenciamento e identificação do isolados.

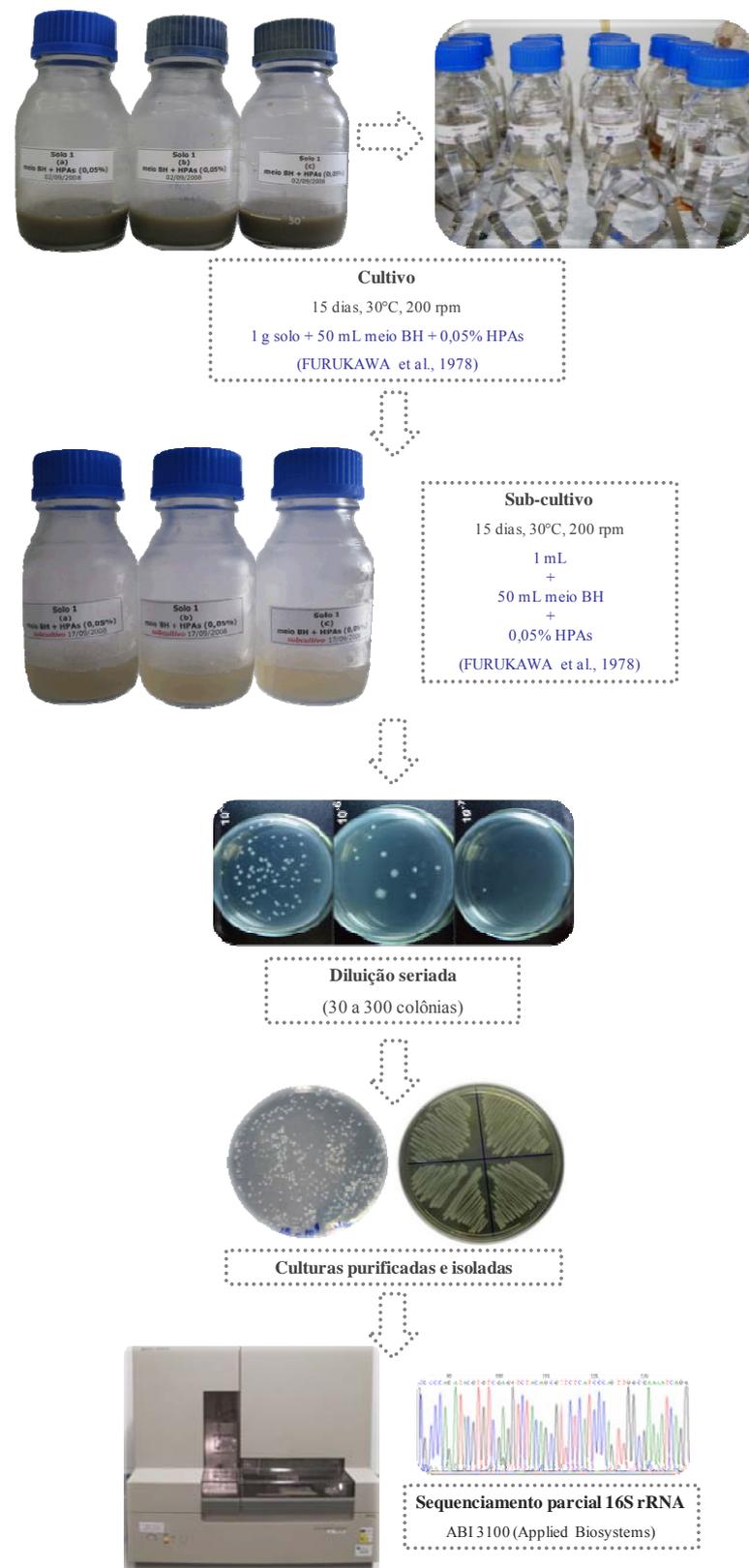


Figura 2.3 - Esquema demonstrativo do ensaio de enriquecimento realizado para o isolamento de degradadores bacteriano a partir de solos TPI

Como controles positivos, foram utilizados as culturas das cepas padrões DSM 6506 e 6899, ambas degradadoras de compostos aromáticos, obtidos do banco de culturas da Alemanha (DSMZ, German Resource Centre for Biological Material, <http://www.dsmz.de/index.htm>), como descritos na Tabela 2.2, nas mesmas condições aplicadas aos solos; para controle negativo, foram incluídos um frasco contendo somente o meio Bushnell-Haas juntamente com a mistura de HPAs, para controle de contaminação dos hidrocarbonetos e do meio, além de frascos contendo somente o meio mínimo e os inóculos bacterianos das cepas padrões DSM 6506 e 6899, para verificação do crescimento bacteriano em meio sem fonte de carbono. Espera-se que o crescimento microbiano em meio Bushnell-Haas sem fonte de carbono seja mínimo ou inexpressivo, segundo orientações do fabricante do meio de cultura.

Tabela 2.2 - Padrões DSM utilizados para o bioensaio e para as caracterizações genéticas

No. DSMZ	Micro-organismo	Metabolismo de hidrocarbonetos
DSM 6506	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Utiliza naftaleno como fonte de carbono
DSM 6899	<i>Pseudomonas putida</i>	Utiliza tolueno como fonte de carbono

2.2.1.5 Caracterização genética dos isolados obtidos pelo enriquecimento

Extração de DNA genômico dos isolados obtidos no enriquecimento

O DNA genômico bacteriano dos isolados obtidos para cada sítio de TPI analisado foi extraído segundo metodologia descrita por SAMBROOK et al. (1989). Após incubação em meio Caso-Broth sob agitação, as suspensões bacterianas foram centrifugadas e lavadas com solução salina (NaCl, 0,85%) e avaliadas por densidade ótica, a fim de alcançar a concentração de 10^9 células/mL. Em seguida, os precipitados foram ressuspensos em TE 50/20 (Tris a 50 mM, pH 8,0 e EDTA- Na_2 a 20 mM, pH 8,0) e adicionou-se às suspensões bacterianas os seguintes reagentes: SDS (sodium dodecyl sulfate) 10%; proteinase K (10 mg/mL, estoque à -20°C); lisozima (5 mg/mL, estoque a -20°C) e RNase (10 mg/mL, estoque à temperatura ambiente), com incubação a 37°C por 1 hora, ou até clarear. Após acrescentar NaCl 5M para uma concentração final de 250 mM e AcONa 5 M para uma concentração final de 300 mM, as amostras foram deixadas em repouso por 1 hora a 4°C , e o sobrenadante foi recolhido após centrifugação por 15 min a 12.000 rpm. Em seguida, adicionou-se, para cada amostra, 2 volumes de etanol absoluto a 95%, para precipitação do DNA. Finalmente, as

amostras foram armazenadas por uma noite a -20°C e, posteriormente, o etanol foi descartado após centrifugação e o precipitado ressuspendido em $50\ \mu\text{L}$ de TE 10/1.

A quantidade de DNA de cada amostra foi verificada após eletroforese em gel de agarose de $8\ \text{cm} \times 10\ \text{cm}$ a 1,0%, submetido a um campo elétrico de 80V por aproximadamente 30 min. A pureza do DNA foi verificada após coloração com brometo de etídio ($0,5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ gel), e como padrão de peso molecular foi utilizado o *100pb DNA Mass Ladder*TM (Invitrogen Life Technologies).

O DNA extraído foi também quantificado em espectrofotômetro, adotando-se a relação de 1,0 densidade ótica a 260 nm (OD 260) como sendo igual a $50\ \text{ng}$ de DNA/ μL (SAMBROOK et al., 1989). Finalmente, foi feita a diluição do material para uma concentração final de $50\ \text{ng}/\mu\text{L}$, que foi utilizada nas reações de PCR.

Amplificação, por técnica de PCR, do gene 16S rRNA dos isolados obtidos no ensaio de enriquecimento

Os DNAs dos isolados foram submetidos à amplificação com *primers* específicos fD1 e rD1, que amplificam em torno de 1500 pares de bases do gene 16S rRNA de *Bacteria*, segundo WEISBURG et al. (1991) (Tabela 2.3). Soluções “mix” foram preparadas para as reações de amplificação contendo os reagentes dNTPs ($0,2\ \text{mM}$ de cada base); tampão 10X (Tris-base a $200\ \text{mM}$, pH 8,4; KCl a $500\ \text{mM}$) (1X); MgCl_2 ($3,0\ \text{mM}$); *Platinum Taq DNA Polymerase* ($1,5\text{U}$); os *primers* (oligonucleotídeos) ($5\ \text{pmol}/\text{reação}$); DNA ($40\ \text{ng}/\text{reação}$), além de água ultra-pura (Milli-Q) para volume final de $25\ \mu\text{L}$. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, 25 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos, além de um ciclo de extensão final de 72°C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1%, com padrão de peso molecular *1 kb DNA Mass Ladder*TM (Invitrogen Life Technologies).

Tabela 2.3 - *Primers* utilizados para detecção e sequenciamento do gene 16S rRNA

<i>Primer</i>	(5'-3')	Referência
fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	WEISBURG et al. (1991)
rD1	AAGGAGGTGATCCAGCC	

Os fragmentos amplificados foram purificados em coluna de matriz de fibra de vidro *GFX™ PCR-DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), ressuspendidos em água ultra-pura (Milli-Q) e quantificados em gel de agarose a 1,0% utilizando o marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder™* (Invitrogen Life Technologies), para verificação do rendimento da purificação.

Sequenciamento parcial do gene 16 rRNA

Para o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, 1 µL do produto purificado (aproximadamente 20 ng) foi utilizado na reação de amplificação com o *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (GE Healthcare) conforme instruções do fabricante, e o *primer* utilizado para amplificação parcial do gene-alvo foi o fD1. As reações de sequenciamento foram feitas nas seguintes condições: 30 ciclos, com desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento do *primer* a 55°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto.

Em seguida, as amostras foram purificadas adicionando-se 2 µL de uma solução de acetato de sódio a 1,5 M/EDTA a 0,25 M e, após homogeneização, adicionou-se 60 µL de etanol 100%. As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 45 minutos em temperatura ambiente, e o sobrenadante foi descartado por inversão da placa. Adicionou-se 150 µL de etanol a 70% e a mistura foi homogeneizada e centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e os precipitados foram colocados no concentrador de DNA por 10 min. Em seguida, os produtos foram eluídos em 10 µL de formamida e sequenciados em sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

2.2.1.6 Processamento de dados (Análise das sequências)

A análise das sequências foi feita com base nos eletroferogramas gerados pelo software Sequencing Analysis 3.0. As sequências nucleotídicas obtidas tiveram seus cromatogramas analisados pelos softwares BIOEDIT e *PhredPhrap-Consed* (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON et al., 1998), para edição e remoção do *primer*, a fim de estabelecer as sequências consenso para cada isolado bacteriano e remover as bases com baixa qualidade. O nível de exigência mínimo foi de 400 bases com qualidade acima de 20 (um erro a cada 100 bases lidas). Em seguida, as sequências foram comparadas com aquelas disponibilizadas no banco de dados GenBank do (NCBI), utilizando-se o programas Blastn (ALTSCHUL et al., 1990), para identificação do isolados bacterianos.

2.2.1.7 Construções filogenéticas

Para os agrupamentos filogenéticos, as sequências de cada sítio de TPI foram alinhadas utilizando-se o programa *ClustalW* (LARKIN et al., 2007). Após o alinhamento múltiplo das sequências com as sequências de referência do GenBank, foram construídos os agrupamentos filogenéticos no programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007), pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987) com valor de *bootstrap* de 1000 repetições.

2.2.2 Resultados e Discussão

2.2.2.1 Coleta e Caracterização dos Solos

As amostras de solo foram coletadas nos quatro sítios analisados no presente trabalho, todos situados na região de Manaus, na Amazônia Central. Cada ambiente apresenta distintos sistemas de uso da terra, caracterizados principalmente por agricultura de subsistência e floresta secundária, comumente chamada de “capoeira”. A Tabela 2.4 apresenta alguns dados referentes aos sítios de TPI avaliados, como estimativas da profundidade do horizonte antrópico, além de dados referentes à datação dos sítios arqueológicos (NEVES et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2009; LIANG et al., 2010; GROSSMAN et al., 2010). Estes dados revelam que os sítios Costa do Açutuba e Hatahara compreendem nichos arqueológicos de ocupação mais antiga que os sítios da Estação Experimental do Caldeirão, podendo haver diferenças na

composição e estrutura das comunidades microbianas dos horizontes antrópicos em função do período de deposição e enriquecimento destes solos com nutrientes e carvão pirogênico durante a formação das TPI, que constituíram padrões diferentes de ocupação.

As amostras foram coletadas na profundidade de 0-10 cm, uma vez que nesta profundidade ocorre a maioria das reações bacterianas dependentes de oxigênio, como a biossíntese e biodegradação de moléculas. A coleta das amostras foi realizada em tubos PVC, no sentido vertical, sem abertura de trincheira; posteriormente, os tubos foram vedados e acomodados em gelo seco. Após a coleta, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP, onde uma alíquota foi armazenada a -80°C para extração do DNA e futuras análises moleculares; outra alíquota foi enviada ao Laboratório de Análises Químicas da ESALQ/USP para análise das características químicas das amostras de solo.

A Análise de Componentes Principais (PCA) realizada com os dados químicos do solo revelou agrupamentos distintos para os quatro sítios estudados, onde se observa que as amostras de solo do sítio Hatahara, um dos mais antigos e mais extensivamente caracterizados sítios de TPI da região, apresentaram valores maiores de cálcio (Ca), CTC e soma de bases (SB), além de valores consideráveis de fósforo (P), quando comparadas com as amostras dos outros três sítios (Figura 2.4). Elevados valores de P nas TPI estão associados à presença de ossos, além de atividades de queima da vegetação, comuns para as populações que ocuparam os sítios arqueológicos. Existe uma relação direta entre os teores de P total e a CTC potencial nas TPI, sendo que uma possível explicação seria a redução na adsorção de P, causada pela formação de complexos com a matéria orgânica. Este fenômeno ocorre em menor intensidade nas camadas mais profundas, onde os teores de matéria orgânica são menores (FALCÃO et al., 2009).

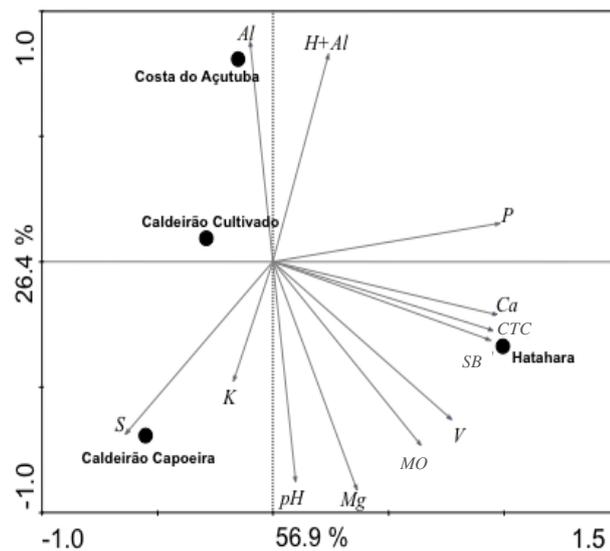


Figura 2.4 - Análise de Componentes Principais baseada nos elementos químicos dos solos de TPI

Variáveis como a capacidade de troca catiônica, a soma de bases (SB) e a saturação por bases (V) apresentam valores muito mais altos nas TPI quando comparados com os solos adjacentes. Os valores elevados da CTC não acontecem somente em função do alto teor de material orgânico presente, mas também de uma maior densidade de cargas por unidade de carbono (LIANG et al., 2006). Esta propriedade do carbono orgânico é específica para solos como as TPI, com alto conteúdo de carvão pirogênico, que possui a propriedade de reter mais nutrientes por apresentar maior superfície específica que o carvão resultante da queima da madeira em temperaturas mais elevadas, e por possuir maior densidade de carga negativa por unidade de área superficial (GLASER et al., 2001; LIANG et al., 2006; CUNHA et al., 2009).

Tabela 2.4 - Características dos sítios TPI e atributos químicos do solo

Sítios TPI	Sistema de uso da terra	Idade (anos)	Horizonte antrópico (m)	pH	MO	P	S	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC	V
				(CaCl ₂)	(g/dm ⁻³)	(mg/dm ⁻³)		(mmolc/dm ⁻³)					(%)		
CALDEIRÃO-CAPOEIRA	Floresta secundária (~20 anos)	~1200	0,30 - 1,40	5,2	41,0	100,0	11,0	3,7	52,0	11,0	-	47,0	66,7	113,7	59,0
CALDEIRÃO-CULTIVADO	Cultivo de mandioca (~30 anos)	~1200	0,30 - 1,40	5,0	40,0	171,0	9,0	0,1	51,0	9,0	-	47,0	60,1	107,1	56,0
COSTA DO AÇUTUBA	Culturas de subsistência (agricultura familiar)	2000 - 2300	0,48 - 0,83	4,8	31,3	204,7	3,3	1,0	57,7	5,3	1,0	50,0	64,0	114,0	50,6
HATAHARA	Cultivo de banana e gramíneas	600 - 1000	0,43 - 0,69	5,2	53,0	508,7	4,3	1,1	138,3	13,7	-	48,7	153,7	201,7	76,0

(-) Resultado <0,1 ou não determinado; MO: matéria orgânica do solo; SB: soma de bases; CTC: capacidade de troca catônica; V: saturação por bases. Adaptado de Grossman et al. (2010) e Liang et al. (2010).

A PCA também evidenciou a relação inversa entre os valores de fósforo e enxofre entre os quatro sítios de TPI analisados. No sítio Caldeirão, os sistemas de uso da terra influenciaram os teores de potássio (K), sendo que valores mais elevados foram encontrados na TPI sob capoeira. O sítio Costa do Açutuba foi o único a apresentar Al trocável, porém em teor muito reduzido, além do menor teor de matéria orgânica entre os quatro sítios.

Estes dados são muito importantes no contexto da Amazônia brasileira, onde cerca de 80% dos solos de terra firme (Latosolos e Argissolos) são caracterizados por apresentar baixa concentração de bases trocáveis, minerais de argila de atividade baixa como a caulinita, e óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio, além de baixa disponibilidade de fósforo, elevada acidez e, conseqüentemente, maior concentração de Al trocável e, em certos casos, manganês, ambos tóxicos para a maioria das plantas (SANCHEZ et al., 1983). Porém, o fator mais importante na nutrição da flora e fauna no sistema do solo parece ser a concentração de nutrientes, altamente favorecida nas TPI, cujo fluxo está intimamente relacionado com a assimilação por plantas e os processos de mineralização microbiana.

2.2.2.2 Isolamento de bactérias a partir do ensaio de enriquecimento em meio com HPAs

Os microcosmos em triplicata (Figura 2.5) contendo um grama de solo para os quatro sítios TPI analisados, juntamente com o meio mineral acrescido com HPAs, foram incubados a 30°C por 15 dias, sob agitação constante.

A partir do subcultivo (Figura 2.6) em meio mineral Bushnell-Haas, foram plaqueadas as diluições seriadas, a fim de se obter placas com número de colônias entre 30 e 300, para facilitar a seleção de colônias bacterianas isoladas, para posterior purificação, extração do DNA e identificação por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.

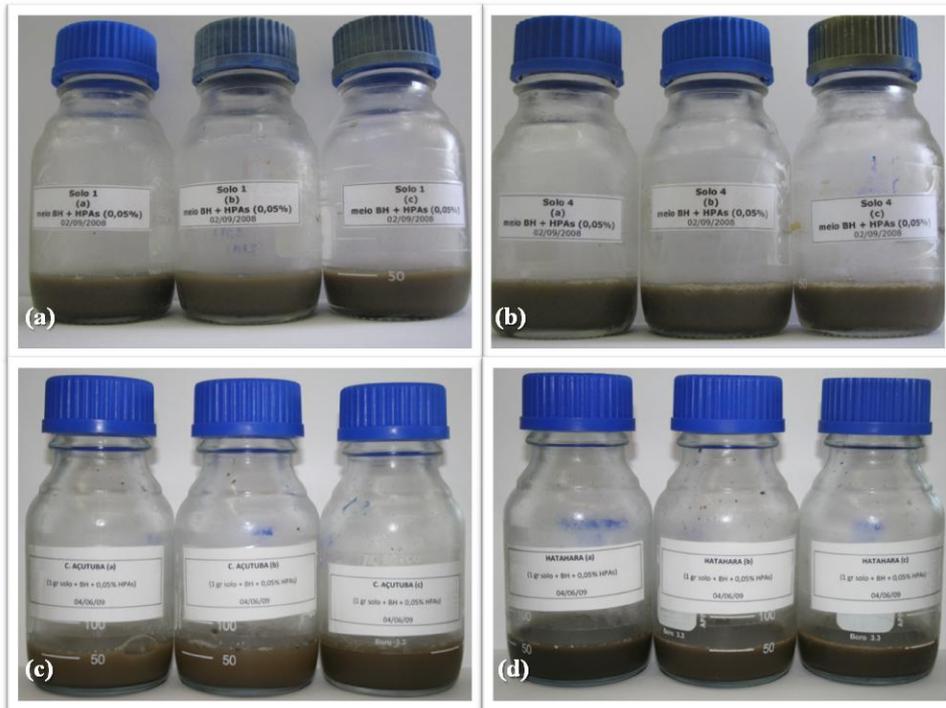


Figura 2.5 - Microcosmos contendo os quatro solos TPI analisados, sendo (a) Caldeirão-Capoeira, (b) Caldeirão-Cultivado, (c) Costa do Açutuba e (d) Hatahara

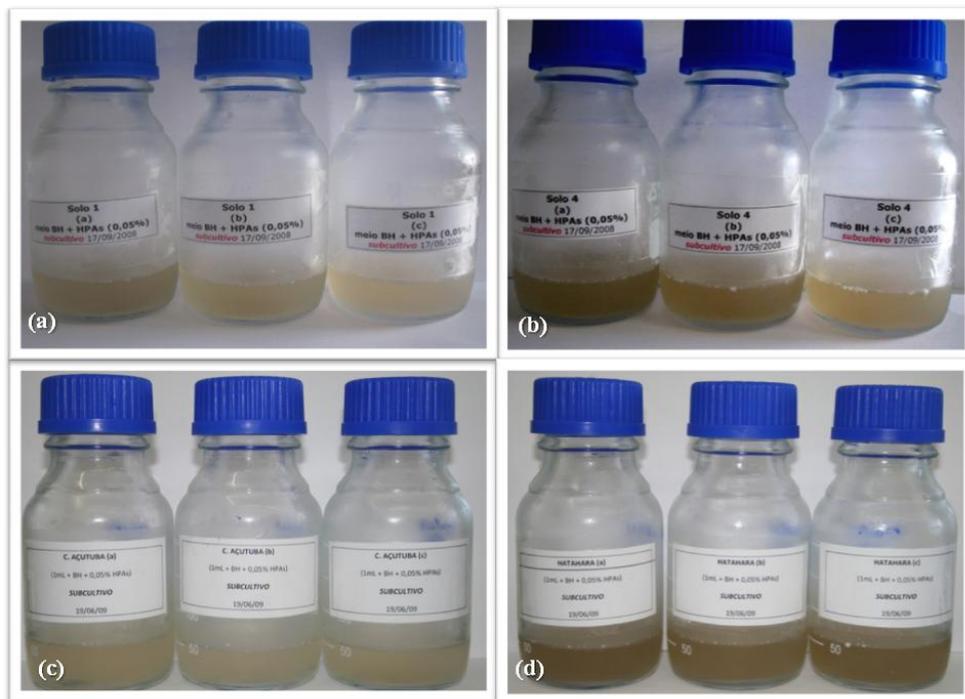


Figura 2.6 - Microcosmos contendo os subcultivos dos quatro solos TPI analisados, sendo (a) Caldeirão-Capoeira, (b) Caldeirão-Cultivado, (c) Costa do Açutuba e (d) Hatahara

As diluições entre 1×10^3 e 1×10^7 foram plaqueadas a partir dos microcosmos, nas três repetições para cada um dos quatro solos TPI analisados. As placas com colônias isoladas foram separadas para retirada das colônias com auxílio de alça de platina; estas colônias foram transferidas para novas placas contendo meio Caso-agar, onde foram espalhadas por esgotamento na superfície do meio sólido, para verificação de possíveis contaminações.

Foram obtidos 100 isolados para cada sítio de TPI analisado, num total de 400. De modo geral, os isolados apresentaram no mínimo quatro morfologias de colônia diferentes, visualizadas por crescimento das culturas em meio de cultivo sólido (Figura 2.7).

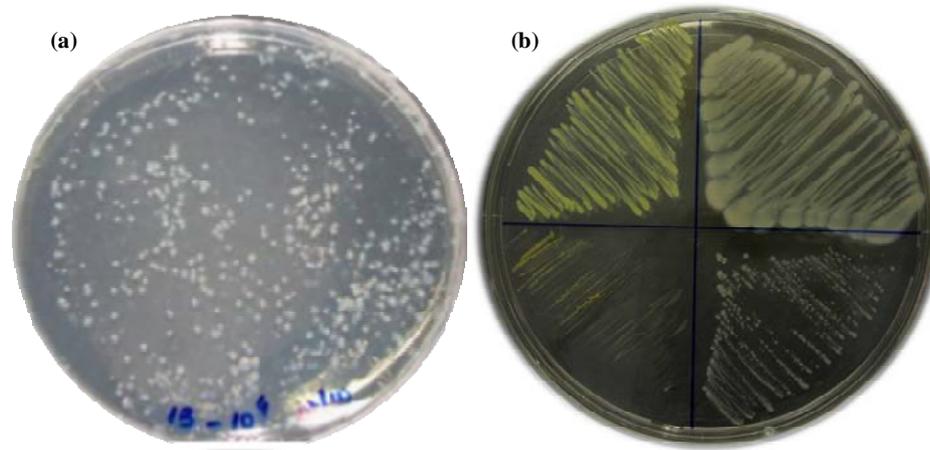


Figura 2.7 - (a) colônias em placa contendo meio sólido obtidas a partir de diluição seriada. (b) culturas purificadas em meio sólido

As culturas foram mantidas nas placas de cultivo contendo meio Caso-agar, e foram produzidos bancos de germoplasma para os isolados obtidos a partir de cada um dos quatro sítios de TPI analisados, posteriormente armazenados em glicerol a 50% em ultra-freezer a -80°C .

Como controles positivos foram utilizados as cepas DSM 6506 (*Pseudomonas fluorescens* Mingula 1895) e DSM 6899 (*Pseudomonas putida* [Trevisan 1889] Migula 1895), adquiridas do Banco de Culturas da Alemanha (DSMZ), nas mesmas condições do solo, exceto que as culturas foram diretamente inoculadas nos microcosmos com o auxílio de alça de platina a partir de células armazenadas em glicerol a 50% (ultra-freezer a -80°C). Estas

bactérias foram escolhidas por sua capacidade de degradar hidrocarbonetos aromáticos, previamente descrita na literatura (CONNORS; BARNSLEY, 1982; SPAIN; GIBSON, 1988).

Como controles negativos e a fim de monitorar possíveis contaminações nos reagentes e no meio mineral utilizados no bioensaio, foram incluídos microcosmos contendo somente as cepas DSM e o meio mineral, sem a presença de HPAs como fonte de carbono e energia, além de microcosmos contendo o meio mineral e os hidrocarbonetos, sem a presença de micro-organismos. (Figura 2.8).

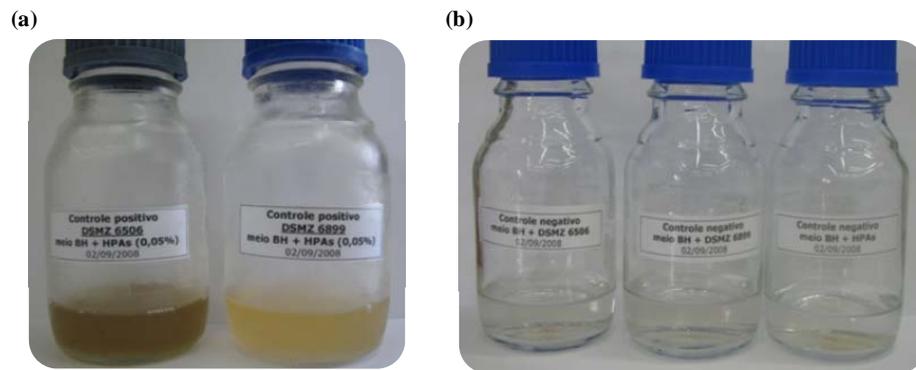


Figura 2.8 - (a) controles positivos utilizados no bioensaio e (b) controles negativos

Os controles positivos das duas cepas bacterianas padrões apresentaram crescimento muito satisfatório, com rápido consumo dos hidrocarbonetos adicionados ao meio mineral. As diluições seriadas foram plaqueadas e o crescimento bacteriano foi observado a pós 24 horas de incubação a 30°C. Aliquotas dos microcosmos utilizados com controles negativos (cepas DSM em meio mineral sem HPAs) foram também plaqueadas em meio mineral (placas seletivas), onde foi possível observar um crescimento basal microbiano, com o aparecimento de algumas colônias bacterianas na superfície do meio solidificado, provavelmente em função da presença de carbono-traço no meio de cultura ou na água de preparo. O microcosmo contendo somente HPAs e o meio mineral Bushnell-Haas não apresentou aparecimento de colônias microbianas.

2.2.2.3 Caracterização genética dos isolados e análise das sequências

Extração de DNA genômico dos isolados obtidos no enriquecimento

As extrações de DNA genômico dos isolados foram realizadas com três repetições para cada amostra de solo das TPI: sítios Caldeirão-Capoeira e Cultivado, Hatahara e Costa do Açutuba, assim como a construção dos microcosmos e a posterior amplificação do gene 16S rRNA para sequenciamento e identificação dos isolados. Os pontos para extração foram escolhidos ao acaso entre os 25 coletados para cada sítio na profundidade de 0 a 10 cm, e a metodologia utilizada para extração foi adaptada de Sambrook et al. (1989).

O DNA dos isolados dos quatro sítios de TPI analisados foi extraído com sucesso após crescimento das culturas em meio líquido, apresentando ótima qualidade e elevada quantidade, cujas concentrações alcançaram em torno de 100 ng por microlitro para cada amostra (Figura 2.9)

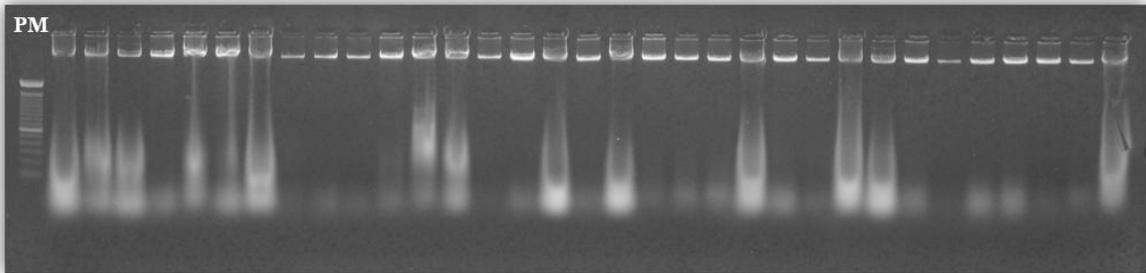


Figura 2.9 - Gel resultante da extração do DNA genômico de alguns isolados obtidos no ensaio de enriquecimento em meio mineral contendo HPAs. PM: padrão de peso molecular *100pb DNA Mass Ladder™* (Invitrogen Life Technologies)

Amplificação, por técnica de PCR, do gene 16S rRNA dos isolados obtidos no ensaio de enriquecimento e purificação dos fragmentos

O DNA extraído e diluído de cada um dos isolados bacterianos foi amplificado por técnica de PCR utilizando-se os *primers* fd1 e rD1 (WEISBURG et al., 1991) para a obtenção de *amplicons* do gene ribossomal bacteriano 16S rRNA. Para a maioria dos isolados, os produtos amplificados geraram um fragmento de DNA de aproximadamente 1500 pb (Figura 2.10), em quantidade suficiente para a realização das reações de sequenciamento do gene 16S rRNA.

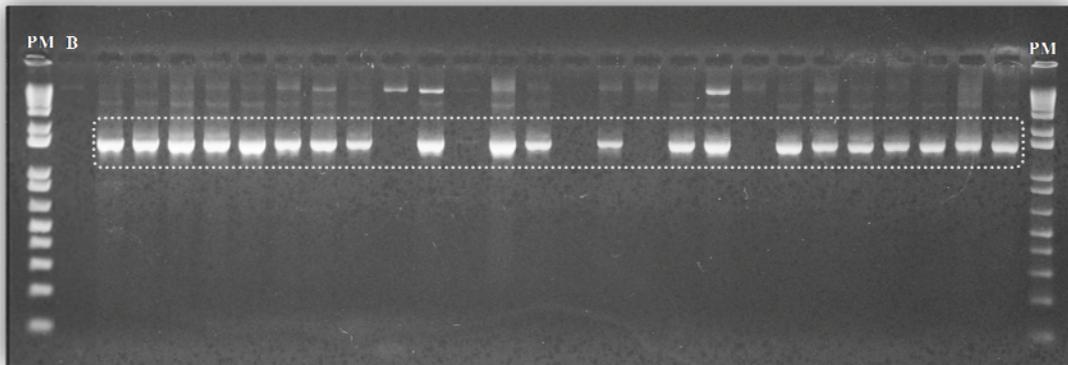


Figura 2.10 - Gel resultante da amplificação do gene 16S rRNA de alguns isolados obtidos no ensaio de enriquecimento. B: controle negativo; PM: padrão de peso molecular *Ikb DNA Mass Ladder*TM (Invitrogen Life Technologies)

Em todas as reações foram incluídos controles negativos sem DNA. Os *amplicons* foram purificados em coluna de matriz de fibra de vidro *GFX*TM *PCR-DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), ressuspensos em água ultra-pura (Milli-Q) e quantificados em gel de agarose a 1,0% utilizando o marcador de peso molecular *Ikb DNA Mass Ladder*TM (Invitrogen Life Technologies), para verificação do rendimento da purificação.

Sequenciamento parcial do gene 16 rRNA e análise das sequências

Todos os isolados que foram positivos na amplificação do 16s rRNA tiveram seus fragmentos sequenciados utilizando-se o *primer* fD1, que amplifica a porção inicial do gene ribossomal, de aproximadamente 400 pb. O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA tem sido extensivamente utilizado como ferramenta molecular para identificação de gêneros bacterianos, além de ser utilizado para análises de diversidade, quando o objetivo não é realizar um estudo evolutivo detalhado (CANNAPAN, 2007). A sequência parcial do gene geralmente apresenta variabilidade suficiente para identificação inicial de isolados bacterianos.

Nesse contexto, foram identificados 78 isolados a partir do sítio de TPI Caldeirão-Capoeira, 76 para o sítio Caldeirão-Cultivado, além de 84 isolados do sítio Costa do Açutuba e 90 do sítio Hatahara, que apresentaram boa qualidade e comprimento suficiente da sequência parcial do gene ribossomal 16S rRNA (em torno de 400 pb) para sequenciamento.

Este tamanho de fragmento é necessário para permitir uma boa identificação do gênero bacteriano correspondente a sequência submetida à comparação no banco de dados do GenBank (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov), principalmente em termos de similaridade (identidade) e probabilidade de alinhamentos ao acaso (E value).

A partir da análise das sequências, foram definidos filotipos (NUBEL et al., 1999; STACH et al., 2003) representativos de todos os gêneros bacterianos presentes em cada sítio de TPI analisado, todos com similaridade acima de 97% em relação ao banco de dados do GenBank. Desta forma, foram encontrados 25 grupos bacterianos para o sítio Caldeirão-Capoeira, além de 24 grupos para o sítio Cultivado; do mesmo modo, para os sítios Hatahara e Costa do Açutuba foram definidos 19 filotipos. Os números de acesso, juntamente com a identidade em relação ao banco de dados e a referência de cada sequência representativa para os filotipos de cada sítio TPI avaliado estão representados nas Tabelas 2.5 a 2.8.

Tabela 2.5 - Filotipos representativos dos gêneros bacterianos isolados a partir do sítio Caldeirão-Capoeira

ISOLADO	GENBANK	DESCRIÇÃO	E value	IDENTIDADE	FONTE (ISOLAMENTO)/ REFERÊNCIA
6	AY770949.1	Uncultured bacterium clone W9 partial 16S rRNA gene	0.0	97%	water injection well of Dagang oilfield / unpublished
14	EU370704.1	Micrococcaceae bacterium CW 108 partial 16S rRNA gene	0.0	98%	forest soil / ZHOU et al. (2009)
16	EU873315.1	<i>Stenotrophomonas</i> sp. DCY38 partial 16S rRNA gene*	0.0	99%	soil of a ginseng field / unpublished
17	FJ489791.1	Uncultured bacterium clone 01mil21D11 partial 16S rRNA gene*	0.0	100%	coral-associated bacteria (Great Barrier Reef) / LITTMAN et al. (2009)
19	EU638602.1	Uncultured Burkholderiales bacterium clone SHBZ1784 16S rRNA	0.0	98%	thermophilic microbial fuel cell acetate-fed experiment / WRIGHTON et al. (2008)
36	EU327525.1	<i>Arthrobacter atrocyaneus</i> partial 16S rRNA gene*	0.0	99%	perchlorate reducing gram negative bacteria / SHETE et al. (2008)
44	AY898093.1	Uncultured organism clone M8907E10 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	97%	hospital therapy pool / ANGENENT et al. (2005)
45	FJ594441.1	<i>Pseudomonas</i> sp. CAT1-8 partial 16S rRNA gene	0.0	97%	wastewater treatment-pesticide manufacturing company (catechol-degrading bacteria) / unpublished
48	FJ263918.1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BA21 partial 16S rRNA gene*	0.0	98%	blood culture (<i>homo sapiens</i>) / unpublished
50	FJ588700.1	<i>Starkeya</i> sp. pcnb4 partial 16S rRNA gene*	0.0	97%	Pentachloronitrobenzene contaminated soil / unpublished
128	AY661996.1	Uncultured bacterium clone 015C-F01 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	97%	groundwater contaminated with high levels of nitric acid-bearing uranium waste / unpublished
133	FJ542961.1	Uncultured <i>Achromobacter</i> sp. clone B02-07F partial 16S rRNA gene	0.0	99%	high ergovaline treatment gut / RATTRAY et al. (2010)
136	FJ646634.1	<i>Pseudomonas</i> sp. IPPW-2 partial 16S rRNA gene*	0.0	99%	pulp and paper wastewater / ADDISON et al. (2010)
142	EF582554.1	Uncultured bacterium clone Sm9-42 partial 16S rRNA gene*	5E-167	97%	salt marsh sediment amended with petroleum / unpublished
145	AM422370.1	<i>Ochrobactrum haemophilum</i> partial 16S rRNA gene, type strain CCUG 38531T*	0.0	99%	human clinical specimens / KAMPFER et al. (2007)
146	DQ346936.1	Uncultured bacterium clone 144350 partial 16S rRNA gene*	6E-166	97%	TNT-containing bioreactor / JUNG et al. (2006)
155	AY956789.1	<i>Pediococcus ethanolidurans</i> Z-9 partial 16S rRNA gene	2E-129	100%	walls of a distilled-spirit-fermenting cellar / LIU et al. (2006)
157	DQ442549.1	<i>Streptomyces umbrinus</i> strain NRRL B-2572T partial 16S rRNA gene*	4E-132	100%	genomic DNA / unpublished
159	EU133545.1	Uncultured bacterium clone FFCH2665 partial 16S rRNA gene*	0.0	99%	soil from an undisturbed mixed grass prairie preserve / ELSHAHED et al. (2008)
164	DQ803183.1	Uncultured bacterium clone RL311_aam21g01 partial 16S rRNA gene	2E-165	97%	human feces (fat diet) / LEY et al. (2006)

Continuação

167	EU789481.1	<i>Methylobacterium</i> sp. D5 partial 16S rRNA gene*	6E-34	100%	Rhizosphere (sugarcane) / unpublished
168	EU888002.1	Uncultured alpha proteobacterium clone L42 partial 16S rRNA gene*	9E-65	99%	leach bed reactor / WANG et al. (2010)
173	FJ870125.1	<i>Ochrobactrum intermedium</i> partial 16S rRNA gene*	0.0	100%	Hexavalent chromium reducing bacteria / unpublished
174	AM490627.1	<i>Ochrobactrum intermedium</i> TM73 partial 16S rRNA gene	0.0	100%	atypical, prolonged 16S sequence / SCHOLZ et al. (2008)
177	EF515413.1	Uncultured bacterium clone 24b05 partial 16S rRNA gene	0.0	99%	upflow microbial fuel cell anode / unpublished

*Filotipos isolados somente neste sítio de TPI.

Tabela 2.6 - Filotipos representativos dos gêneros bacterianos isolados a partir do sítio Caldeirão-Cultivado

ISOLADO	GENBANK	DESCRIÇÃO	E value	IDENTIDADE	FONTE (ISOLAMENTO)/ REFERÊNCIA
1	EF596911.1	<i>Paenibacillus</i> sp. B-257 partial 16S rRNA gene*	0.0	97%	Diversity of biphenyl-degrading bacteria / VEZINA et al. (2008)
2	EF100520.1	<i>Phyllobacterium</i> sp. STM 4024 partial 16S rRNA gene*	2E-62	97%	root nodule (infra-arid region) / MAHDHI et al. (2007)
3	AY898093.1	Uncultured organism clone M8907E10 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	97%	hospital therapy pool / ANGENENT et al. (2005)
4	EU370704.1	Micrococcaceae bacterium CW 108 partial 16S rRNA gene	0.0	98%	forest soil / ZHOU et al. (2009)
53	AY770949.1	Uncultured bacterium clone W9 partial 16S rRNA gene	0.0	97%	water injection well of Dagang oilfield / unpublished
65	EU554654.1	Uncultured soil bacterium clone BNPX-744 partial 16S rRNA gene*	0.0	97%	soil / unpublished
69	AM490627.1	<i>Ochrobactrum intermedium</i> partial 16S rRNA gene, strain TM73	0.0	100%	atypical, prolonged 16S sequence / SCHOLZ et al. (2008)
74	EU638602.1	Uncultured Burkholderiales bacterium clone SHBZ1784 partial 16S rRNA gene	0.0	99%	thermophilic microbial fuel cell acetate-fed experiment / WRIGHTON et al. (2008)
77	EF515413.1	Uncultured bacterium clone 24b05 partial 16S rRNA gene	0.0	99%	upflow microbial fuel cell anode / unpublished
81	EU135775.1	Uncultured <i>Microbacterium</i> sp. clone 41 partial 16S rRNA gene*	0.0	98%	Frog skin / unpublished
88	FJ594441.1	<i>Pseudomonas</i> sp. CAT1-8 partial 16S rRNA gene	0.0	97%	wastewater treatment-pesticide manufacturing company (catechol-degrading bacteria) / unpublished
103	EF511757.1	Uncultured bacterium clone P5D23-656 partial 16S rRNA gene*	2E-155	97%	endotracheal aspirate (<i>homo sapiens</i>) / FLANAGAN et al. (2007)
105	FJ200382.1	<i>Cellulomonas</i> sp. 3335BRRJ partial 16S rRNA gene*	1E-144	98%	clean room (genomic DNA) / unpublished
110	EF178698.1	<i>Streptomyces caeruleus</i> strain NRRL 2449 partial 16S rRNA gene*	5E-32	97%	genomic DNA / unpublished
113	DQ211691.1	<i>Achromobacter</i> sp. LQX-8 partial 16S rRNA gene*	0.0	98%	Contaminated Soil / unpublished
116	AY956789.1	<i>Pediococcus ethanolidurans</i> Z-9 partial 16S rRNA gene	9E-28	100%	walls of a distilled-spirit-fermenting cellar / LIU et al. (2006)
117	DQ662491.1	Uncultured bacterium clone RH.208-49-4 partial 16S rRNA gene*	6E-145	97%	hypersaline industrial wastewater / BEN-DOV et al. (2008)
121	FJ542961.1	Uncultured <i>Achromobacter</i> sp. clone B02-07F partial 16S rRNA gene	0.0	99%	high ergovaline treatment gut / RATTRAY et al. (2010)
123	AM942912.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate SEA.0.16*	2E-17	100%	house dust / PAKARINEN et al. (2008)

Continuação

124	DQ803183.1	Uncultured bacterium clone RL311_aam21g01 partial 16S rRNA gene	3E-158	97%	human feces (fat diet) / LEY et al. (2006)
125	EF608313.1	Uncultured bacterium clone TBM.19OCT-52 partial 16S rRNA gene*	1E-100	98%	activated sludge system treating chemical industries waste water / unpublished
171	AY661996.1	Uncultured bacterium clone 015C-F01 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	97%	groundwater contaminated with high levels of nitric acid-bearing uranium waste / unpublished
175	FJ390615.1	Uncultured bacterium clone Ohio14111 partial 16S rRNA gene*	5E-89	97%	Canada goose feces / LU et al. (2009)
182	EU730915.1	<i>Caulobacter vibrioides</i> strain 212 partial 16S rRNA gene*	0.0	98%	Water Purifiers (genomic DNA) / unpublished

*Filotipos isolados somente neste sítio de TPI.

Tabela 2.7 - Filotipos representativos dos gêneros bacterianos isolados a partir do sítio Costa do Açutuba

ISOLADO	GENBANK	DESCRIÇÃO	E value	IDENTIDADE	FONTE (ISOLAMENTO)/REFERÊNCIA
1	EU099608.1	<i>Pseudomonas</i> sp. j9-1 partial 16S rRNA gene	0.0	99%	polluted soil (pollutant-resistant strains) / unpublished
5	FN433020.1	<i>Arthrobacter ureafaciens</i> partial 16S rRNA gene, isolate CCM12B	3E-145	99%	Elephant dung sample / unpublished
8	GQ284540.1	<i>Pseudomonas</i> sp. PCSAS2-20 partial 16S rRNA gene	0.0	98%	mangrove sediment / unpublished
9	EU445263.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> isolate EFLRI 121 partial 16S rRNA gene	0.0	98%	soil (free lining Rhizobium) / SHAMSELDIN et al. (2008)
12	FJ389669.1	<i>Arthrobacter</i> sp. scl-2 partial 16S rRNA gene	0.0	100%	Isocarbophos-degrading bacterium / unpublished
14	GQ302920.1	Uncultured bacterium clone FedMale17 partial 16S rRNA gene*	0.0	98%	blood-fed tick / HEISE et al. (2010)
15	EF693764.1	<i>Pseudomonas</i> sp. H650 partial 16S rRNA gene	0.0	98%	hyacinth bulbs (bulb-associated bacteria) / JAFRA et al. (2008)
16	EF153393.1	<i>Pseudomonas</i> sp. AVO 94 partial 16S rRNA gene*	3E-156	99%	enrichment bacteria (genomic DNA) / PLIEGO et al. (2007)
17	EU305672.1	<i>Citricoccus</i> sp. FS24 partial 16S rRNA gene	0.0	98%	bioreactor for saline wastewater treatment / MENG et al. (2010)
18	EU851879.1	Methylobacteriaceae bacterium GB31 partial 16S rRNA gene*	4E-144	100%	human mouth / unpublished
31	GU222443.1	<i>Pseudomonas</i> sp. SZDN-2 partial 16S rRNA gene*	4E-172	100%	river sediment (nitrifying bacteria) / unpublished
40	GU451206.1	Uncultured bacterium clone A1H1M9 partial 16S rRNA gene*	0.0	98%	adult gut of male / unpublished
41	EF221779.1	<i>Stenotrophomonas</i> sp. tap-11 partial 16S rRNA gene*	6E-151	98%	polluted soil / unpublished
68	GU560180.1	Uncultured <i>Stenotrophomonas</i> sp. clone W5S17 partial 16S rRNA gene*	0.0	99%	biofilm treating pharmaceutical wastewater / unpublished
74	FN392690.1	<i>Arthrobacter</i> sp. C6 partial 16S rRNA gene*	4E-159	99%	water (microcystin-degrading bacteria) / MANAGE et al. (2009)
76	EF157292.1	<i>Pseudomonas</i> sp. OK-5 partial 16S rRNA gene	0.0	99%	TNT-contaminated soil / unpublished
80	EU373354.1	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> strain HNR08 partial 16S rRNA gene	0.0	99%	root (Endophytic bacteria) / unpublished
83	GU332615.1	<i>Arthrobacter</i> sp. AG3-7 partial 16S rRNA gene*	0.0	99%	Longshan potassium mine / unpublished
97	FN666623.1	<i>Paenibacillus</i> sp. 5.5LF 46T partial 16S rRNA gene*	0.0	99%	landfill 5.5ft depth soil / unpublished

*Filotipos isolados somente neste sítio de TPI.

Tabela 2.8 - Filotipos representativos dos gêneros bacterianos isolados a partir do sítio Hatahara

ISOLADO	GENBANK	DESCRIÇÃO	E value	IDENTIDADE	FONTE (ISOLAMENTO)/REFERÊNCIA
1	EU099608.1	<i>Pseudomonas</i> sp. j9-1 partial 16S rRNA gene	0.0	99%	polluted soil (pollutant-resistant strains) / unpublished
2	EF667864.1	Uncultured bacterium clone LaC20H33 partial 16S rRNA gene*	2E-117	97%	uncultivated river sediment bacterium / KITTELMANN & FRIEDRICH (2008)
6	FN433020.1	<i>Arthrobacter ureafaciens</i> partial 16S rRNA gene, isolate CCM12B	0.0	99%	Elephant dung sample / unpublished
11	GQ284540.1	<i>Pseudomonas</i> sp. PCSAS2-20 partial 16S rRNA gene	0.0	98%	mangrove sediment / unpublished
12	EU445263.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> isolate EFLRI 121 partial 16S rRNA gene	0.0	98%	soil (free lining Rhizobium) / SHAMSELDIN et al. (2008)
14	FJ389669.1	<i>Arthrobacter</i> sp. scl-2 partial 16S rRNA gene	0.0	99%	Isocarboxiphos-degrading bacterium / unpublished
16	FJ828891.2	<i>Methylobacterium</i> sp. MMA-CI-1 partial 16S rRNA gene*	0.0	98%	Methylotrophs from the human oral cavity / unpublished
18	EF693764.1	<i>Pseudomonas</i> sp. H650 partial 16S rRNA gene	0.0	98%	hyacinth bulbs (bulb-associated bacteria) / JAFRA et al. (2008)
19	AY444974.1	Uncultured bacterium clone M8 partial 16S rRNA gene*	0.0	99%	biofilm on oxygen-transfer membrane / COLE et al. (2008)
20	EU305672.1	<i>Citricoccus</i> sp. FS24 partial 16S rRNA gene	0.0	98%	genomic DNA (halophile isolated from a bioreactor for saline wastewater treatment) / MENG et al. (2010)
22	GU130121.1	Gordoniaceae bacterium 232021 partial 16S rRNA gene*	0.0	99%	sediment / unpublished
24	FJ572038.1	<i>Gordonia</i> sp. ON-33 partial 16S rRNA gene*	3E-170	99%	soil around a wastewater treatment plant/ PARK et al. (2009)
33	AY972390.1	<i>Pseudomonas citronellolis</i> strain S18 partial 16S rRNA gene*	0.0	98%	activated-sludge / DE GELDER et al. (2005)
42	GQ467817.1	Uncultured bacterium clone R4J3M4_E7 partial 16S rRNA gene*	0.0	98%	genomic DNA (microfiltered milk) / RASOLOFO et al. (2010)
69	FJ897490.1	<i>Stenotrophomonas</i> sp. NII-51 partial 16S rRNA gene*	0.0	99%	genomic DNA (soil) / unpublished
76	EF157292.1	<i>Pseudomonas</i> sp. OK-5 partial 16S rRNA gene	0.0	99%	TNT-contaminated soil / unpublished
79	EU373354.1	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> strain HNR08 partial 16S rRNA gene	0.0	99%	root (Endophytic bacteria) / unpublished
82	GQ332346.2	<i>Arthrobacter</i> sp. GG7a partial 16S rRNA gene*	0.0	99%	genomic DNA (soil) / CHOI et al. (2009)
97	FJ930068.1	<i>Paenibacillus</i> sp. enrichment culture clone 9 partial 16S rRNA gene*	0.0	99%	fermented composting materials / unpublished

*Filotipos isolados somente neste sítio de TPI.

Desta forma, a distribuição dos gêneros bacterianos encontrados em cada sítio de TPI foi bastante heterogênea; entretanto, alguns gêneros foram comuns para mais de um sítio e houve ocorrência de gêneros bacterianos específicos para cada um dos quatro solos TPI analisados. Alguns isolados foram altamente similares a bactérias derivadas de clones ambientais depositadas no banco de dados do NCBI. Entre os sítios de TPI avaliados, houve dominância de bactérias não cultivadas nos dois sítios do Caldeirão, tanto no solo TPI sob floresta secundária (Capoeira), quanto no sítio sob cultivo agrícola (Figura 2.11), sendo que o clone W9 de bactéria não cultivada, isolado a partir de amostras de poços de injeção de água de campos petrolíferos em Dagang, na China, foi o mais abundante para os dois sistemas de uso da terra.

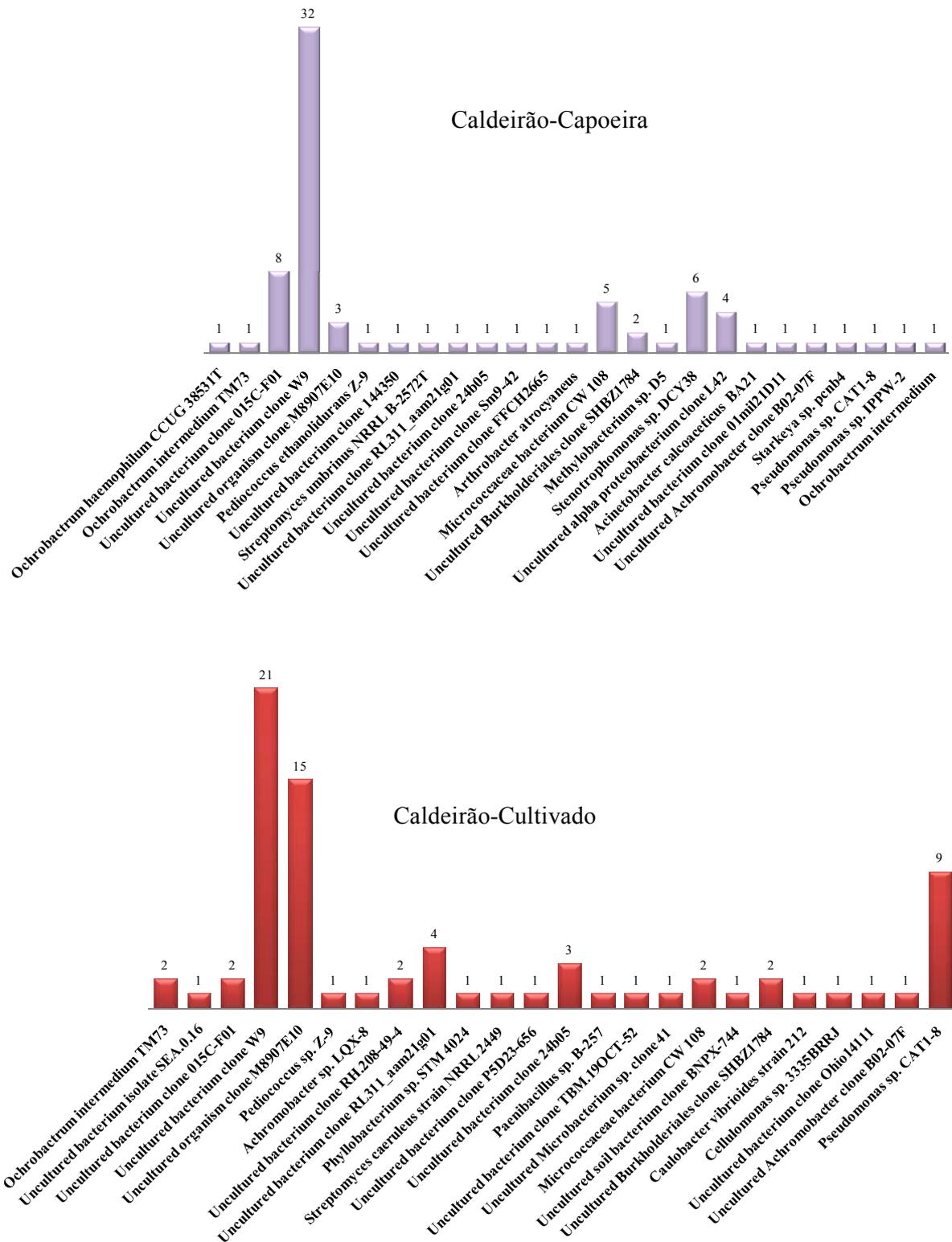


Figura 2.11 - Distribuição dos gêneros bacterianos obtidos a partir do ensaio de enriquecimento com solos dos sítios de TPI Caldeirão-Capoeira e Caldeirão-Cultivado. Os números acima das colunas representam o número de seqüências encontradas para cada gênero bacteriano

Nos sítios Hatahara e Costa do Açutuba, houve dominância de sequências de isolados cultivados dos gêneros *Arthrobacter* e *Pseudomonas*, sendo que o isolado CCM12B de *Arthrobacter ureafaciens* foi o mais abundante nos consórcios bacterianos obtidos para estes dois sítios de TPI (Figura 2.12). A maioria dos isolados identificados a partir do ensaio de enriquecimento já foi reportada na literatura como degradadores de hidrocarbonetos aromáticos, cuja fonte de isolamento está relacionada com ambientes contaminados com fontes de compostos orgânicos, como sedimentos de mangue, solos, água, rizosfera, biorreatores, estações de tratamento de resíduos, entre outros. Isto demonstra a confiabilidade e a acurácia do ensaio de enriquecimento no isolamento de micro-organismos com potencial para biodegradação a partir dos solos TPI, que podem constituir *hot-spots* de diversidade microbiana, principalmente em relação a processos metabólicos funcionais (TSAI et al., 2003).

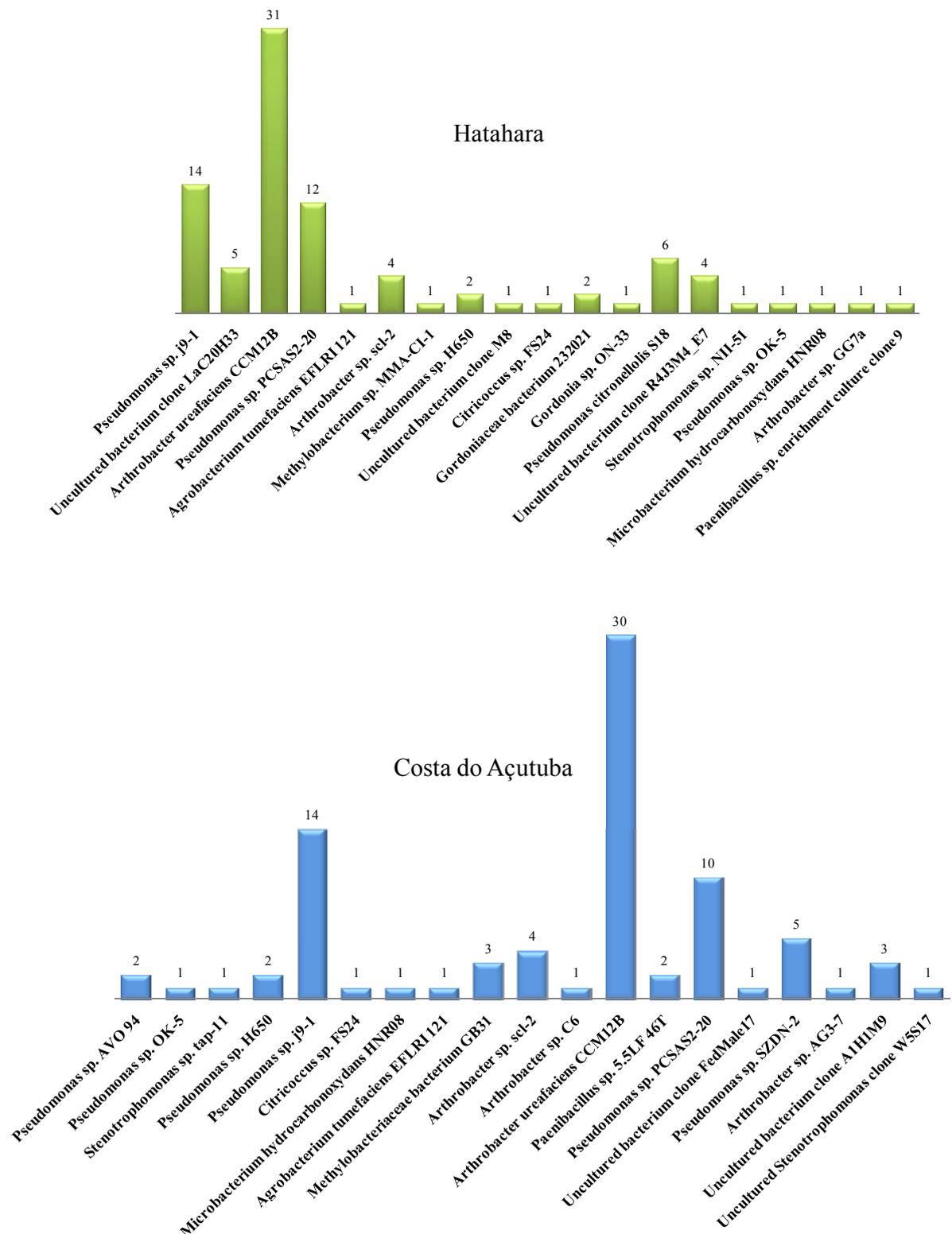


Figura 2.12 - Distribuição dos gêneros bacterianos obtidos a partir do ensaio de enriquecimento com solos dos sítios de TPI Hatahara e Costa do Açutuba. Os números acima das colunas representam o número de sequências encontradas para cada gênero bacteriano

Neste contexto, é possível sugerir que os gêneros bacterianos isolados neste ensaio a partir dos solos TPI possuem grande potencial biotecnológico na geração de produtos e processo de interesse para ações de biorremediação e bioprospecção, tanto de moléculas quanto de genes relacionados às vias metabólicas de biodegradação. Os dados gerados a partir deste estudo também fornecem informação sobre o papel funcional desses micro-organismos na ciclagem de nutrientes, cujos processos influenciam diretamente a resiliência da fertilidade associada aos solos TPI. A presença de gêneros bacterianos com potencial para atividades funcionais também deve estar associada à maior quantidade de carvão pirogênico nestes solos, uma vez que o carvão possui grande capacidade de adsorção de moléculas e constitui um micro-habitat estável para a sobrevivência de micro-organismos, pela sua recalcitrância e estrutura porosa.

Paralelamente, foi possível observar a presença de muitos filotipos comuns entre os sítios Caldeirão-Capoeira e Cultivado, como pode ser observado no Diagrama de Venn (FAUTH et al., 1996) (Figura 2.13); entretanto, não houve filotipos em comum entre os solos do Caldeirão e os solos dos sítios Hatahara e Costa do Açutuba, que constituíram um grupo distinto, com filotipos comuns entre si.

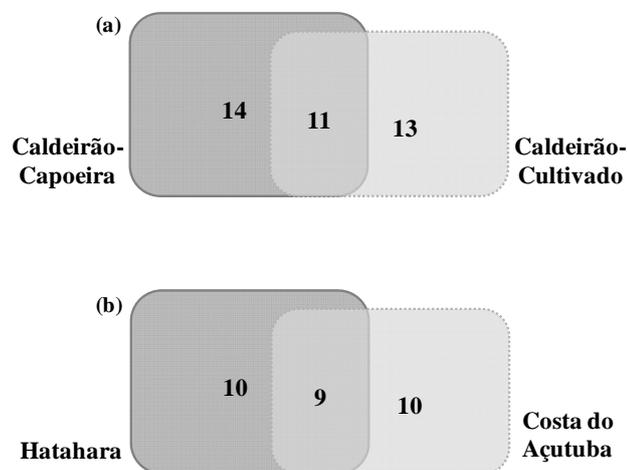


Figura 2.13 - Diagrama de Venn para os filotipos comuns e únicos para os sítios (a) TPI Caldeirão-Capoeira e Cultivado e (b) TPI Hatahara e Costa do Açutuba, analisados no presente trabalho

Gêneros bacterianos como *Pseudomonas*, que são micro-organismos altamente adaptados e amplamente distribuídos na maioria dos ambientes (MA et al., 2006), foram encontrados em todos os quatro solos de TPI analisados; entretanto alguns gêneros foram

isolados somente em um dos sítios, como por exemplo os gêneros *Ochrobactrum* e *Starkeya*, ambos da ordem Rhizobiales, que foram isolados somente a partir de solo do Caldeirão sob capoeira. Paralelamente, os gêneros *Achromobacter*, *Caulobacter* e *Cellulomonas* foram isolados somente a partir do solo TPI Caldeirão-Cultivado, e isolados de *Gordonia* foram encontrados exclusivamente no Hatahara.

Estes resultados demonstram a influência dos diferentes sistemas de uso da terra nas comunidades microbianas dos solos TPI. Além disso, algumas características como a textura do solo (argilosa ou arenosa), teores de matéria orgânica, CTC e valores de pH, bem como dinâmicas diferentes de ocupação humana na região, estão diretamente associadas à diferenciação entre os sítios de TPI (WOODS; McCANN, 1999). Os solos na Estação Experimental do Caldeirão, tanto sob cultivo agrícola, quanto sob floresta secundária, constituem sítios de TPI mais recentes dentro do contexto de ocupação pelas populações indígenas, datando de aproximadamente 1200 anos, enquanto que os sítios Hatahara e Costa do Açutuba são muito mais antigos e, neste contexto, este conjunto de distintos atributos, tanto os físico-químicos e a cobertura vegetal, quanto a interferência antropogênica, podem ter influenciado nas diferenças na estrutura das comunidades bacterianas funcionais presentes nestes solos.

2.2.2.4 Construções filogenéticas

As Figuras 2.14 a 2.17 mostram as árvores filogenéticas com os isolados obtidos para os quatro sítios de TPI analisados neste estudo com o programa MEGA4 (TAMURA et al., 2007), usando o método de *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987); as distâncias evolutivas foram computadas usando o método *Maximum Composite Likelihood* (TAMURA et al., 2004) e estão em unidades do número de substituição de base por sítio. O valor de confiança dos braços da árvore foi determinado usando análise de *bootstrap* baseada em 1000 reamostragens. As árvores foram construídas com base nos filotipos determinadas pela comparação e classificação das sequências dos sítios de TPI analisados com o banco de dados do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Foram incluídas duas sequências obtidas do banco de dados como referência para as árvores filogenéticas, sendo a estirpe F1 de *Pseudomonas putida* (número de acesso no NCBI NC_009512.1) e a estirpe PJ3 de *Arthrobacter* sp. (número de acesso no NCBI DQ531668.1),

descritas como degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos. Estas sequências foram escolhidas por representarem os dois gêneros bacterianos encontrados com maior frequência entre os isolados analisados. Os agrupamentos alcançados para os quatro sítios foram bastante satisfatórios e demonstraram a confiabilidade dos métodos utilizados para as construções filogenéticas.

A partir da identificação dos isolados obtidos para os sítios de TPI analisados, foi possível classificar todos os grupos filogenéticos em três filos distintos, sendo, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*, estes últimos os que reuniram a maioria das sequências. Estes filos incluem milhares de representantes e correspondem de 90 a 95% de todas as espécies bacterianas conhecidas atualmente (NUNES, 2006).

Em estudos recentes realizados com o objetivo de estimar a diversidade bacteriana nos solos de TPI por meio de técnicas moleculares independentes de cultivo, Cannavan (2007) reportaram que o filo *Firmicutes* foi o mais dominante em sítios de TPI da Amazônia Central, representando aproximadamente 38% do total de sequências analisadas. De modo distinto, este estudo revelou a dominância de espécies do filo *Proteobacteria* isoladas a partir de meio seletivo para bactérias degradadoras de compostos aromáticos. Este filo inclui espécies do gênero *Pseudomonas*, extensamente descrita como dominante entre os gêneros bacterianos envolvidos em processos funcionais de mineralização de hidrocarbonetos no solo (MA et al., 2006), com vários isolados identificados nos quatro solos de TPI analisados neste estudo.

O filo *Proteobacteria* constitui o maior e mais diverso grupo de bactérias cultivadas, apresentando grande diversidade de morfologia e metabolismo, com cinco grandes subdivisões: *Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria* e *Gamaproteobacteria*. A dominância deste filo bacteriano ocorre geralmente em solos cultivados (NUSSLEIN; TIEDJE, 1999) e contaminados com metais pesados (SANDAA et al., 2001), que geralmente apresentam um pH mais elevado em relação ao solo de floresta. Neste estudo, as subdivisões *Alfa*, *Beta* e *Gamaproteobacteria* foram encontradas nos isolados dos sítios de TPI, sendo que a subdivisão *Betaproteobacteria* somente foi identificada nos solos do Caldeirão.

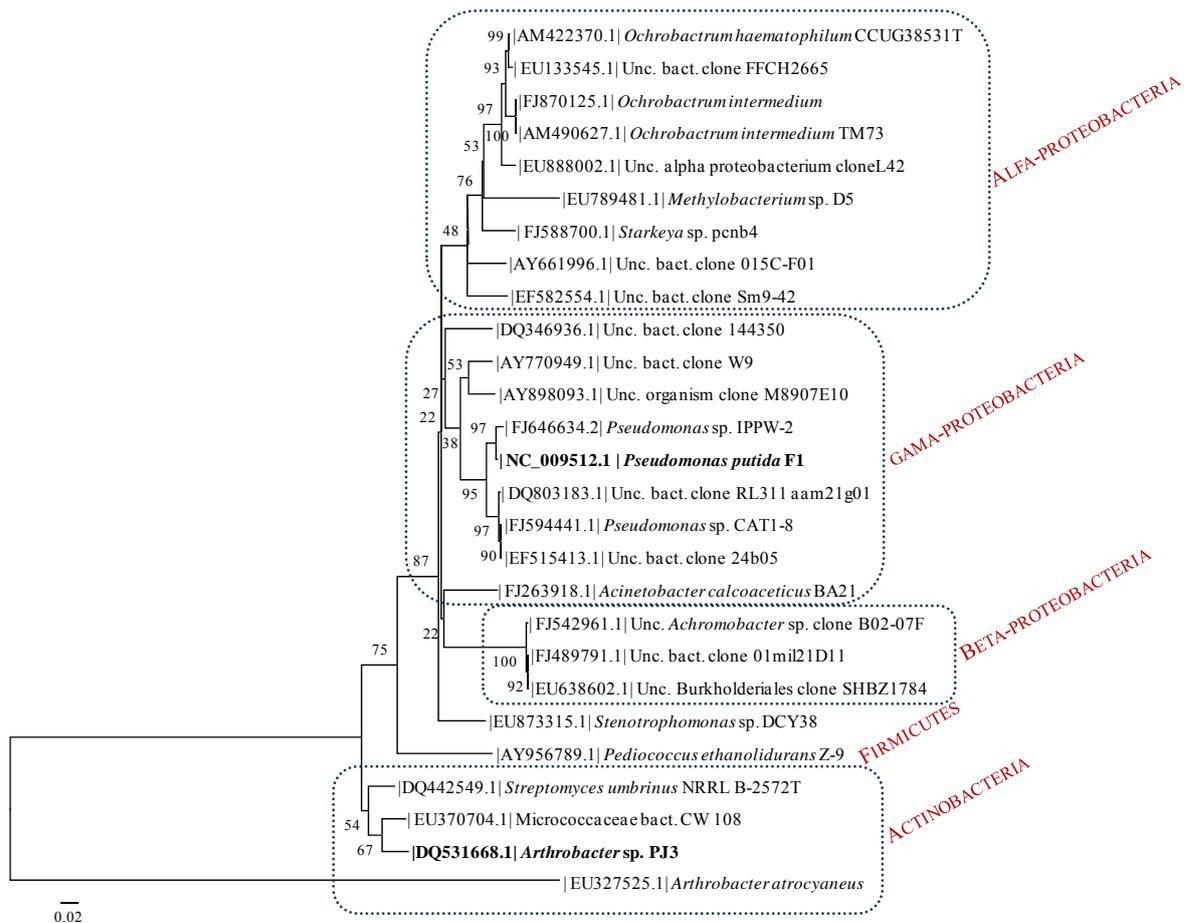


Figura 2.14 - Relações filogenéticas entre as seqüências de nucleotídeos do gene 16S rRNA dos isolados obtidos a partir do sítio Caldeirão-Capoeira. Números na árvore indicam valores de reamostragem (*bootstrap*). Seqüências de referência retiradas do banco de dados (GenBank) em negrito. Nomes de estirpes e números de acesso estão indicados na árvore

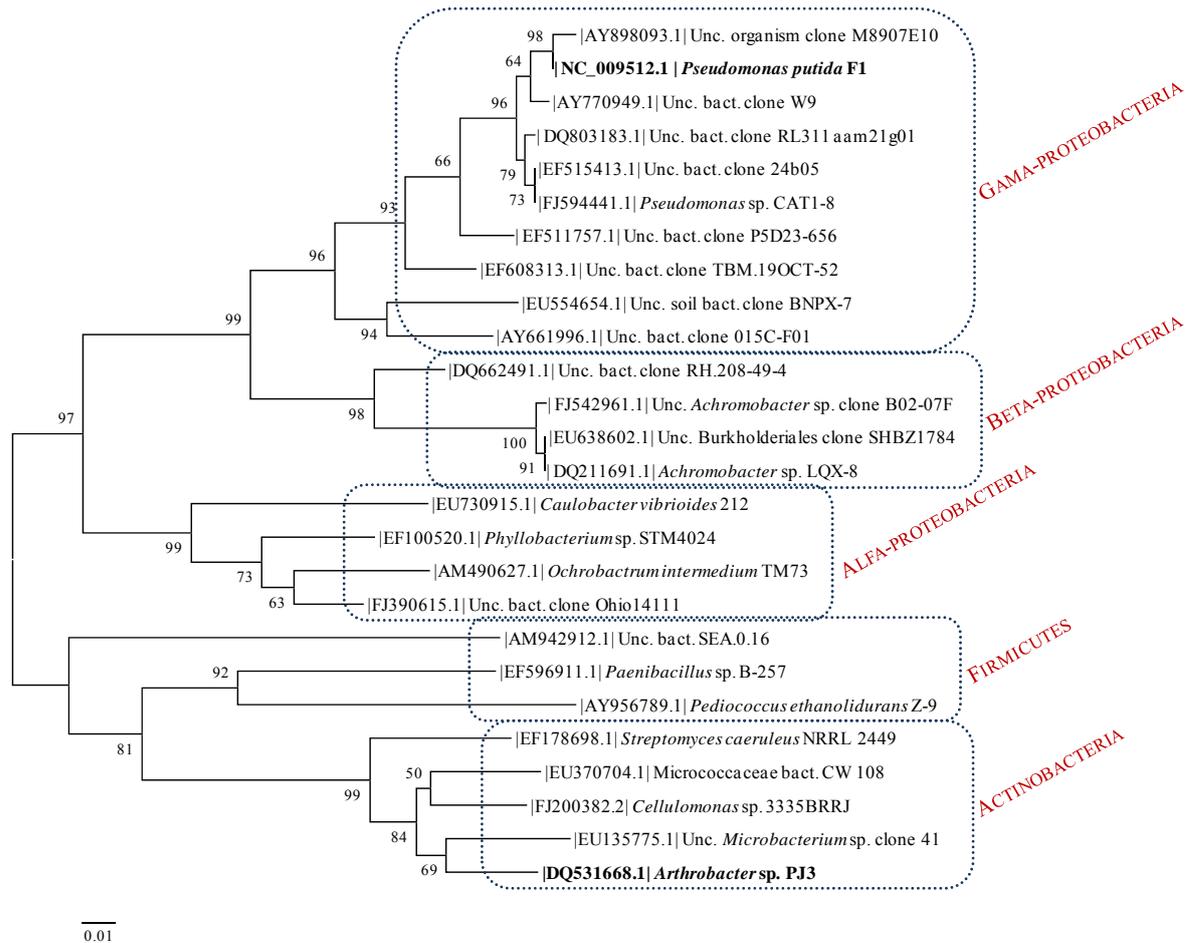


Figura 2.15 - Relações filogenéticas entre as sequências de nucleotídeos do gene 16S rRNA dos isolados obtidos a partir do sítio Caldeirão-Cultivado. Números na árvore indicam valores de reamostragem (*bootstrap*). Sequências de referência retiradas do banco de dados (GenBank) em negrito. Nomes de estirpes e números de acesso estão indicados na árvore.

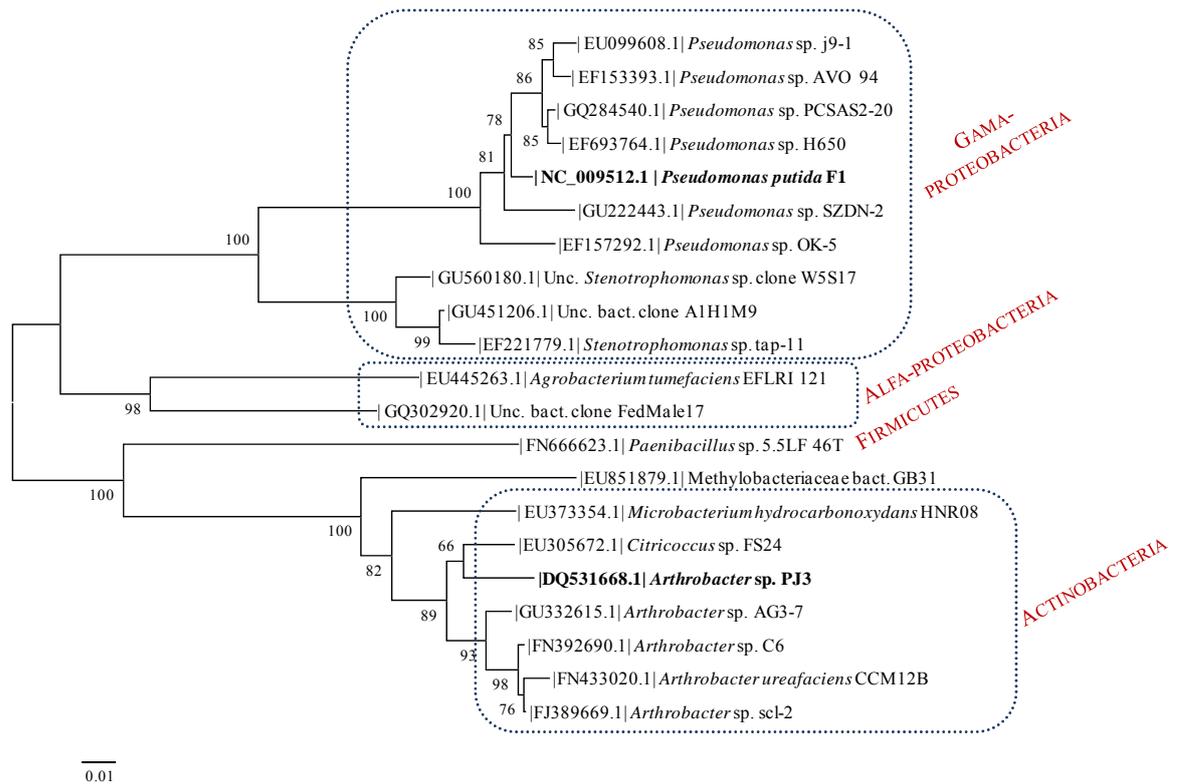


Figura 2.16 - Relações filogenéticas entre as sequências de nucleótidos do gene 16S rRNA dos isolados obtidos a partir do sítio Costa do Açutuba. Números na árvore indicam valores de reamostragem (*bootstrap*). Sequências de referência retiradas do banco de dados (GenBank) em negrito. Nomes de estirpes e números de acesso estão indicados na árvore

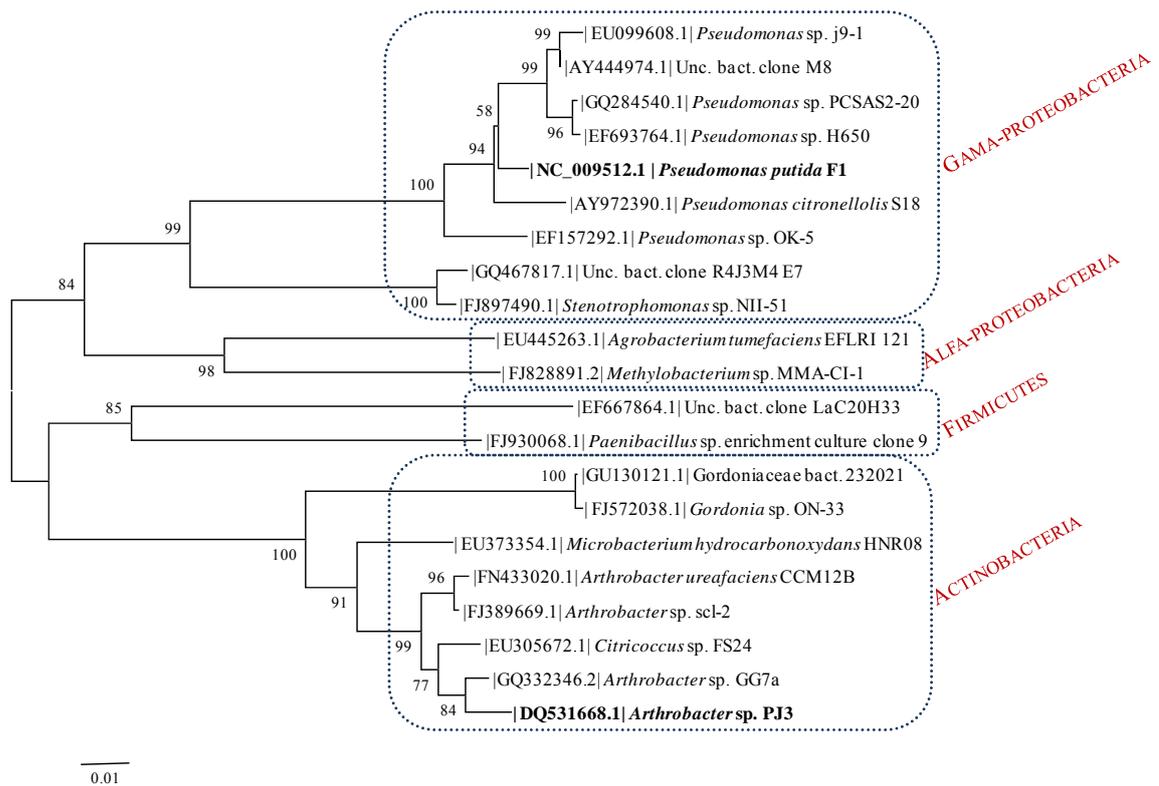


Figura 2.17 - Relações filogenéticas entre as sequências de nucleotídeos do gene 16S rRNA dos isolados obtidos a partir do sítio Hatahara. Números na árvore indicam valores de reamostragem (*bootstrap*). Sequências de referência retiradas do banco de dados (GenBank) em negrito. Nomes de estirpes e números de acesso estão indicados na árvore

O filo *Actinobacteria* possui representantes amplamente distribuídos tanto em ecossistemas aquáticos quanto terrestres (CHUN et al., 2000), que possuem importante função na decomposição da matéria orgânica e na formação do húmus (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983), além da produção de extensa gama de antibióticos. Este filo também reuniu muitos isolados identificados no presente trabalho, como os representantes do gênero *Arthrobacter*, dominante nos solos do sítio de TPI do Caldeirão tanto sob capoeira quanto sob cultivo agrícola. Este gênero bacteriano tem sido descrito, entre outras atividades funcionais, como um micro-organismo com elevado potencial para degradação de compostos fluoroaromáticos, altamente recalcitrantes no ambiente, derivados principalmente de agroquímicos e produtos farmacêuticos (SCHLOMANN et al., 1990).

Paralelamente, o gênero *Firmicutes*, com representantes gram-positivos aeróbicos e anaeróbicos, é constituído por organismos que apresentam metabolismo caracterizado por homo e heterofermentação e respiração. São bactérias com baixa porcentagem de G+C no seu DNA e com vários representantes formadores de esporos, estratégia utilizada para sobrevivência em condições de limitação de água e nutrientes. Pode constituir o filo dominante em ambientes com baixa competição, mas também pode ser encontrado em ambientes instáveis, que estejam passando por grandes transições (ATLAS; BARTHA, 1997).

O domínio *Bacteria* compreende atualmente 23 filos distintos, com base na sequência do gene ribossomal 16S rRNA (GARRITY et al., 2004). Segundo Lewinsohn e Prado (2002), estima-se que no Brasil exista um número entre 300 a 450 espécies de bactérias descritas e conhecidas, enquanto que, mundialmente, o número de bactérias descritas seja em torno de 5000 espécies. Estes números, relativamente pequenos em relação à quantidade imensurável de espécies estimadas no solo, representam apenas uma pequena fração da diversidade bacteriana, principalmente nos solos tropicais da Amazônia.

Nesse contexto, estes resultados demonstram o imenso potencial das bactérias dos solos de TPI para processos de importância biotecnológica. A natureza bastante singular destes solos pode favorecer o desenvolvimento de novas vias metabólicas a partir dos micro-organismos, com capacidade competitiva em ações de biorremediação e biodegradação de ambientes impactados. Além disso, a vasta diversidade genética dos micro-organismos presentes nestes solos antrópicos pode fornecer dados para futuros estudos visando a bioprospecção de genes a partir de DNA total do solo.

O ensaio de enriquecimento a partir dos solos TPI permitiu a formação de um banco de germoplasma de micro-organismos que pode ser aproveitado em análises envolvendo *screening* de bactérias com grande diversidade metabólica, além de testes envolvendo outros subprodutos bacterianos, como a produção de antibióticos e outros fármacos. Da mesma forma, os dados obtidos podem elucidar as bases da participação funcional destes organismos na manutenção das características favoráveis a agricultura nestes solos de formação antropogênica, além de seu papel como bioindicadores da saúde dos solos tropicais na região amazônica.

2.3 Conclusões

A partir dos resultados do sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S foi possível observar a predominância de gêneros bacterianos estreitamente relacionados a processos de biodegradação, como por exemplo, *Pseudomonas* e *Arthrobacter*, além de representantes dos gêneros *Paenibacillus*, *Achromobacter* e *Ochrobactrum*. Paralelamente, o ensaio de enriquecimento em microcosmos possibilitou o isolamento de inúmeras bactérias não cultivadas (clones ambientais), principalmente nos solos dos sítios do Caldeirão. Por outro lado, nos sítios Hatahara e Costa do Açutuba foram isoladas principalmente bactérias cultiváveis, em sua maioria dos gêneros *Pseudomonas* e *Arthrobacter*.

Este fato parece ser estocástico, mas pode estar diretamente relacionado a diferenças nos atributos químicos do solo e no sistema de uso da terra, bastante distintos para os quatro sítios analisados. Os solos do Caldeirão consistem em TPI sob capoeira, sem perturbação a mais de 20 anos, e sob cultivo agrícola conservacionista a mais de 30 anos, enquanto que os solos do Hatahara e Costa do Açutuba compreendem sítios bastante perturbados por atividade agrícola, principalmente agricultura de subsistência.

As Terras Pretas, apesar de serem solos com horizonte superficial antrópico, não possuem hidrocarbonetos aromáticos em nível de contaminação, como ambientes impactados com petróleo e seus derivados. Entretanto, são solos com níveis elevados de matéria orgânica e grande quantidade de carvão pirogênico, com capacidade de adsorção de substâncias e resiliência no ambiente. O carvão pirogênico constitui o principal atributo que diferencia as TPI dos solos de origem, sendo elemento fundamental na biogeoquímica destes solos. Assim, a presença de carvão pirogênico imprime grande impacto sobre a dinâmica de nutrientes do

solo e os processos ecológicos. Da mesma forma, a enorme quantidade de carvão e suas características químicas impactam diretamente a diversidade das populações microbianas nos solos TPI; o que ainda permanece pouco elucidado é qual a medida da interação destes micro-organismos com o carvão pirogênico.

A floresta amazônica comporta uma enorme variabilidade na composição da sua cobertura vegetal, abrigando inúmeras espécies de árvores e plantas de menor porte, com grande diversidade de produtos do metabolismo secundário, que envolve exsudatos vegetais aromáticos de todas as classes, como derivados benzênicos com grande variação na composição de sua estrutura. Além disso, as áreas agricultáveis de TPI também possuem grande variabilidade de cobertura do solo, e essa diversidade, tanto na composição vegetal como nas propriedades químicas destes solos, deve estar diretamente relacionada à extensa diversidade biológica da microbiota presente em TPI.

Desta forma, os dados obtidos a partir do isolamento de micro-organismos com capacidade metabólica para degradação de compostos aromáticos podem servir como ponto de partida para outros estudos, envolvendo a bioprospecção de genes funcionais relacionados a vias metabólicas de interesse comercial, além de testes envolvendo o uso competitivo desta microbiota para fins de biorremediação de ambientes. Os resultados demonstram o extenso potencial metabólico dos solos TPI, visto que pouco se sabe até o presente sobre a possibilidade de aplicação de micro-organismos de solos de formação antropogênica em processos de biodegradação.

Recentemente, técnicas metagenômicas têm permitido o isolamento de novos genes a partir do ambiente (KIMURA, 2006). A combinação destas técnicas com métodos de enriquecimento e cultivo pode aumentar a possibilidade de acessar genes funcionais ainda desconhecidos em amostras ambientais como as TPI, por meio de novas abordagens, que deverão considerar tanto o isolamento de micro-organismos quanto à bioprospecção de genes-alvo funcionalmente importantes.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.L. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403-410, 1990.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. Microbial evolution and biodiversity: the origins of life. In: ATLAS, R.M.; BARTHA, R. (Ed.). **Microbial ecology: fundamentals and applications**. 4. ed. Menlo Park: Book News, 1997. p. 37-39.

BAMFORTH, S.M.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, Oxford, v. 80, n. 7, p. 723-736, 2005.

BHATTACHARYA, D.; SARMA, P.M.; KRISHNAN, S.; MISHRA, S., LAL, B. Evaluation of genetic diversity among *Pseudomonas citronellolis* strains isolated from oily sludge contaminated sites. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 1435–1441, 2003.

CANNAVAN, F.S. **Diversidade das comunidades bacterianas em solos de terra preta antropogênica da Amazônia Central e Oriental**. 2007. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

CHUN, J.; BAE, K. S.; MOON, E. Y.; JUNG, S. O.; LEE, H. K.; KIM, S. J. *Nocardiosis kunsanensis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from a salt-ern. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50:1909-1913.

Connors, M.A; Barnsley E.A. Naphthalene plasmids in pseudomonads. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 149, p. 1096-1101, 1982.

CUNHA, T.J.F.; NOVOTNY, E.H.; MADARI, B.E.; BENITES, V.M.; MARTIN-NETO, L.; SANTOS, G.A. O carbono pirogênico. In: TEIXEIRA, W.G.; KERN, D.C.; MADARI, B.E.; LIMA, H.N.; WOODS, W. (Ed.). **As Terras Pretas de Índio da Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009. 420 p.

DENEVAN, W. Comments on prehistoric agriculture in Amazônia. **Culture & Agriculture**, Berkeley, v. 20, n. 2-3, p. 54-59, 1998.

EWING, B.; GREEN, P. Based-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HIJJER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Based-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 175-185, 1998.

FALCÃO, N.; MOREIRA, A.; COMENFORD, N. B. A fertilidade dos solos de Terra Preta de Índio da Amazônia Central. In: TEIXEIRA, W.G.; KERN, D.C.; MADARI, B.E.; LIMA, H.N.; WOODS, W. (Ed.). **As Terras Pretas de Índio da Amazônia: sua caracterização e uso**

deste conhecimento na criação de novas áreas. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009. 420 p.

FAUTH, J.E.; BERNARDO, J.; CAMARA, M.; RESETARITS Jr., W.J.; VAN BUSKIRK, J.; McCOLLUM, S.A. Simplifying the jargón of community ecology: a conceptual approach. **The American Naturalist**, Chicago, v. 147, n. 2, p. 282-286, 1996.

FURUKAWA, K.; MATSUMURA, F.; TONOMURA, K. Alcaligenes and Acinetobacter strains capable of degrading polychlorinated biphenyls. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 42, p. 543-548, 1978.

GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T.G. **Taxonomic outline of the prokaryotes**. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2. ed. Release 5.0. New York: Springer, 2004.

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

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T. Ecology of actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, PaloAlto, v. 37, p. 189-216, 1983.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a geographic tool for sequence finishing. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 195-202, 1998.

GROSSMAN, J.; O'NEILL, B.; TSAI, S.M.; LIANG, B.; NEVES, E.G.; LEHMANN, J. Amazonian anthrosols support similar microbial communities that differ distinctly from those extant in adjacent, unmodified soils of the same mineralogy. **Microbial Ecology**, Heidelberg, v. 60, p. 192-205, 2010.

HEAD, I.M.; JONES, D.M.; ROLING, W.F. Marine microorganisms make a meal of oil. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, p. 173-182, 2006.

IRVINE, V.A.; KULAKOV, L.A.; LARKIN, M.J. The diversity of extradiol dioxygenase (edo) genes in cresol degrading rhodococci from a creosote-contaminated site that express a wide range of degradative abilities. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 78, p. 341-352, 2000.

KIMURA, N. Metagenomics: access to unculturable microbes in the environment. **Microbes and Environments**, Tokyo, v. 21, p. 201-215, 2006.

KURTBOKE, D.I.; SWINGS, J.; STORMS, V. **Microbial genetic resources and biodiscovery**. Egham, UK: WFCC Publications, 2004. 400 p.

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.

LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.I. Estimativas de biodiversidade brasileira. In: LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.I. (Ed.). **Biodiversidade brasileira**: síntese do estado atual do conhecimento. São Paulo: Contexto, 2002. p. 91.

LEYS, N.M.; RYNGAERT, A.; BASTIAENS, L.; VERSTRAETE, W.; TOP, E.M.; SPRINGAEL, D. Occurrence and phylogenetic diversity of Sphingomonas strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 70, p. 1944–1955, 2004.

LEYS, N.M.; RYNGAERT, A.; BASTIAENS, L.; WATTIAU, P.; TOP, E.M.; VERSTRAETE, W.; SPRINGAEL, D. Occurrence and community composition of fast-growing Mycobacterium in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 51, p. 375-388, 2005.

LIANG, B.; LEHMANN, J.; SOLOMON, D.; KINYANGI, J.; GROSSMAN, J.; O'NEILL, B.; SKJEMSTAD, J.O.; THIES, J.; LUIZÃO, F.J.; PETERSEN, J.; NEVES, E.G. Black carbon increases cation exchange capacity in soils. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 70, p. 1719–1730, 2006.

LIANG, B.; LEHMANN, J.; SOHI, S.P.; THIES, J.E.; O'NEILL, B.; TRUJILLO, L.; GAUNT, J.; SOLOMON, D.; GROSSMAN, J.; NEVES, E.G.; LUIZÃO, F.J. Black carbon affects the cycling of non-black carbon in soil. **Organic Geochemistry**, Amsterdam, v. 41, p. 206–213, 2010.

MA, Y.; WANG, L.; SHAO, Z. Pseudomonas, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 455-465, 2006.

NAIR, D.; FERNANDEZ-ACERO, F.J.; GARCIA-LUQUE, E.; RIBA, I.; DEL VALLS, T.A. Isolation and characterization of naphthalene-degrading bacteria from sediments of Cadiz area (SW Spain). **Environmental Toxicology**, New York, v. 23, p. 576–582, 2008.

NEUBAUER, S.C.; EMERSON, D.; MEGONIGAL, J.P. Life at the energetic edge: kinetics of circumneutral iron oxidation by lithotrophic iron-oxidizing bacteria isolated from the wetland-plant rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, p. 3988-3995, 2002.

NEVES, E.G.; PETERSEN, J.B.; BARTONE, R.N.; SILVA, C.A. The Historical and Social Origins of Amazonian Terras Pretas. In: LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GLASER, B.; WOODS, W.I. (Ed.). **Amazonian Dark Earths**: Origin, properties & management. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 1-45.

NUBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; KUHL, M.; MUYZER, G. Quantifying microbial diversity: morphotypes, 16S rRNA genes and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 422-443, 1999.

NUNES, G.L. **Diversidade e estrutura de comunidades de Bacteria e Archaea em solo de mangue contaminado com hidrocarbonetos de petróleo**. 2006. 84 p. Dissertação (Mestrado

em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

NUSSLEIN, K.; TIEDJE, J.M. Soil bacterial community shift correlated with change from Forest to pasture vegetation in a tropical soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 422-443, 1999.

OREMLAND, R.S.; STOLZ, J.F. The ecology of arsenic. **Science**, Washington, DC, v. 300, p. 939-944, 2003.

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. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor. **Science of the Total Environment.**, Jan;78:117-30, 1989.

SANCHEZ, P.A.; VILLACHICA, J.H.; BANDY, D.E. Soil fertility dynamics after clearing tropical rainforest in Peru. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 47, p. 1171-1178, 1983.

SANDAA, R.A.; TORSVIK, V.; ENGER, O. Influence of long-term heavy-metal contamination on microbial communities in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.33, n.3, p.287-295, 2001.

SCHLOMANN, M.; FISCHER, P.; SCHMIDT, E.; KNACKMUSS, H.J. Enzymatic formation, stability, and spontaneous reactions of 4-fluoromuconolactone, a metabolite of the bacterial degradation of 4-fluorobenzoate. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 172, p. 5119–5129, 1990.

SPAIN, J.C.; GIBSON, D.T. Oxidation of substituted phenols by *Pseudomonas putida* F1 and *Pseudomonas* sp. strain JS6. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 54, p. 1399-1404, 1988.

STACH, J.E.M.; MALDONADO, L.A.; MASSON, D.G.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M.; BULL, A.T. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 6189-6200, 2003.

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.

TEIXEIRA, W.G.; MARTINS, G.C.; MACEDO, R.S.; NEVES-JUNIOR, E.F.; MOREIRA, A.; BENITES, V.M.; STEINER, C. As propriedades físicas e hídricas dos horizontes antrópicos das Terras Pretas de Índio na Amazônia Central. In: TEIXEIRA, W.G.; KERN, D.C.; MADARI, B.E.; LIMA, H.N.; WOODS, W. (Ed.). **As Terras Pretas de Índio da Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009. 420 p.

TSAI, S.M.; CANNAVAN, F.S.; SILVA JUNIOR, J.P.; CHAVES, M.G.; PASSIANOTO, C.C.; BORGES, C.P. Diversidade bacteriana em terra preta de índio baseada em seqüenciamento do gene 16S rRNA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29., 2003, Ribeirão Preto. Resumos... Ribeirão Preto: SBCS, 2003. 1 CD-ROM.

WEISBURG, W.G.; BARNES, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WHYTE, L.G.; BOURBONNIERE, L.; GREER, C.W. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 3719–3723, 1997.

WOODS, W.I.; MCCANN, J.M. The anthropogenic origin and persistence of Amazonian Dark Earths. **Conference of Latin Americanist Geographers Yearbook**, Austin, p. 7-14, 1999.

3. DIVERSIDADE DE GENES DE DIOXIGENASES AROMÁTICAS EM SOLOS DE TERRA PRETA DE ÍNDIO E CARVÃO PIROGÊNICO

RESUMO

As dioxigenases aromáticas (ARHDs) desenvolvem um papel importante na degradação de compostos aromáticos, participando ativamente da ciclagem da matéria orgânica do solo e, portanto, na dinâmica do ciclo biogeoquímico do carbono. O objetivo deste estudo foi analisar e estimar a diversidade de genes de dioxigenases aromáticas em comunidades bacterianas presentes em solos de quatro sítios TPI e seu carvão pirogênico, baseado na construção de bibliotecas metagenômicas contendo o gene funcional ARHD e nas medidas de heterogeneidade para cada ambiente. Os valores dos índices de heterogeneidade de *Shannon* e *Simpson* revelaram maior diversidade nas bibliotecas do carvão pirogênico em relação aos solos de TPI. As relações filogenéticas entre as sequências encontradas neste estudo e as sequências do banco de dados (NCBI) revelaram a formação de grupos bastante heterogêneos, com vários *clusters* incluindo dioxigenases unicamente encontradas nos solos TPI e no carvão pirogênico. Apesar dos diferentes sistemas de uso da terra predominantes nos sítios analisados, foi possível observar que a diversidade bacteriana nas TPI é fortemente influenciada pelo manejo histórico destes solos, e que o carvão pode constituir uma estrutura estável para a sobrevivência de comunidades bacterianas envolvidas em processos específicos no solo.

Palavras-chave: *Bacteria*, Bibliotecas de clones, Genes catabólicos, Hidrocarbonetos aromáticos

ABSTRACT

Aromatic ring hydroxylating dioxygenases (ARHDs) develop an important role in the degradation of aromatic compounds, actively participating in the cycling of soil organic matter and therefore in the dynamics of carbon biogeochemical cycle. The aim of this study was to analyze and estimate the diversity of aromatic dioxygenases genes in bacterial communities in Amazonian Dark Earth (ADE) soils and black carbon, based on the construction of metagenomic libraries containing the ARHD functional. The heterogeneity indexes of *Shannon* and *Simpson* revealed greater diversity in the black carbon libraries in relation to ADE soils. Phylogenetic relationships among the sequences found in this study and sequence from database (NCBI) revealed the formation of heterogeneous clusters, with several including only dioxygenases retrieved from ADE soils and black carbon. Despite different land use systems found in each analyzed site, we observed that the bacterial diversity in ADE is strongly influenced by the historical management of these soils and black carbon can provide a stable structure for the survival of bacterial communities involved in specific processes in soil.

Keywords: *Bacteria*, Clone libraries, Catabolic genes, Aromatic hydrocarbons

3.1 INTRODUÇÃO

As Terras Pretas de Índio podem conter 70 vezes mais carbono pirogênico e até três vezes mais matéria orgânica em relação aos solos adjacentes (GLASER, 2007), além de altas concentrações de nutrientes, como fósforo e potássio. A presença de carvão vegetal e substâncias húmicas aromáticas sugerem que os resíduos da combustão incompleta de matéria orgânica, como o carvão pirogênico, são peças-chave na sustentação da fertilidade nestes solos, uma vez que esta fração recalcitrante de carbono orgânico constitui uma porção considerável da matéria orgânica total da superfície de solos e sedimentos.

As dioxigenases aromáticas (ARHDs) desenvolvem um papel importante na degradação de compostos aromáticos, participando ativamente da ciclagem da matéria orgânica do solo e, portanto, na dinâmica do ciclo biogeoquímico do carbono (BECHER et al., 2000; KASUGA et al., 2001; IIDA et al., 2006). Estas enzimas multicomponentes consistem de uma cadeia de transporte de elétrons e uma oxigenase terminal com duas subunidades (KIM et al., 2006), e estão envolvidas na etapa de oxidação inicial de hidrocarbonetos aromáticos, considerada crucial nos processos de biodegradação bacteriana.

As ARHDs são responsáveis pela incorporação de dois átomos de oxigênio nos anéis aromáticos, resultando na formação de cis-diidrodiol, que é então processado até a mineralização total dos hidrocarbonetos. A subunidade maior ou alfa da oxigenase terminal é o componente enzimático responsável pelo reconhecimento do substrato, além de ser muito utilizada para estudos de diversidade funcional por refletir afiliação filogenética, uma vez que é relativamente mais conservada que os outros componentes da enzima (KAUPPI et al., 1998; NAM et al., 2001).

Estudos envolvendo dioxigenases aromáticas presentes em ambientes impactados e prístinos podem favorecer a compreensão das relações funcionais e evolucionárias entre estes genes bacterianos, e o conhecimento da extensão da atividade enzimática pode ser utilizado na aplicação destas enzimas em processos específicos, como bioconversão e biorremediação.

Nesse sentido, vários métodos para detecção e enumeração de genes ARHD têm sido descritos, baseados em técnicas de PCR (BALDWIN et al., 2003; SEI et al., 2004), com o objetivo de estimar a diversidade destes genes além de determinar sua transferência genética,

principalmente em estudos de biorremediação de ambientes. Existem vários trabalhos que descrevem *primers* ou sondas capazes de detectar genes de dioxigenases aromáticas no ambiente (WILSON et al., 1999; BALDWIN et al., 2003; SEI et al., 2004; IWAI et al., 2005; 2008); entretanto, a maioria tem sido utilizada para identificar sequências específicas e, desta forma, vários conjuntos de *primers* seriam necessários para acessar a diversidade destes genes em ambientes impactados por contaminantes ou por ação antrópica, como as TPI.

Recentemente, Bellicanta e Pellizari (2004) desenvolveram conjuntos de *primers* degenerados baseados na subunidade alfa de dioxigenases aromáticas, para detectar e analisar a diversidade funcional de genes catabólicos em sedimentos do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, em São Paulo, Brasil (BELLICANTA, 2004). Estes *primers* amplificam uma fração de aproximadamente 300 pb da subunidade maior das ARHDs, cuja variabilidade é suficiente para estimar a diversidade genética destes genes a partir de amostras ambientais.

O objetivo deste estudo foi analisar e estimar a diversidade de genes de dioxigenases aromáticas em comunidades bacterianas presentes em solos de TPI e carvão pirogênico, baseado na construção de bibliotecas metagenômicas contendo o gene funcional ARHD e nas medidas de heterogeneidade para cada ambiente.

O carvão pirogênico compõe a porção remanescente da combustão incompleta da biomassa e constitui uma fração considerável da matéria orgânica total da superfície de solos e sedimentos (JOHNSEN; KARLSON, 2007), sendo altamente resistente à decomposição. Devido a sua estrutura aromática, o carvão pirogênico é química e microbiologicamente estável e persiste no ambiente por séculos, e sua oxidação ao longo do tempo produz grupos carboxílicos que aumentam a capacidade de retenção de nutrientes dos solos (GLASER et al., 2001). Além disso, o carvão possui características fortemente adsorventes, devido à presença de nanoporos na sua estrutura, podendo constituir um nicho de sobrevivência para micro-organismos.

Nesse sentido, torna-se importante analisar a diversidade de genes funcionais na comunidade microbiana presente tanto nas TPI quanto no carvão pirogênico, previamente separado a partir do solo, para avaliar principalmente a medida da participação do carvão na manutenção de comunidades bacterianas que atuam em processos específicos no solo. Os resultados poderão somar informação relativa à biodiversidade de solos tropicais de formação

antrópica como as TPI, além gerar dados indicativos do uso positivo de resíduos vegetais carbonizados como condicionadores do solo no Brasil.

3.2 Desenvolvimento

A abordagem mais utilizada para o estudo de comunidades microbianas em amostras ambientais é baseada na amplificação, clonagem e sequenciamento de genes presentes nos organismos, os quais são utilizados para identificação filogenética (JESUS, 2008) ou como indicativos de atividade funcional entre os membros da comunidade. Desta forma, as bibliotecas genômicas consistem em coleções de sequências de DNA, construídas considerando-se o material genético de qualquer organismo, bem como sequências obtidas a partir de amostras ambientais (TINGRE; RUBIN, 2005).

Brevemente, o processo de construção de bibliotecas genômicas consiste na extração do DNA/RNA dos organismos da comunidade; as sequências de interesse são amplificadas por PCR ou transcriptase reversa (para o caso de RNA) e os fragmentos amplificados são clonados em vetores, geralmente plasmídeos, que são inseridos em células competentes de *Escherichia coli*, onde são multiplicados. O vetor é então extraído das células e o fragmento clonado é finalmente sequenciado. As sequências geradas a partir das diferentes cópias do gene e sua comparação com bases de dados podem fornecer informação sobre a diversidade filogenética dos organismos (JESUS, 2008) e suas possíveis funções no solo, como também são utilizadas para o cálculo de índices de diversidade e estimadores de riqueza de espécies presentes na comunidade microbiana (BENSON et al., 2005; CURY, 2006; COLE et al., 2007).

3.2.1 Material e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, CENA/USP, Piracicaba-SP.

3.2.1.1 Áreas de estudo

Os solos de Terra Preta de Índio analisados neste estudo foram os mesmos analisados anteriormente (item 2.2.1.1), coletados em quatro sítios distintos na região central da Amazônia Ocidental, situados nas proximidades de Manaus-AM, sendo dois sítios na Estação Experimental do Caldeirão, na Embrapa CPAA (Iranduba-AM), o sítio Caldeirão-Capoeira e o Caldeirão-Cultivado, além de dois sítios de TPI mais antigos e analisados extensivamente em expedições pedo-arqueológicas, o Costa do Açutuba e o sítio Hatahara (Figura 2.1).

3.2.1.2 Amostragem dos solos

As amostras de solo foram coletadas em pontos demarcados nos quatro sítios de TPI, em várias excursões durante os anos de 2009/2010, como descrito anteriormente (item 2.2.1.2).

3.2.1.3 Caracterização genética das comunidades microbianas

Extração do DNA genômico total da comunidade microbiana a partir dos solos TPI e do carvão pirogênico

Os fragmentos de carvão pirogênico foram separados diretamente a partir dos solos de TPI, por meio do uso de lupa e pinça, e mantidos a 4°C até o momento da extração do DNA, conforme pode ser observado na Figura 3.1.

Foram escolhidas aleatoriamente três amostras de cada um dos quatro solos TPI para a separação dos fragmentos de carvão, de onde foram separadas 250 mg de carvão por repetição. Em seguida, o carvão foi macerado em cadinho de porcelana com auxílio de pistilo,

previamente esterilizados, e o material macerado foi utilizado para extração do DNA total da comunidade microbiana.

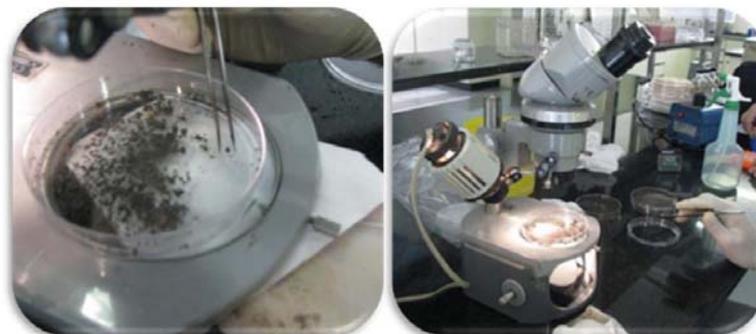


Figura 3.1 - Separação dos fragmentos de carvão pirogênico a partir dos solos TPI, com auxílio de pinça e lupa

O DNA total dos solos TPI e do carvão pirogênico foi extraído em triplicata para cada sítio analisado, após seleção aleatória de repetições, utilizando-se o *Kit Power Soil DNA extraction* (MoBio, Carlsbad, CA), de acordo com as instruções do fabricante.

Para a quantificação do material extraído, alíquotas de 5 μl foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) e coradas com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gel). Como padrão molecular foram utilizados 2 μl de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Life Technologies). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 min e depois registrado por foto-documentação.

O DNA extraído foi também quantificado em espectrofotômetro, adotando-se a relação de 1,0 densidade ótica a 260 nm (OD 260) como sendo igual a 50 ng de DNA/ μl (SAMBROOK et al., 1989).

Amplificação, por técnica de PCR, do gene da subunidade alfa de dioxigenases aromáticas (α -ARHDs) de *Bacteria* e purificação dos amplicons

O DNA total da microbiota dos solos TPI e do carvão pirogênico foi submetido à amplificação com *primers* degenerados ARHD-2F e ARHD-2R (BELLICANTA; PELLIZARI, 2004) (Tabela 3.1), que amplifica um produto de PCR de aproximadamente 300 pb. Soluções “mix” foram preparadas para as reações de amplificação com a utilização dos reagentes dNTPs (0,2 mM de cada base); tampão 10X (Tris-base a 200 mM, pH 8,4; KCl a

500 mM) (1X); MgCl₂ (1,5 mM); *Platinum Taq DNA Polymerase* (1U); os *primers* (oligonucleotídeos) (30 pmol/ reação); DNA (40 ng/reação), além de água ultra-pura estéril (Milli-Q) para volume final de 25 µL. As reações foram realizadas utilizando-se um ciclo de desnaturação inicial a 97°C por 3 min.; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min.; anelamento dos *primers* a 55°C por 1 min., e extensão a 72°C por 1 min.; um ciclo de extensão final a 72°C por 5 min. e manutenção a 4°C. Os resultados das amplificações foram verificados pela visualização dos fragmentos em gel de agarose de 8 cm x 10 cm a 1,0% e o padrão de peso molecular utilizado foi o *100pb DNA Mass Ladder*TM (Invitrogen Life Technologies).

Tabela 3.1 - *Primers* degenerados utilizados nas reações de PCR para amplificação do gene α -ARHD de *Bacteria*

<i>Primers</i>	Sequência (5' - 3')	Fragmento (pb)	Referência
ARHD-2F	TTY RYI TGY AII TAY CAY GGI TGG G	~ 300	BELLICANTA & PELLIZARI (2004)
ARHD-2R	AAI TKY TCI GCI GSI RMY TTC CA		

Os fragmentos amplificados foram excisados do gel e purificados em coluna de matriz de fibra de vidro *GFX*TM *PCR-DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), ressuspendidos em água ultra-pura (Milli-Q) e quantificados em gel de agarose a 1% utilizando o marcador de peso molecular *100pb DNA Mass Ladder*TM (Invitrogen Life Technologies), para verificação do rendimento da purificação.

Construção de bibliotecas metagenômicas contendo o gene funcional para degradação de hidrocarbonetos aromáticos

- *Clonagem dos fragmentos amplificados*

Depois do processo de purificação, 3 µL dos *amplicons* obtidos para cada solo TPI e carvão pirogênico foram quantificados em gel de agarose a 1 % com o marcador *Low DNA Mass Ladder*TM (Invitrogen Life Technologies), para determinação da quantidade de inserto a ser utilizada na ligação com o vetor. A clonagem dos fragmentos foi feita utilizando-se o kit *pGEM-T Easy Vector System* (Promega), conforme as instruções do

fabricante. A reação de ligação inserto-vetor foi realizada a 4°C, por cerca de 16 horas, e em seguida armazenada a -20°C.

Três microlitros da ligação (aproximadamente 10 ng do inserto) foram utilizados para transformar 50 µL de células quimio competentes da linhagem de *E. coli* DH5α. A quimio-transformação foi realizada adicionando-se os tubos contendo as células competentes mais a ligação em banho de gelo por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram transferidos para banho-maria a 42°C por 50 segundos e retornaram ao banho de gelo por mais 2 minutos. Após a transformação, as células transformadas foram recuperadas em 450 µL de meio SOC (Tryptona a 20 gr.L⁻¹, extrato de levedura a 5 gr.L⁻¹, NaCl a 0,58 gr.L⁻¹, MgSO₄.7H₂O a 2,46 gr.L⁻¹, MgCl₂ a 0,95 gr.L⁻¹) e incubadas a 37°C por duas horas. Em seguida, o volume total das células transformadas foi inoculado por espalhamento em placas de ágar Luria Bertani-LB (Tryptona 10 a gr.L⁻¹, extrato de levedura a 5 gr.L⁻¹ e NaCl a 5 gr.L⁻¹), contendo ampicilina, IPTG e X-Gal (estoques a 100 mg/mL), e incubadas a 37°C por 16 horas.

O vetor utilizado possui o sistema de expressão gênica induzido pelo IPTG e sinalizado pelo indicador X-Gal (*beta galactosidase*); assim, os clones que recebem o inserto ligado ao vetor transformado apresentam coloração branca e os demais sem o fragmento apresentam coloração azul (indicando a expressão do gene *lacZ*). Desta forma, as colônias brancas, correspondentes aos possíveis clones positivos, foram transferidas individualmente para placas de 96 poços contendo 50 µL de tampão TE 1X, com o auxílio de palitos autoclavados. Estas placas foram então submetidas à temperatura de 95°C por 10 minutos em termociclador, para promover a lise celular, e armazenadas a -20°C, para futuras aplicações. Foram selecionadas 200 colônias de cada sítio de TPI e 200 colônias a partir do carvão pirogênico, totalizando 1600 clones, para posterior sequenciamento dos clones.

- *Detecção do inserto nos clones e preparação das sequências para sequenciamento*

Após a clonagem e seleção das colônias brancas, a confirmação da presença do inserto foi realizada através da amplificação direta a partir do inserto diluído em TE 1X com os *primers* do vetor (promotores SP6 e T7), sem a necessidade de extração do DNA plasmidial.

O "mix" de PCR foi preparado contendo: tampão 1X (20 mM Tris - HCl, pH 8,4; 50 mM KCl), 1,5 mM de MgCl₂, 0,1 mM de dNTPs, 5 pmol/reacção de cada *primer* (SP6 e T7) e 1,5 U de *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen Life Technologies), além de água ultra-pura para volume final de 50 µL. O programa de amplificação consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos, além de um ciclo de extensão final de 72°C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1%, com padrão de peso molecular *Low DNA Mass Ladder*TM (Invitrogen Life Technologies).

Em seguida, os *amplicons* foram submetidos à purificação em placas de 96 poços, onde foram adicionados 135 µL (3 volumes) de isopropanol 100% e 45 µL (1 volume) de água ultra-pura (MilliQ), e a mistura foi homogeneizada e incubada a -20°C por uma noite. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 4000 rpm por 90 minutos à temperatura ambiente, e o sobrenadante foi totalmente descartado por inversão da placa. Adicionou-se 150 µL de etanol 70% e as placas foram novamente homogeneizadas e centrifugadas a 4000 rpm por 90 minutos à temperatura ambiente; o sobrenadante foi novamente descartado. Finalmente, as amostras foram colocadas no concentrador de DNA por 10 min, e seguiu-se a eluição em 15 µL de água ultra-pura (MilliQ). A pureza do material foi novamente verificada em gel de agarose a 1%.

Para o sequenciamento, 1 µL do produto purificado (aproximadamente 20 ng) foi utilizado na reacção de amplificação com o *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (GE Healthcare) conforme instruções do fabricante, e utilizou-se os *primers* ARHD-2F e 2R para amplificação da sequência-alvo. As reacções de sequenciamento foram purificadas adicionando-se 2 µL de uma solução de acetato de sódio a 1,5 M/EDTA a 0,25 M e, após homogeneização, adicionou-se 60 µL de etanol a 100%. As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 45 minutos em temperatura ambiente, e o sobrenadante foi descartado por inversão da placa. Adicionou-se 150 µL de etanol a 70% e a mistura foi homogeneizada e centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e os precipitados foram colocados no concentrador de DNA por 10 min. Em seguida, os produtos foram eluídos em 10 µL de formamida e sequenciados em sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

3.2.1.4 Análises das sequências, parâmetros ecológicos e medidas de diversidade, e construções filogenéticas

As sequências nucleotídicas obtidas para os solos TPI e o carvão pirogênico tiveram seus cromatogramas analisados pelos softwares BIOEDIT e *PhredPhrap-Consed*, para edição e remoção do vetor e *primers*, a fim de estabelecer as sequências *consenso* para cada clone e remover as bases com baixa qualidade. O nível de exigência mínimo foi de qualidade de bases acima de 20 (1 erro a cada 100 bases lidas). Em seguida, as sequências foram comparadas com aquelas disponibilizadas no banco de dados GenBank do Centro de Informação Biotecnológica (NCBI, USA), utilizando-se os programas Tblastx (ALTSCHUL et al., 1990) e *ORF Finder*, para confirmação dos resultados.

A ferramenta Tblastx, disponível no NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), compara sequências nucleotídicas obtidas por sequenciamento com o banco de proteínas traduzidas disponível no GenBank. Para tal, as sequências de nucleotídeos são traduzidas *in silico* pelo software conforme as sequências de *códons* que codificam os aminoácidos correspondentes, e então compara uma a uma com aquelas já depositadas.

Em seguida, todas as sequências nucleotídicas foram traduzidas *in silico* para aminoácido utilizando-se o programa BIOEDIT, onde foi observada a correção das fases de leitura correspondentes às possíveis proteínas funcionais, para posterior alinhamento e análise das sequências.

Para a análise das medidas de diversidade das bibliotecas do gene α -ARHD de *Bacteria* obtidas para os diferentes sítios de TPI estudados e o respectivo carvão pirogênico, utilizou-se o programa MOTHUR (SCHLOSS et al., 2009). A plataforma MOTHUR constitui um software abrangente, que permite aos usuários utilizar um único programa para analisar os dados de sequências de comunidades. Este pacote baseia-se em ferramentas anteriores (DOTUR, SONS, TreeClimber, LIBSHUFF, β -Libshuff e UniFrac) para fornecer um software flexível e robusto para análise de dados de sequenciamento.

O número de Famílias Protêicas Operacionais (FPOs) foi determinado considerando-se uma distância evolutiva de 0,05 através do algoritmo de *furthest neighbor*. A riqueza de FPOs foi estimada mediante o cálculo de curvas de rarefação e dos estimadores Chao1 e *Jackknife*, e a heterogeneidade das comunidades de α -ARHD foi verificada com os índices de *Shannon-Wiener* e *Simpson*. Comparações assimétricas pareadas entre diferentes bibliotecas

também foram realizadas para determinar a significância das diferenças entre elas, por meio do software J-Libshuff (SCHLOSS et al., 2004), integrado na plataforma MOTHUR.

Métodos paramétricos e não paramétricos tem sido utilizados para estimar a riqueza de espécies (filotipos) em comunidades microbianas de amostras ambientais (BOHANNAN; HUGHES, 2003; SHEN et al., 2003; CHAO et al., 2006). Estimativas do aumento de filotipos em função do número de sequências de um dado nível filogenético podem ser analisadas pelo método da rarefação, que reflete o esforço amostral de uma dada análise. Outros métodos são utilizados para estimar a riqueza de filotipos de uma dada comunidade, como o estimador de *Jackknife*, cujo calculo é baseado na frequência de espécies raras observadas na amostra, além dos métodos não-paramétrico Chao1, capaz de produzir estimativas que também variam com o número de sequências.

A primeira medida não-paramétrica para analisar a diversidade foi proposta por Simpson (1949), que sugeriu que a diversidade é inversamente reportada pela probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso pertecerem à mesma espécie. Entretanto, a medida mais popular para estimar a diversidade de espécies é o índice de *Shannon (H')* (SHANNON; WEANER, 1949), baseado na teoria da informação, sendo considerado uma medida da incerteza de que duas sequências pertençam ao mesmo filitipo ou espécie (KREBS, 1998).

Também foram construídos diagramas de Venn (FAUTH et al., 1996) para verificar as intersecções e peculiaridades entre os ambientes, identificando o número de FPOs exclusivas e compartilhadas entre os solos TPI e o carvão pirogênico.

Finalmente, a partir do agrupamento das sequências dos clones baseado na similaridade de 95% entre as sequências do mesmo grupo (*cutoff* 0,05), foram escolhidas uma representante de cada FPO para as construções filogenéticas, juntamente com as sequências de referências obtidas a partir do GenBank. O alinhamento foi realizado no programa *ClustalW* (LARKIN et al., 2007) e os agrupamentos filogenéticos foram construídos no programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007), pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987) com valor de *bootstrap* (reamostragem) de 1000 repetições.

3.2.2 Resultados e Discussão

3.2.2.1 Coleta e Caracterização dos Solos

As amostras de solo foram coletadas nos quatro sítios TPI analisados no presente trabalho (Caldeirão-Capoeira, Caldeirão-Cultivado, Costa do Açutuba e Hatahara), todos situados na região de Manaus, na Amazônia Central. Cada ambiente apresenta distintos sistemas de uso da terra, caracterizados principalmente por agricultura de subsistência e floresta secundária, comumente chamada de “capoeira”, como descritos anteriormente na Tabela 2.4.

As amostras foram coletadas na profundidade de 0-10 cm, uma vez que nesta profundidade ocorre a maioria das reações bacterianas dependentes de oxigênio, como a biossíntese e biodegradação de moléculas. A coleta das amostras foi realizada em tubos PVC, no sentido vertical, sem abertura de trincheira; posteriormente, os tubos foram vedados e acomodados em gelo seco. Após a coleta, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP, onde uma alíquota foi armazenada a -80°C para extração do DNA e futuras análises moleculares; outra alíquota foi enviada ao Laboratório de Análises Químicas da ESALQ/USP para análise das características químicas das amostras de solo.

3.2.2.2 Caracterização genética da comunidade microbiana do solo e do carvão pirogênico

Extração do DNA genômico total da comunidade microbiana a partir dos solos TPI e do carvão pirogênico

O DNA total das comunidades microbianas dos solos TPI e seu respectivo carvão pirogênico foi extraído utilizando-se o *Power Soil DNA extraction* (MoBio, Carlsbad, CA), utilizando-se três repetições para cada sítio analisado, e a verificação da qualidade do material extraído foi feita em gel de agarose a 1% (Figura 3.2). O padrão de peso molecular utilizado foi o *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen Life Technologies).

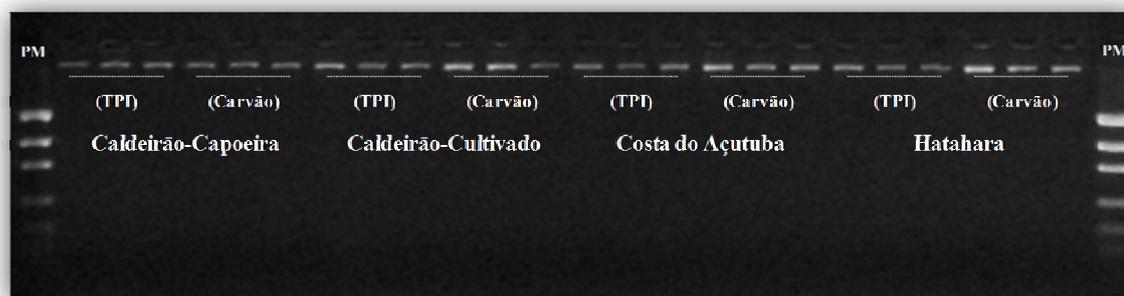


Figura 3.2 - Gel de agarose do DNA total dos solos TPI e seu respectivo carvão pirogênico. PM: padrão de peso molecular *Low DNA Mass Ladder*TM (Invitrogen Life Technologies)

A pureza e o rendimento das extrações foram satisfatórios para todos os sítios TPI e o carvão pirogênico. O material extraído foi suficiente para as amplificações por técnica de PCR e posterior construção das bibliotecas metagenômicas contendo o gene funcional α -ARHD de *Bacteria*.

Amplificação do gene α -ARHDs de *Bacteria* a partir de solos TPI e carvão pirogênico e construção das bibliotecas funcionais

Após verificação da qualidade do material extraído, foi realizada a amplificação por técnica de PCR das três repetições de cada solo e do carvão pirogênico, utilizando os *primers* ARHD-2F e 2R, e o resultado das amplificações foi verificado em gel de agarose a 1%. Como controles positivos, foram utilizadas as estirpes padrões do Banco de Culturas da Alemanha (DSMZ, German Resource Centre for Biological Material, <http://www.dsmz.de/index.htm>), como descritos na Tabela 3.2, nas mesmas condições aplicadas ao DNA dos solos e do carvão pirogênico. Todas as amostras produziram amplificação positiva para o gene α -ARHD de *Bacteria*, com um fragmento de aproximadamente 300pb (Figura 3.3).

Tabela 3.2 - Padrões DSM utilizados para o bioensaio e para as caracterizações genéticas

No. DSMZ	Micro-organismo	Metabolismo de Hidrocarbonetos
DSM 291	<i>Pseudomonas putida</i>	Utiliza hidrocarbonetos como fonte de carbono
DSM 6506	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Utiliza naftaleno como fonte de carbono
DSM 6899	<i>Pseudomonas putida</i>	Utiliza tolueno como fonte de carbono
DSM 8369	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Utiliza naftaleno como fonte de carbono

Existem vários *primers* desenvolvidos para detectar genes catabólicos para degradação de hidrocarbonetos aromáticos a partir de micro-organismos cultiváveis (KIM et al., 2006; ZHOU et al., 2006); entretanto, estes marcadores possuem limitações em relação à gama de genes enzimáticos, podendo ocorrer amplificação preferencial de um gene em detrimento de outros que podem estar presentes em amostras ambientais, e os dados de diversidade podem ser subestimados. Os *primers* utilizados no presente estudo foram satisfatórios para as amplificações de genes de dioxigenases tanto a partir de isolados bacterianos, como as estirpes padrões do banco de culturas DSMZ, como diretamente a partir do DNA total das comunidades microbianas dos solos TPI e do carvão pirogênico.

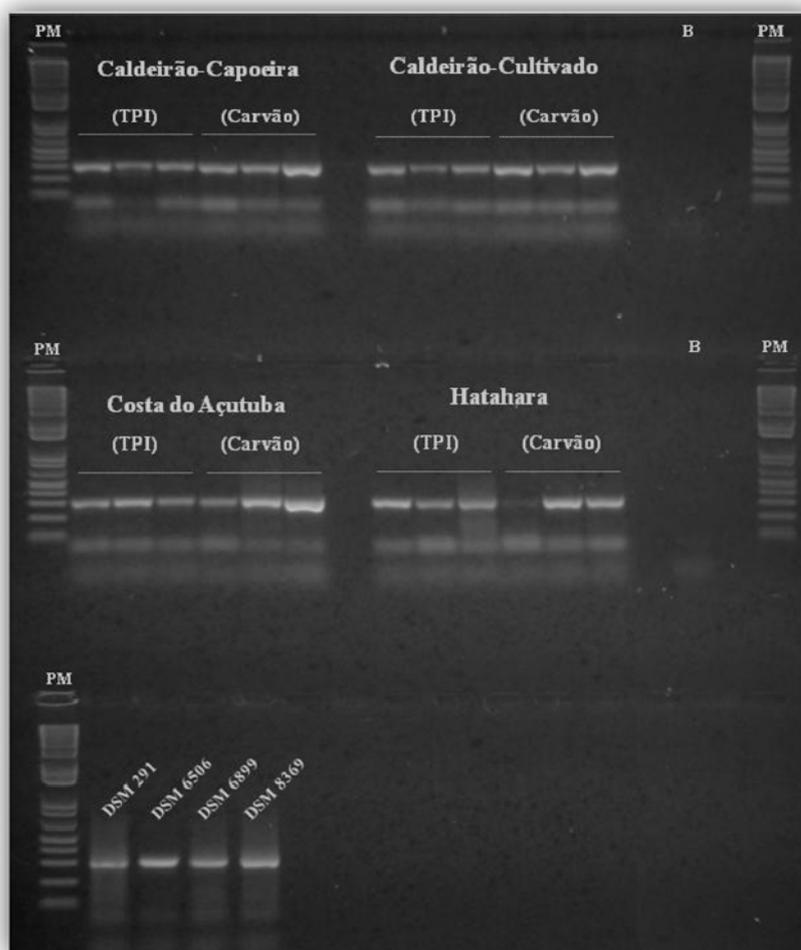


Figura 3.3 - Gel de agarose da amplificação por PCR do gene α -ARHD de *Bacteria* dos solos TPI e seu respectivo carvão pirogênico. B: controle negativo. PM: padrão de peso molecular *100pb DNA Mass Ladder*TM (Invitrogen Life Technologies)

Após a verificação da amplificação dos fragmentos correspondentes a subunidade alfa das ARHDs, as bandas correspondentes ao fragmento esperado de 300 pb foram excisadas do gel e as réplicas foram combinadas e purificadas utilizando-se o *GFX™ PCR-DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) (Figura 3.4). Foi necessário o processo de excisão das bandas a partir de gel de agarose em função da presença de bandas inespecíficas, em consequência do uso de *primers* com elevado grau de degeneração na sequência nucleotídica. As bandas inespecíficas, normalmente geradas em baixa concentração, quando concentradas podem interferir nos processos subsequentes de construção das bibliotecas e geração do banco de sequências. Em seguida, os *amplicons* purificados foram utilizados para as reações de clonagem e construção das bibliotecas funcionais.

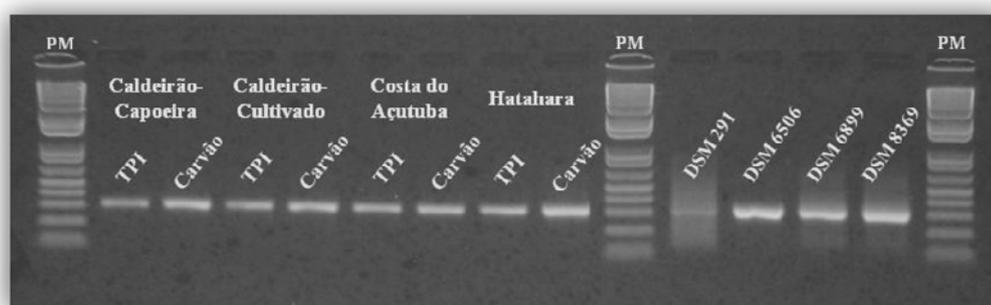


Figura 3.4 - Gel de agarose da purificação dos *amplicons* do gene α -ARHD de *Bacteria* dos solos TPI e seu respectivo carvão pirogênico. PM: padrão de peso molecular *100pb DNA Mass Ladder™* (Invitrogen Life Technologies)

Após a clonagem dos fragmentos amplificados correspondentes ao gene da subunidade alfa de dioxigenases aromáticas, foram selecionados 200 clones de cada um dos quatro sítios analisados neste estudo, além de 200 clones do carvão pirogênico separado a partir de cada solo TPI. Estes clones foram sequenciados e as sequências foram analisadas utilizando-se o software *PhredPhrap-Consed* para a remoção do vetor e edição das sequências, que posteriormente foram comparadas às sequências depositadas em banco de dados, por meio da ferramenta Tblastx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.2.2.3 Análises das sequências, parâmetros ecológicos e medidas de diversidade, e construções filogenéticas

Após análise das sequências dos clones obtidas pelo sequenciamento pelo software *PhredPhrap-Consed*, foram selecionadas aquelas cuja qualidade foi satisfatória para as análises de diversidade e as construções filogenéticas. O nível de exigência mínimo foi de qualidade de bases das sequências acima de 20 (1 erro a cada 100 bases lidas).

As sequências dos clones foram comparadas com o banco de dados do GenBank utilizando-se a ferramenta Tblastx, para confirmar as possíveis funções dos fragmentos sequenciados, considerando-se Evalues menores que 10^{-5} para classificação das prováveis proteínas. Todos os clones produziram alinhamentos significativos com sequências da subunidade alfa de dioxigenases aromáticas depositadas no GenBank, a maioria associada a genes de *Bacteria* dos gêneros *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* e *Bordetella*, além de muitos relacionados a clones ambientais não cultivados.

As Figuras 3.5 a 3.8 mostram as diferenças de diversidade entre as bibliotecas de TPI e do carvão para os sítios analisados. Nos sítios do Caldeirão é possível observar maior variedade de gêneros bacterianos nas bibliotecas do carvão para os dois sistemas de uso da terra, sugerindo que as comunidades bacterianas são heterogêneas e capazes de responder de forma distinta às características de ambientes como o carvão, que pode sustentar a sobrevivência de micro-organismos únicos.

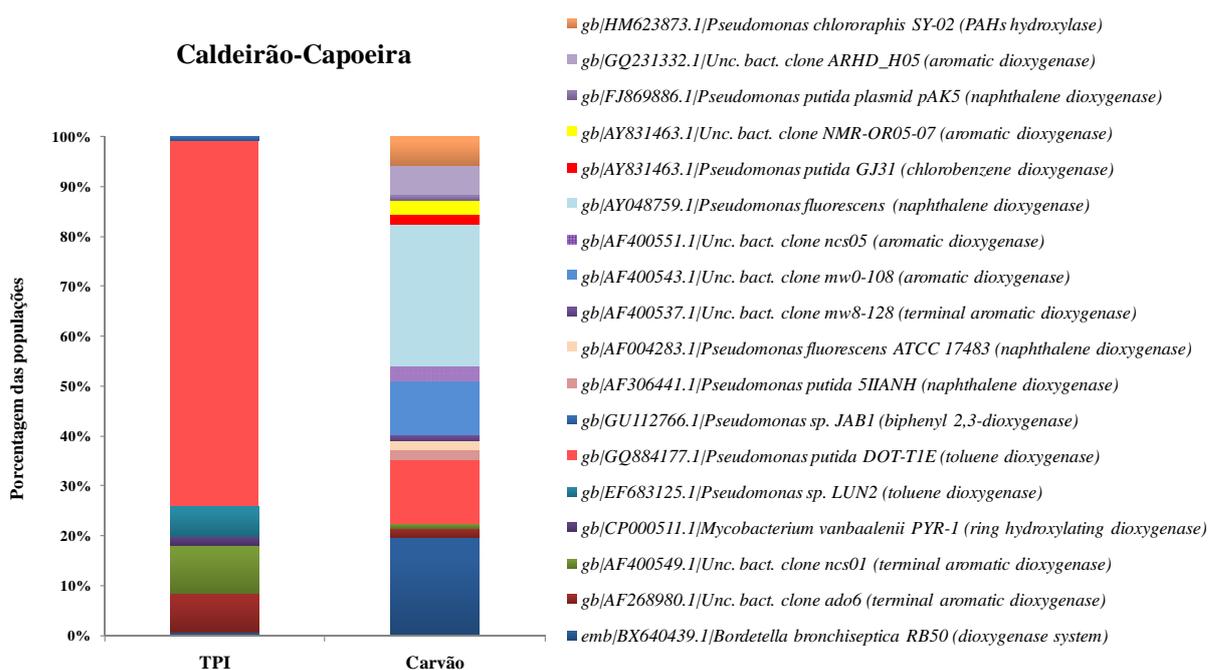


Figura 3.5 - Gráfico de classificação das bibliotecas do gene α -ARHD a partir do sítio Caldeirão-Capoeira. A classificação foi realizada utilizando-se a ferramenta Tblastx do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

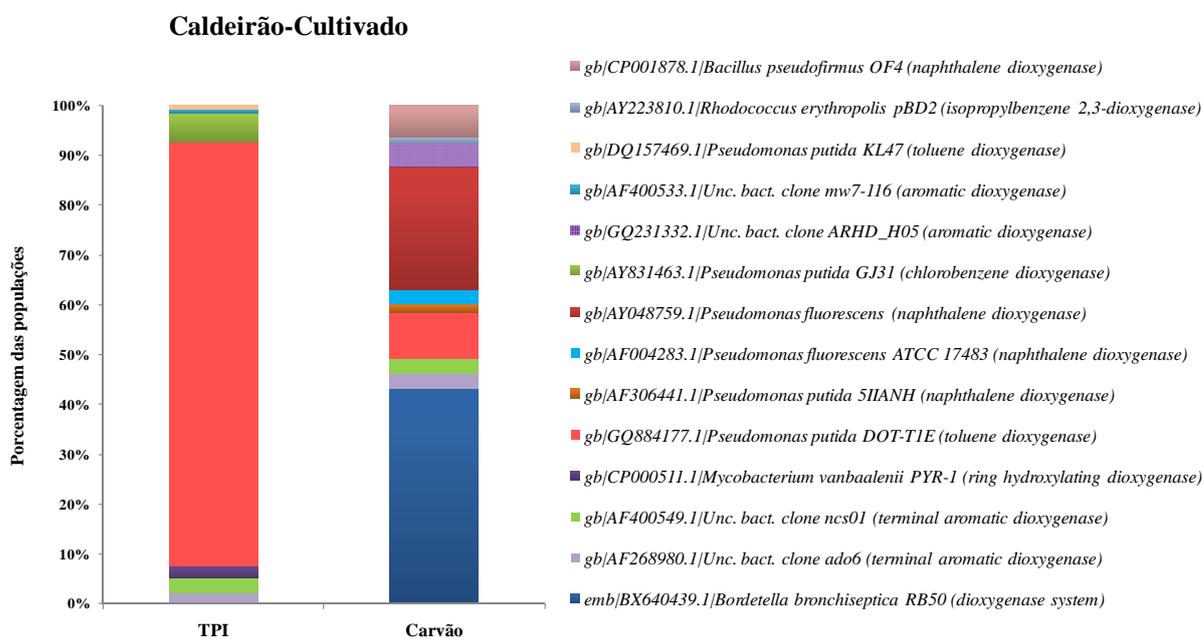


Figura 3.6 - Gráfico de classificação das bibliotecas do gene α -ARHD a partir do sítio Caldeirão-Cultivado. A classificação foi realizada utilizando-se a ferramenta Tblastx do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

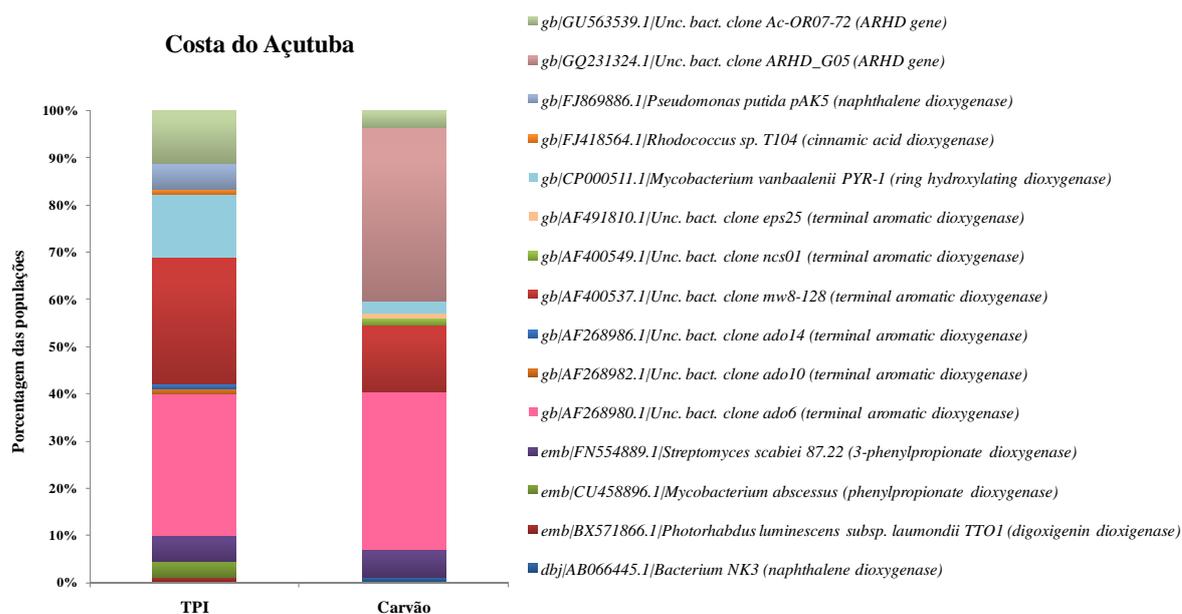


Figura 3.7 - Gráfico de classificação das bibliotecas do gene α -ARHD a partir do sítio Costa do Açutuba. A classificação foi realizada utilizando-se a ferramenta Tblastx do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

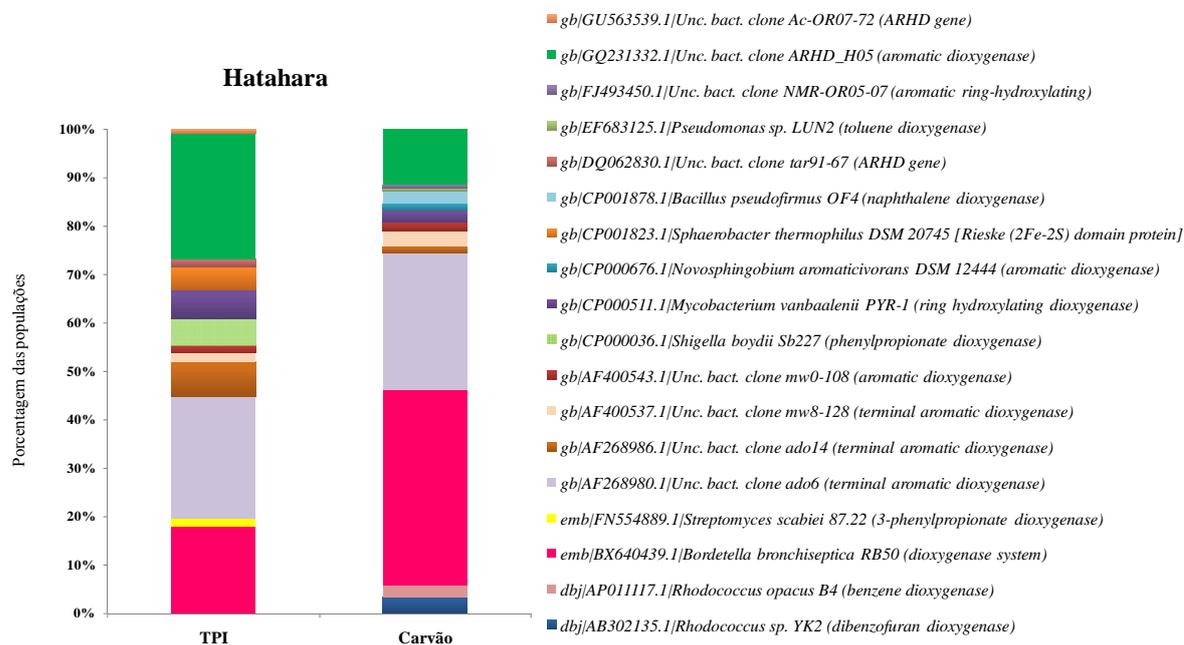


Figura 3.8 - Gráfico de classificação das bibliotecas do gene α -ARHD a partir do sítio Hatahara. A classificação foi realizada utilizando-se a ferramenta Tblastx do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Para confirmar estes resultados, utilizou-se o software MOTHUR para agrupar as bibliotecas de gene α -ARHD baseado na distância filogenética, considerando 95% de identidade entre as sequências do mesmo grupo no nível de aminoácidos (*cutoff* 0,05). Desta forma, foram identificados 20 grupos (FPOs) distintos para a biblioteca de TPI do Caldeirão-Capoeira e 29 para a biblioteca de carvão, além de 17 grupos para a TPI do Caldeirão sob cultivo e 18 para o carvão pirogênico neste sítio. Para o Hatahara, foram definidos 37 e 40 grupos, para TPI e carvão respectivamente, e 28 FPOs para a TPI e 29 para o carvão no sítio Costa do Açutuba.

Para melhor compreender as relações entre as populações bacterianas degradadoras de compostos aromáticos presentes nos solos TPI e no carvão pirogênico, todas as bibliotecas foram analisadas em função da sua heterogeneidade. A Tabela 3.3 apresenta as medidas de diversidade calculadas para as bibliotecas do gene α -ARHD de *Bacteria* analisadas neste estudo, dadas em função dos estimadores de riqueza de espécies e dos índices de diversidade.

Tabela 3.3 – Dados das bibliotecas do gene α -ARHD obtidas para cada sítio TPI analisado neste estudo, incluindo as medidas de riqueza e índices de diversidade

Sítio TPI	Biblioteca	Fonte	Clones válidos	FPOs*	Medidas de riqueza*		Índices de diversidade*		Sn*	C (%)
					Chao1	Jackknife	Shannon (H')	Simpson		
Caldeirão-Capoeira	CAP	TPI	116	20	59,00	156,32	1,85	0,25	13	90
	CCAP	Carvão	102	29	56,20	58,60	2,66	0,11	17	85
Caldeirão-Cultivado	CULT	TPI	135	17	35,33	32,85	1,62	0,29	11	93
	CCULT	Carvão	65	18	40,50	48,37	2,34	0,13	10	88
Costa do Açutuba	ATP	TPI	90	28	49,00	47,85	2,81	0,08	15	91
	ACAR	Carvão	84	29	42,33	45,00	2,60	0,15	16	86
Hatahara	HAT	TPI	123	37	58,86	58,00	3,10	0,06	18	99
	HCAR	Carvão	156	40	57,14	57,23	3,26	0,05	16	100

*Medidas de heterogeneidade calculadas com base em 95% de similaridade entre as sequências do gene α -ARHD de *Bacteria* para as bibliotecas de TPI e de carvão pirogênico (*cutoff* 0,05).

FPOs: Famílias Protêicas Operacionais. Sn: *singletons* (número de espécies com apenas um clone). C: cobertura das bibliotecas (GOOD, 1953).

A estimativa do valor máximo de FPOs em um nível filogenético pode ser feita utilizando-se métodos estatísticos capazes de extrapolar a relação de FPOs em função do número de sequências a partir da curva de rarefação ou de métodos não paramétricos. Neste estudo a riqueza de filotipos foi verificada por meio do método de rarefação ao nível de 95% (Figura 3.9) de similaridade e pelos métodos não-paramétricos de estimativa Chao1 (CHAO, 1984; 1987) e *Jackknife*.

Os resultados obtidos indicaram que o número de sequências do gene α -ARHD de *Bacteria* não foi suficiente para amostrar completamente a riqueza de espécies das comunidades microbianas dos solos TPI e do carvão pirogênico. No entanto, as curvas de rarefação revelaram as diferenças entre as bibliotecas dentro dos sítios TPI do Caldeirão, onde é possível notar claramente uma maior riqueza de FPOs nas bibliotecas do carvão pirogênico em comparação com as bibliotecas dos solos TPI. Entretanto, para os sítios Costa do Açutuba e Hatahara, a riqueza de espécies permaneceu praticamente a mesma entre as bibliotecas dos solos e do carvão. De maneira sutil, foi possível observar uma maior riqueza para a biblioteca do carvão no sítio Costa do Açutuba, sendo que no Hatahara as curvas de rarefação foram distribuídas de modo praticamente similar para ambos carvão e TPI.

Os valores do índice de heterogeneidade de *Shannon* revelaram maior diversidade nas bibliotecas do carvão pirogênico, exceto para o sítio Costa do Açutuba. Esta diferença pode ser explicada pelo fato de que as amostras do Costa do Açutuba incluem solos com histórico de elevada perturbação por práticas agrícolas, que pode alterar o padrão de diversidade em relação aos demais sítios analisados (TSAI et al., 2003), onde o carvão parece ser o principal elemento responsável pela manutenção da diversidade dos genes α -ARHD nas comunidades bacterianas. A mesma relação de diversidade de FPOs foi estabelecida entre as bibliotecas de TPI e do carvão com os valores obtidos pelo índice de diversidade de *Simpson*.

Os valores obtidos com os métodos não-paramétricos Chao1 e *Jackknife* para a estimativa de riqueza de FPOs nas bibliotecas revelaram uma interpretação inversa à obtida com os índices de diversidade para os sítios Hatahara e Caldeirão-Capoeira. A justificativa para tal interpretação pode estar no número de sequências analisadas e na equação utilizada em cada estimador. O estimador *Jackknife*, por exemplo, utiliza o valor de FPOs únicas para o cálculo da estimativa de riqueza e, como pode ser observado na Tabela 3.3, o número de clones analisados para estes sítios foi relativamente maior que os demais.

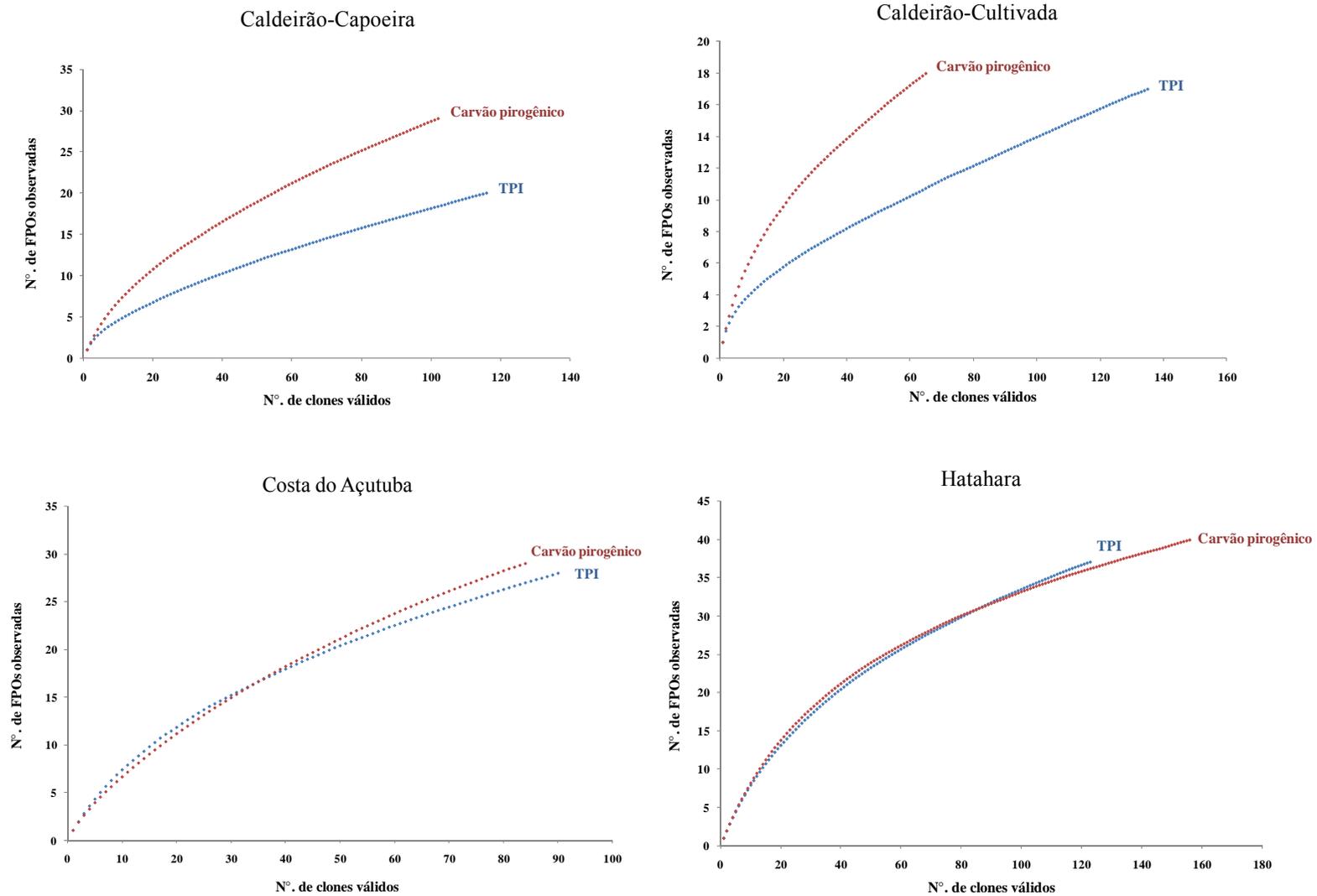


Figura 3.9 - Análise de rarefação gerada para o gene α -ARHD de *Bacteria* de bibliotecas genômicas das amostras coletadas a partir dos solos TPI e carvão pirogênico. Os clones foram agrupados em filotipos (FPOs) baseados na similaridade das sequências com nível de 95

De modo geral, as bibliotecas do gene α -ARHD do sítio Hatahara foram muito similares em termos de heterogeneidade de espécies, assim como o Costa do Açutuba. As medidas de riqueza e os índices de diversidade obtidos para estes sítios não apresentaram diferença significativa entre os valores para as bibliotecas do carvão e dos solos TPI, diferente do que foi observado no Caldeirão, onde principalmente os índices de *Shannon* e de *Simpson* foram aproximadamente o dobro para as bibliotecas do carvão pirogênico.

Apesar das similaridades entre a diversidade para algumas bibliotecas, a análise realizada com o programa J-Libshuff, incluído no MOTHUR, apontou diferença estatística significativa entre todas as bibliotecas, indicando que as comunidades de *Bacteria* degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos são influenciadas diretamente pelos diferentes ambientes, sem, entretanto, alterar de forma expressiva a riqueza de espécies.

A biblioteca de clones do gene α -ARHD gerada a partir do carvão pirogênico presente em solos TPI do sítio Hatahara apresentou os maiores índices de diversidade entre os quatro sítios analisados, sendo que os menores valores foram encontrados na biblioteca de carvão do sítio de Caldeirão sob cultivo agrícola. A mesma relação foi encontrada para as bibliotecas de TPI dos dois sítios.

Também foram construídos diagramas de Venn para verificar as intersecções e peculiaridades de cada ambiente, identificando o número de FPOs exclusivas e compartilhadas entre os solos TPI e o carvão pirogênico para cada sítio TPI analisado (Figura 3.10).

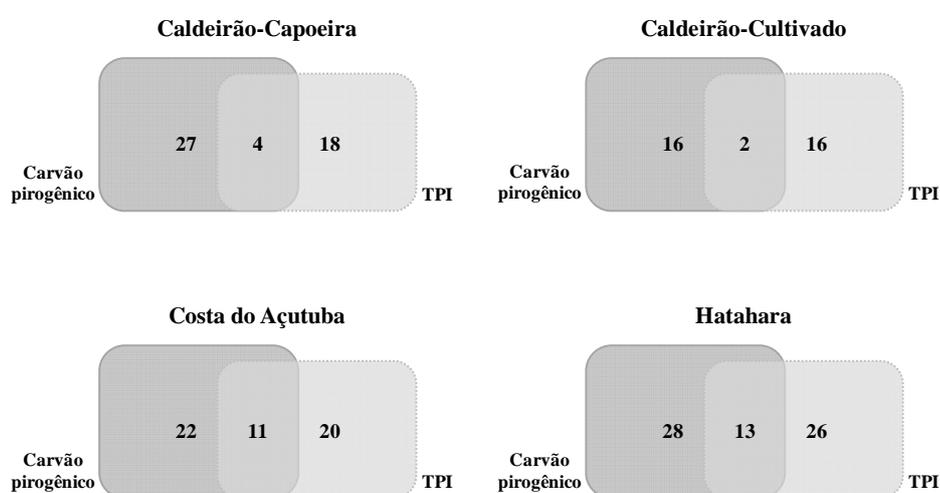


Figura 3.10 - Diagramas de Venn baseados nas FPOs das bibliotecas do gene α -ARHD de *Bacteria* (*cutoff* 0,05) para os sítios de TPI analisados

Através desta análise, foi possível observar maior quantidade de FPOs únicas nas bibliotecas do carvão em comparação com as TPI para três dos quatro sítios analisados, sendo que no sítio Caldeirão-Cultivado a quantidade de FPOs únicas para ambas as bibliotecas foi a mesma. Entretanto, o número de FPOs compartilhadas entre as bibliotecas nos sítios do Caldeirão foi menor quando comparado com o Hatahara e o Costa do Açutuba. Estes dados sugerem que o carvão pirogênico, presente em grande quantidade nos solos TPI, pode ser o responsável pela manutenção de comunidades microbianas envolvidas em processos específicos fundamentais para a manutenção da fertilidade do solo, como a ciclagem de nutrientes e matéria orgânica.

Pietikainen et al. (2000) sugeriram que o carvão pode servir como micro-habitat para a sobrevivência microbiana, funcionando como uma plataforma de troca de nutrientes para os micro-organismos. Da mesma forma, baseado na composição química e na estrutura física, Thies e Rilling (2009) sugerem que o carvão pirogênico possui propriedades biológicas favoráveis à diversidade das comunidades microbianas do solo, uma vez que hidrocarbonetos residuais e outros materiais aderidos à superfície das partículas podem servir diretamente como fonte de carbono e energia.

Paralelamente, foram construídos diagramas de Venn para verificar as FPOs únicas entre as bibliotecas dos solos TPI e entre o carvão pirogênico dos sítios do Caldeirão sob cultivo agrícola e sob floresta secundária, para avaliar a influência do sistema de uso da terra sobre a diversidade dos genes bacterianos da subunidade alfa de dioxigenases aromáticas (Figura 3.11). Deste modo, foi possível observar maior quantidade de FPOs únicas nas bibliotecas do sítio sob floresta secundária, tanto para os solos TPI quanto para o carvão pirogênico, confirmando que a interferência agrícola pode influenciar diretamente a diversidade das comunidades microbianas no solo.

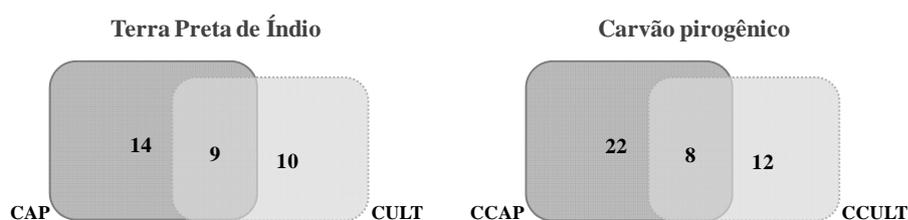


Figura 3.11 - Diagramas de Venn baseados nas FPOs das bibliotecas do gene α -ARHD de *Bacteria* (*cutoff* 0,05) para os sítios do Caldeirão analisados neste estudo

As relações filogenéticas entre as sequências de dioxigenases identificadas neste estudo, e destas com sequências selecionadas a partir do banco de dados (Genbank) estão mostradas nas Figuras 3.12 a 3.15. Com o objetivo de classificar as sequências de acordo com sua funcionalidade, foi utilizado o sistema de classificação recentemente proposto por Kweon et al. (2008), que reconhece cinco grandes grupos de dioxigenases, cada um incluindo distintos sistemas enzimáticos, considerando não somente a informação baseada na sequência da proteína (NAM et al., 2001), mas também as interações entre os componentes da enzima.

Esta classificação é importante uma vez que as ARHD são enzimas multicomponentes e, sendo assim, ambos os componentes, oxigenase e cadeia de transporte de elétrons, devem ser considerados dentro de uma abordagem funcional (KWEON et al., 2008). Nesse contexto, os autores ainda demonstraram que as relações filogenéticas entre as ARHD (oxigenases) podem ser analisadas por meio deste sistema de classificação, mesmo que a informação sobre a cadeia de transporte de elétrons (ferrodoxina e redutase) não esteja disponível.

As análises filogenéticas com as sequências de dioxigenases obtidas a partir das bibliotecas de TPI e do carvão pirogênico apresentaram grupos heterogêneos, distribuídos entre três dos cinco grupos baseados na classificação de Kweon. As árvores construídas pelo método de *Neighbor-joining* indicaram a formação de agrupamentos significativos entre muitas FPOs representativas de TPI e carvão pirogênico e sequências de referência para todos os sítios analisados.

O grupo IV incluiu a maioria das sequências de aminoácidos obtidas para os sítios do Caldeirão, agrupando a maioria das FPOs dominantes tanto para TPI quanto para carvão pirogênico. Este grupo enzimático é composto principalmente por dioxigenases que degradam substratos como tolueno e bifenilos policlorinados, caracterizado pela presença de ferrodoxinas tipo [2Fe-2S] na cadeia de transporte de elétrons (KWEON et al., 2008), representado por sequências de referência dos gêneros bacterianos *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Rhodococcus* e *Sphingomonas*.

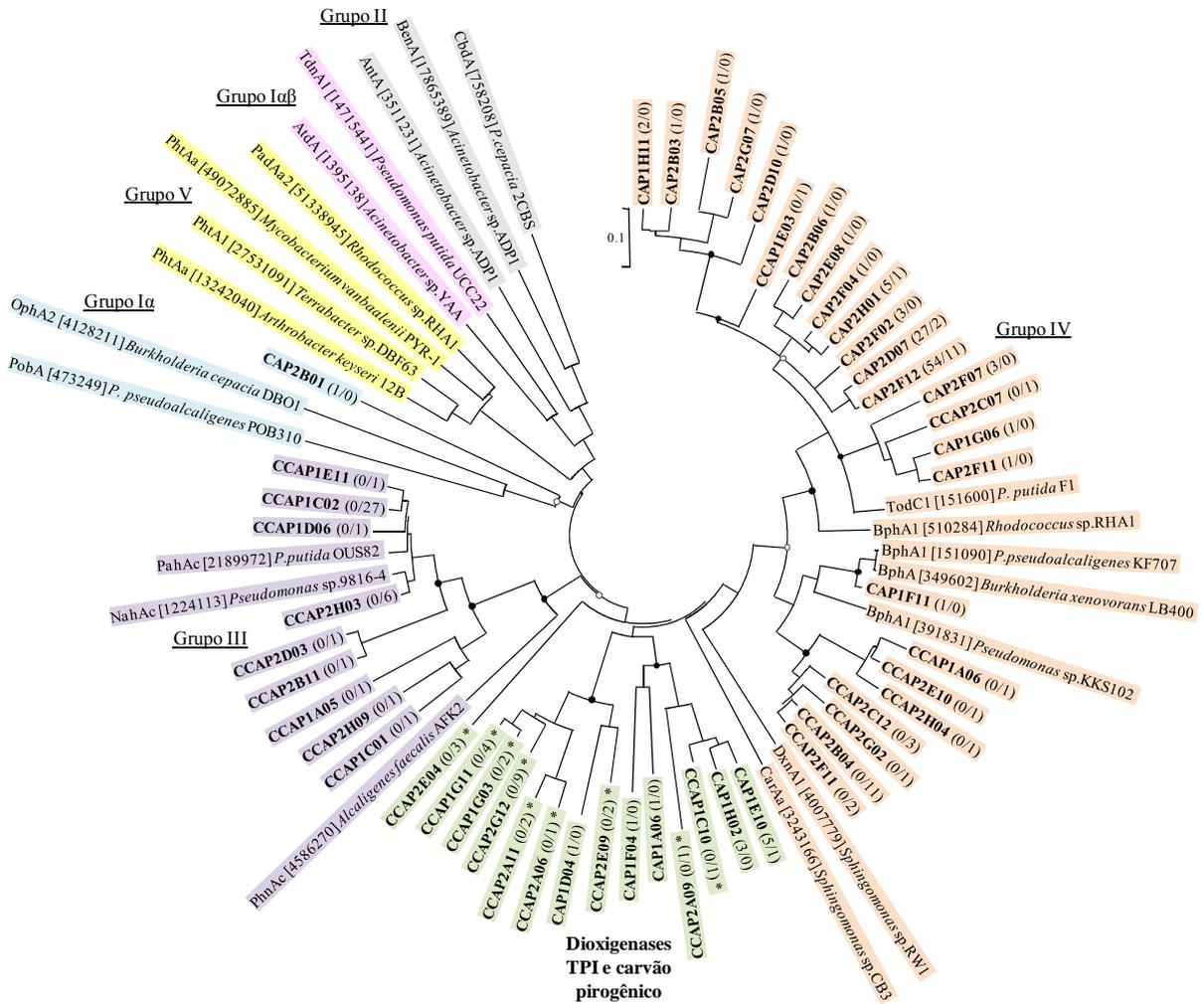


Figura 3.12 - Relações filogenéticas entre as sequências de aminoácidos (*Famílias Protêicas Operacionais*, FPOs) dos clones do sítio Caldeirão-Capoeira e dioxigenases do GenBank. Valores de *bootstrap*: 51-75%: círculos brancos; 76-100%: pretos. Oxigenases tipos I-V: KWEON et al., 2008. Sequências deste estudo em negrito. Número de clones representados por cada sequência entre parênteses (TPI/CARVÃO). *FPOs que incluíram somente sequências de carvão pirogênico. Nomes de enzimas, estirpes e números de acesso estão indicados na árvore

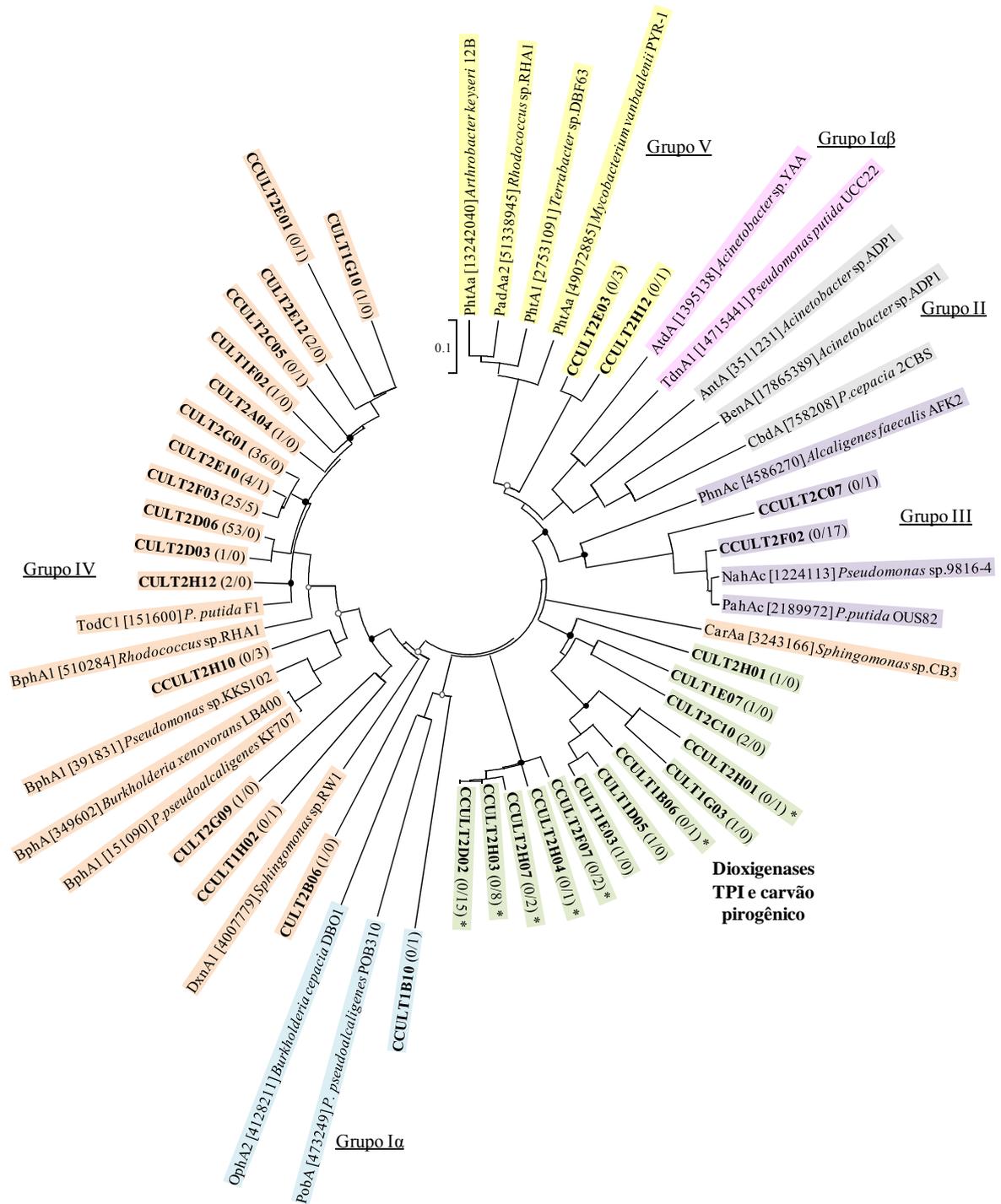


Figura 3.13 - Relações filogenéticas entre as sequências de aminoácidos (*Famílias Protêicas Operacionais*, FPOs) dos clones do sítio Caldeirão-Cultivado e dioxigenases do GenBank. Valores de *bootstrap*: 51-75%: círculos brancos; 76-100%: pretos. Oxigenases tipos I-V: KWEON et al., 2008. Sequências deste estudo em negrito. Número de clones representados por cada sequência entre parênteses (TPI/CARVÃO). *FPOs que incluíram somente sequências de carvão pirogênico. Nomes de enzimas, estirpes e números de acesso estão indicados na árvore

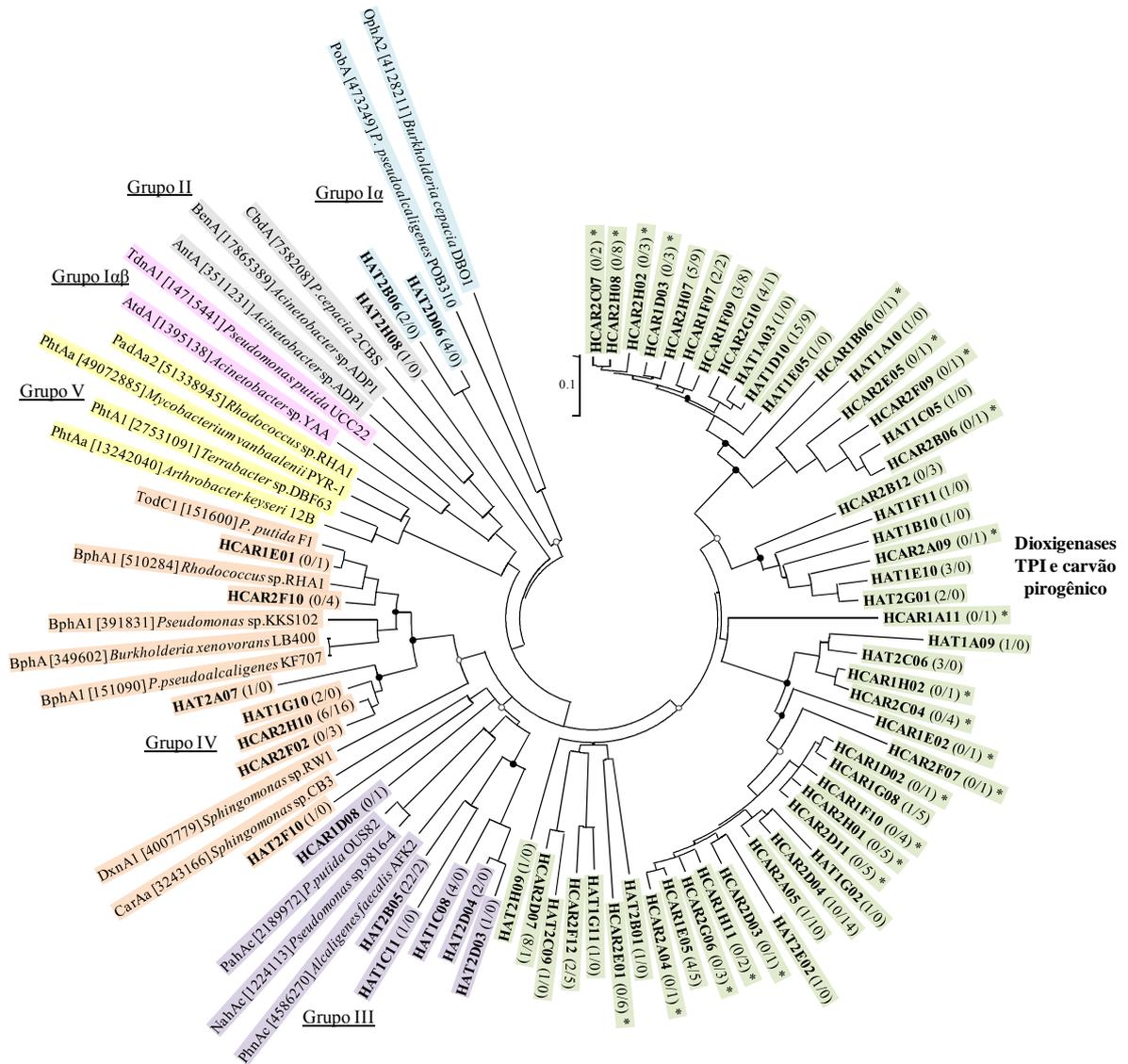


Figura 3.15 - Relações filogenéticas entre as sequências de aminoácidos (*Famílias Protêicas Operacionais*, FPOs) dos clones do sítio Hatahara e dioxigenases do GenBank. Valores de *bootstrap*: 51-75%: círculos brancos; 76-100%: pretos. Oxigenases tipos I-V: KWEON et al., 2008. Sequências deste estudo em negrito. Número de clones representados por cada sequência entre parênteses (TPI/CARVÃO). *FPOs que incluíram somente sequências de carvão pirogênico. Nomes de enzimas, estirpes e números de acesso estão indicados na árvore

Outro grande grupo (III), composto por sequências de dioxigenases para degradação de HPAs, como naftaleno e fenantreno, reuniu FPOs representativas somente de clones de carvão pirogênico nos dois sítios do Caldeirão, tanto sob cultivo agrícola quanto sob capoeira. Algumas sequências ainda formaram agrupamento significativo com dioxigenases menos comuns, relacionadas à degradação de ftalato/fenoxibenzoato (grupo I). Estas enzimas são muito diversas em termos de substrato, sendo caracterizadas por dioxigenases tipicamente encontradas em *Alcaligenes*, *Burkholderia* e *Pseudomonas*, além de enzimas para degradação de anilina e toluenosulfonato, em *Comamonas* e *Acinetobacter*.

Entretanto, os grupos mais notáveis foram aqueles que reuniram exclusivamente sequências das bibliotecas de TPI e carvão pirogênico, que apresentaram valores de distância muito elevados, não permitindo sua inclusão em nenhum tipo/grupo enzimático. Este fato foi verificado para todos os quatro sítios TPI analisados, sendo que o sítio Hatahara apresentou o grupo constituído pelo maior número de sequências, com 76% do total de FPOs, seguido pelo Costa do Açutuba, com 66% das sequências de TPI e carvão pirogênico deste sítio reunidas em um grupo distinto dos demais.

As demais FPOs do Hatahara e do Costa do Açutuba, assim como as do Caldeirão, formaram grupos heterogêneos com enzimas dos tipos III e IV, compostos por dioxigenases para degradação de HPAs e tolueno/bifenil, respectivamente. Este último grupo reuniu a FPO com maior número de sequências específicas do carvão no sítio Costa do Açutuba, com 23 clones, e o grupo composto por genes de dioxigenases tipo IV incluiu a FPO do sítio Hatahara com grande número de sequências de TPI. Em ambos os sítios houve agrupamento de clones com dioxigenases mais específicas em termos de substrato, do grupo I.

Ainda existem lacunas importantes no conhecimento sobre a estrutura e diversidade de enzimas ARHD em amostras ambientais, fato que torna difícil sua classificação dentro de uma abordagem funcional (MARCOS et al., 2009). Além disso, a maioria dos resultados publicados até o presente momento sobre a diversidade de dioxigenases está relacionada a ambientes cronicamente poluídos, que não é o caso dos solos TPI de modo geral. Talvez em função destes fatos, os grupos de dioxigenase descritos primeiramente neste estudo não puderam ser diretamente relacionados aos grupos enzimáticos descritos previamente por Kweon et al. (2008), podendo constituir novas enzimas associadas a ambientes específicos, como é o caso do carvão pirogênico dos solos TPI.

Taketani e Tsai (2010) reportaram um estudo sobre o gene *amoA* de comunidades de *Archaea* em diferentes sítios de TPI na Amazônia e seus solos adjacentes. Este gene funcional também está envolvido nos principais ciclos biogeoquímicos, e as análises indicaram uma alta similaridade entre as sequências *amoA* de TPI e os solos adjacentes (dentro de cada sítio). Segundo esses autores, os fatores que afetam a estrutura das comunidades *amoA* são os níveis de amônio, a cobertura vegetal e o teor de matéria orgânica (BOYLE-YARWOOD et al., 2008), além dos sistemas de uso do solo e atividades antrópicas. No entanto, a maneira pela qual esses fatores influenciam a estrutura de uma determinada comunidade permanece ainda não totalmente esclarecida.

A idéia de que antrossolos como as TPI podem ter populações microbianas distintas não é nova, mas recentemente, vários fatos tem demonstrado o papel do carvão pirogênico sobre os processos físicos (GLASER et al., 2002), químicos (LEHMANN et al., 2003) e biológicos (LIANG et al., 2006; 2010) nestes solos antrópicos. A diversidade bacteriana nas Terras Pretas Amazônicas geralmente é semelhante a solos de floresta sem perturbação, mas Kim et al. (2007) demonstraram que a riqueza nas amostras TPI foi aumentada em 25%. Os dados gerados no presente estudo demonstraram que as populações microbianas dos solos TPI e do carvão pirogênico são muito diversas e adaptadas à ecologia e características bioquímicas únicas destes solos antrópicos.

3.3 Conclusões

A adição antropogênica de modificações orgânicas, incluindo material vegetal e animal, cerâmica e carvão vegetal em solos pré-existentes, formam o que é conhecido como Terra Preta Amazônica. Se estas alterações foram ou não parte de uma estratégia de gestão agrícola do solo por culturas pré-colombianas, ainda não é possível afirmar com certeza, mas hoje os solos TPI são valorizados pelos agricultores por sua fertilidade sustentável nas regiões em que a infertilidade crônica do solo levou, em parte, à contínua destruição das florestas primárias para criar terras cultiváveis.

Neste estudo, investigou-se a diversidade de comunidades bacterianas funcionais presentes nos solos TPI e no carvão pirogênico em quatro sítios diferentes na Amazônia brasileira. A presença de carvão vegetal recalcitrante nestes antrossolos pode ter criado condições químicas que favorecem a estabilidade de populações únicas em comunidades

microbianas e melhoram a fertilidade do solo. As bibliotecas contendo o gene funcional ARHD obtidas a partir do carvão pirogênico apresentaram elevados índices de diversidade em relação aos solos TPI para a maioria dos sítios analisados, sugerindo que o carvão pode constituir uma estrutura estável para a sobrevivência de comunidades bacterianas envolvidas em processos específicos no solo.

Apesar dos diferentes sistemas de uso da terra entre os sítios analisados, como as TPI do Caldeirão, o solo sob capoeira apresentou mais FPOs únicas em relação ao solo sob cultivo agrícola, sugerindo que a diversidade bacteriana nas TPI é fortemente influenciada pelo manejo histórico destes solos. Além disto, os grupos filogenéticos distintos descritos neste estudo reforçam a idéia de que a presença de fragmentos de carvão pirogênico nos solos TPI pode criar condições químicas que favoreçam a manutenção de comunidades microbianas únicas neste ambiente.

Em condições de intemperismo intenso, que esgotam rapidamente a fertilidade na maioria dos solos tropicais, a composição química das TPI e a diversidade de suas populações microbianas podem explicar, em parte, a fertilidade sustentável destes solos, mesmo séculos após a sua formação. A reprodução das condições biogeoquímicas, associada às populações microbianas encontradas nestes antrossolos, pode ajudar a melhorar os resultados agronômicos, além de favorecer a recuperação biológica de solos degradados.

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.
- BALDWIN, B.R.; NAKATSU, C.H.; NIES, L. Detection and Enumeration of Aromatic Oxygenase Genes by Multiplex and Real-Time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 3350-3358, 2003.
- BECHER, D.; SPECHT, M.; HAMMER, E.; FRANCKE, W.; SCHAUER, F. Cometabolic degradation of dibenzofuran by biphenyl-cultivated *Ralstonia* sp. strain SBUG 290. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 4528-4531, 2000.
- BELLICANTA, G.S. **Diversidade de genes catabólicos em amostras de sedimento do sistema estuarino de Santos e São Vicente, SP**. 2004. 112 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- BELLICANTA, G.S.; PELLIZARI, V.H. Development of degenerate primers for detection of distinct aromatic ring-hydroxylating dioxygenases. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY (ISME), 10., 2004, Cancun. **Proceedings...** Cancun: Asociación Mexicana de Microbiología, 2004. 1 CD-ROM.
- BENSON, D.A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; WHEELER, D.L. GenBank. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, p. 34-38, 2005.
- BOHANNAN, B.J.M.; HUGHES, J. New approaches to analyzing microbial biodiversity data. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 6, p. 282-287, 2003.
- BOYLE-YARWOOD, S.A.; BOTTOMLEY, P.J.; MYROLD, D.D. Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and Archaea in soils under stands of red alder and Douglas fir in Oregon. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 10, p. 2956-2965, 2008.
- CHAO, A. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. **Scandinavian Journal of Statistics**, Oxford, v. 11, p. 265-270, 1984.
- CHAO, A. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. **Biometrics**, Malden, v. 43, p. 783-791, 1987.
- CHAO, A.; SHEN, T.J.; HWANG, W. Application of laplace's boundary-mode approximations to estimate species and shared species richness. **Australian & New Zealand Journal of Statistics**, Melbourne, v. 48, p. 117-128, 2006.
- COLE, J.R.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; MCGARRELL, D.M.; BANDELA, A.M.; CARDENAS, E.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 35, p. 169-172, 2007.
- CURY, J.C. **Diversidade de bacteria e archaea em solos de mangue e marisma**. 2006. 147 f. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

FAUTH, J.E.; BERNARDO, J.; CAMARA, M.; RESETARITS JUNIOR, W.J.; VAN BUSKIRK, J.; McCOLLUM, S.A. Simplifying the jargón of community ecology: a conceptual approach. **The American Naturalist**, Chicago, v. 147, n. 2, p. 282-286, 1996.

GLASER, B. Prehistorically modified soils of central Amazonia: a model for sustainable agriculture in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 362, p. 187–196, 2007.

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

GLASER, B.; LEHMANN, J.; ZECH, W. Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soil in the tropics with charcoal – a review. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v. 35, p. 219-230, 2002.

GOOD, I.J. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. **Biometrika**, Oxford, v. 40, p. 237-264, 1953.

IIDA, T.; NAKAMURA, K.; IZUMI, A.; MUKOUZAKA, Y.; KUDO, T. Isolation and characterization of a gene cluster for dibenzofuran degradation in a new dibenzofuran-utilizing bacterium, *Paenibacillus* sp. strain YK5. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 184, p. 305-315, 2006.

IWAI, S.; YAMAZOE, A.; TAKAHASHI, R.; KURISU, F.; YAGI, O. Degradation of monochlorinated dibenzo-p-dioxins by *Janibacter* sp. strain YA isolated from river sediment. **Current Microbiology**, New York, v. 51, p. 353–358, 2005.

IWAI, S.; KURISU, F.; URAKAWA, H.; YAGI, O.; KASUGA, I.; FURUMAI, H. Development of an oligonucleotide microarray to detect di- and monooxygenase genes for benzene degradation in soil. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 285, p. 111–121, 2008.

JESUS, E.C. **Bacterial diversity in soils from different land use systems of the western Brazilian Amazon**. 2008. 155 p. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

JOHNSEN, A.R.; KARLSON, U. Diffuse PAH contamination of surface soils: environmental occurrence, bioavailability, and microbial degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 76, n. 3, p. 533-543. 2007. Review.

KASUGA, K.; HABE, H.; CHUNG, J.S.; YOSHIDA, T.; NOJIRI, H.; YAMANE, H.; OMORI, T. Isolation and characterization of the genes encoding a novel oxygenase component of angular dioxygenase from the Gram-positive dibenzofuran-degrader *Terrabacter* sp. strain DBF63. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 283, p. 195-204, 2001.

KAUPPI, B.; LEE, K.; CARREDANO, E.; PARALES, R.E.; GIBSON, D.T.; EKLUND, H.; RAMASWAMY, S. Structure of an aromatic-ring hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase. **Structure**, London, v. 6, p. 571–586, 1998.

KIM, S. J.; KWEON, O.; FREEMAN, J. P.; JONES, R. C.; ADJEI, M. D.; JHOO, J. W.; EDMONDSON, R. D.; CERNIGLIA, C. E. Molecular cloning and expression of genes encoding a novel dioxygenase involved in low- and high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 72, p. 1045–1054, 2006.

KIM, J.S.; SPAROVEK, G.; LONGO, R.M.; DE MELO, W.J.; CROWLEY, D. Bacterial diversity of terra preta and pristine forest soil from the Western Amazon. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 684–690, 2007.

KREBS, C.J. **Ecological methodology**. 2. ed. New York: Addison Wesley Longman, 1998. 620 p.

KWEON, O.; KIM, S-J.; BAEK, S.; CHAE, J.C.; ADJEI, M.D.; BAEK, D-H.; KIM, Y-C.; CERNIGLIA, C.E. A new classification system for bacterial Rieske non-heme iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases. **BMC Biochemistry**, London, v. 9, p. 11, 2008.

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.

LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GERMAN, L.; MCCANN, J.; MARTINS, G.C.; MOREIRA, A. Soil fertility and production potential. In: LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GLASER, B.; WOODS, W. (Ed.). **Amazonian Dark Earths: origin, properties, management**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 105-124.

LIANG, B.; LEHMANN, J.; SOLOMON, D.; KINYANGI, J.; GROSSMAN, J.; O'NEILL, B.; SKJEMSTAD, J.O.; THIES, J.; LUIZÃO, F.J.; PETERSEN, J.; NEVES, E.G. Black carbon increases cation exchange capacity in soils. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 70, p. 1719–1730, 2006.

LIANG, B.; LEHMANN, J.; SOHI, S.P.; THIES, J.E.; O'NEILL, B.; TRUJILLO, L.; GAUNT, J.; SOLOMON, D.; GROSSMAN, J.; NEVES, E.G.; LUIZÃO, F.J. Black carbon affects the cycling of non-black carbon in soil. **Organic Geochemistry**, Amsterdam, v. 41, p. 206–213, 2010.

MARCOS, M.S.; LOZADA, M.; DIONISI, H.M. Aromatic hydrocarbon degradation genes from chronically polluted Subantarctic marine sediments. **Letters in Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 49, p. 602-608, 2009.

NAM, J. W., NOJIRI, H., YOSHIDA, T., HABE, H., YAMANE, H., OMORI, T. New classification system for oxygenase components involved in ring-hydroxylating oxygenations. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 65, n. 2, p. 254-263, 2001.

PIETIKAINEN, J.; KIIKKILA, O.; FRITZE, H. Charcoal as a habitat for microbes and its effect on the microbial community of the underlying humus. **Oikos**, Kobenhavn, v. 89, p.231-242, 2000.

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. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 78, p. 117-130, 1989.

SCHLOSS, P.D.; LARGETE, B.R.; HANDELSMAN, J. Integration of Microbial Ecology and Statistics: a Test to Compare Gene Libraries. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 70, p. 5485-5492, 2004.

SCHLOSS, P.D.; WESTCOTT, S.L.; RYABIN, T.; HALL, J.R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E.B.; LESNIEWSKI, R.A.; OAKLEY, B.B.; PARKS, D.H.; ROBINSON, C.J.; SAHL, J.W.; STRES, B.; THALLINGER, G.G.; VAN HORN, D.J.; WEBER, C.F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 75, p. 7537-7541, 2009.

SEI, K.; INOUE, D.; WADA, K.; MORI, K.; IKE, M.; KOHNO, T.; FUJITA, M. Monitoring behaviour of catabolic genes and change of microbial community structures in seawater microcosms during aromatic compound degradation. **Water Research**, New York, v. 38, p. 4405-4414, 2004.

SHANNON, C.E.; WEANER, W. **The mathematical theory of communication**. Urbana: University of Illinois Press, 1949. 117 p.

SHEN, T.J.; CHAO, A.; LIN, C.F. Predicting the number of new species in further taxonomic sampling. **Ecology**, Ithaca, v. 84, n. 3, p. 789-804, 2003.

TAKETANI, R.G.; TSAI, S.M. The influence of different land uses on the structure of archaeal communities in Amazonian anthrosols based on 16S rRNA and amoA genes. **Microbial Ecology**, Heidelberg, v. 59, p. 734-743, 2010.

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.

THIES, J.; RILLING, M. Characteristics of biochar: biological properties. In: LEHMANN, J.; JOSEPH, S. (Ed.). **Biochar for environmental management: science and technology**. London: Earthscan, 2009.

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

TSAI, S.M.; CANNAVAN, F.S.; SILVA JUNIOR, J.P.; CHAVES, M.G.; PASSIANOTO, C.C.; BORGES, C.P. Diversidade bacteriana em terra preta de índio baseada em seqüenciamento do gene 16S rRNA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29., 2003, Ribeirão Preto. **Resumos...** Ribeirão Preto: SBCS, 2003. 1 CD-ROM.

WILSON, M.S.; BAKERMANS, C.; MADSEN, E.L. *In situ*, Real-Time Catabolic Gene Expression: extraction and characterization of naphthalene dioxygenase mRNA Transcripts from Groundwater. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 80-87, 1999.

ZHOU, H.W.; GUO, C.L.; WONG, Y.S.; TAM, N.F.Y. Genetic diversity of dioxygenase genes in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from mangrove sediments. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 262, p. 148–157, 2006.

4. ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE GENES FUNCIONAIS EM SOLOS DE TERRA PRETA DE ÍNDIO E CARVÃO PIROGÊNICO POR PIROSEQUENCIAMENTO E PCR QUANTITATIVO

RESUMO

Estudos realizados para acessar a diversidade funcional microbiana em amostras ambientais têm demonstrado que somente uma fração dos genes presentes no ambiente é detectada. Várias estratégias têm sido utilizadas para avaliar as relações entre o funcionamento dos ecossistemas e a estrutura de comunidades microbianas, com o objetivo de atribuir o papel de membros específicos dentro da comunidade, visando à estabilidade do sistema. O objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade de genes de dioxigenases para degradação de hidrocarbonetos aromáticos em amostras de solos de Terra Preta de Índio da Amazônia e carvão pirogênico por meio de pirosequenciamento. Esta estratégia permite detectar organismos raros (com baixa abundância) nas populações, considerada anteriormente uma limitação das técnicas tradicionais de clonagem e sequenciamento. Paralelamente, foi utilizada a técnica de PCR quantitativa em tempo real aplicada a genes para degradação de hidrocarbonetos aromáticos presentes em solos de Terra Preta e carvão pirogênico, para quantificar a abundância de genes funcionais nestes ambientes, com o objetivo de inferir principalmente a participação da microbiota do carvão em processos específicos no solo. As quase 22 mil sequências geradas por pirosequenciamento ficaram reunidas em aproximadamente 2800 *clusters*, onde mais de 98% ficou composto por sequências descritas unicamente neste estudo, representando uma diversidade ainda não reportada para genes catabólicos bacterianos em solos TPI. O número de cópias de genes de dioxigenases em amostras de carvão, determinada por PCR quantitativo, foi frequentemente maior em relação aos solos TPI, confirmando o papel do carvão pirogênico na manutenção da diversidade microbiana. As abordagens metagenômicas baseadas em genes específicos, como realizado neste estudo, podem prover uma melhor compreensão da biologia envolvida na diversidade de ambientes tropicais altamente antropizados, com grande quantidade de carvão pirogênico, como as Terras Pretas de Índio da Amazônia.

Palavras-chave: *Bacteria*, Dioxigenases, Real Time PCR, Sequenciamento em larga escala

ABSTRACT

Studies conducted to access the functional microbial diversity in environmental samples have shown that only a fraction of these genes is detected. Several strategies have been used to evaluate the relationships between ecosystem functioning and structure of microbial communities, in order to assign the role of specific members within the community, aiming at stability of the system. The aim of this study was to analyze the diversity of dioxygenases genes for degradation of aromatic hydrocarbons in Amazonian Dark Earth (ADE) soil samples and black carbon by pyrosequencing. This strategy allows detecting rare organisms (low abundance) in populations, previously considered a limitation of traditional techniques of cloning and sequencing. In parallel, we used quantitative PCR applied to genes for degradation of aromatic hydrocarbons to quantify the abundance of functional genes in ADE soils and black carbon, in order to infer mainly the participation of black carbon unique microbial communities in specific processes in soil. The almost 22,000 sequences generated by pyrosequencing were assembled in about 2,800 *clusters* and more than 98% was composed only by sequences described in this study, representing an unreported diversity for bacterial catabolic genes in ADE soils. The number of dioxygenases genes copies in black carbon samples determined by quantitative PCR was often higher compared to ADE soils, confirming the main role of pyrogenic black carbon in the maintenance of microbial diversity. Metagenomic approaches based on specific genes as performed in this study may provide a better understanding of the biology involved in highly diverse tropical habitats, with large amounts of black carbon such as ADE soils in the Amazon region.

Keywords: *Bacteria*, Dioxygenases, Large-scale sequencing, Real Time PCR

4.1 INTRODUÇÃO

Comunidades bacterianas que degradam uma grande variedade de substratos aromáticos são amplamente distribuídas no ambiente, sendo importantes tanto para o metabolismo de compostos naturais quanto de xenobióticos. Estes organismos também desempenham um papel crítico no ciclo global do carbono (SUENAGA et al., 2007).

Nesse contexto, as vias metabólicas catalizadas por oxigenases microbianas têm sido extensivamente estudadas, a fim de compreender os mecanismos de reação, a especificidade enzimática e a regulação destes processos por micro-organismos. A versatilidade catabólica das bactérias desempenha um papel essencial na ciclagem de matéria orgânica, e depende do uso de dioxigenases como iniciadores das vias de degradação para aproveitamento dos subprodutos como energia pela célula microbiana. Estas enzimas iniciam a biodegradação de compostos aromáticos tanto pela hidroxilação parcial, quanto pela catalização da reação de quebra total do anel aromático (HARAYAMA & TIMMIS, 1989).

Entretanto, estudos realizados para acessar a diversidade funcional microbiana em amostras ambientais têm demonstrado que somente uma fração dos genes presentes no ambiente é detectada (KIMURA et al., 1997), uma vez que mais de 99% dos micro-organismos são dificilmente cultiváveis ou não são cultiváveis por meio de métodos tradicionais. Além disto, estes micro-organismos incluem representantes muito diversos, que parecem estar distantemente relacionados aos membros cultivados (AMANN et al., 1995), sugerindo a existência de novos genes catabólicos em comunidades bacterianas complexas, que podem utilizar uma gama variada de substratos orgânicos.

Estudos mais recentes têm utilizado abordagens onde são considerados os aspectos bioquímicos e biofísicos combinados com técnicas de biologia molecular, para acessar a diversidade de comunidades microbianas que atuam em processos funcionais específicos no solo. Assim, sequências deduzidas de aminoácidos de inúmeras enzimas podem ser comparadas para determinação dos padrões das relações evolutivas emergentes, e novos conceitos e famílias gênicas são desenvolvidos a partir dessas comparações (HARAYAMA et al., 1992).

Estima-se que o número de espécies bacterianas por grama de solo varie entre 2.000 e 8,3 milhões, e o número de Unidades Taxonômicas Operacionais, com dissimilaridade de 3%,

esteja entre 2000 e 5000 (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2006). Estas proporções sugerem que estes números podem ser infinitamente maiores, de tal modo que seja impraticável a obtenção de estimativas mais precisas sobre a diversidade destes micro-organismos somente por meio de técnicas baseadas em amplificação e sequenciamento de genes, e esta afirmação torna-se bastante importante principalmente no sentido de que o solo é considerado o refúgio da maior diversidade de populações bacterianas em relação a qualquer outro ambiente no planeta (ROESCH et al., 2007).

Várias estratégias têm sido utilizadas para avaliar as relações entre o funcionamento dos ecossistemas e a estrutura de comunidades microbianas, com o objetivo de atribuir o papel de membros específicos dentro da comunidade, visando à estabilidade do sistema. Técnicas modernas de ecologia microbiana podem oferecer ferramentas eficientes para monitorar processos biológicos em solos como as TPI, onde atividades antrópicas de manejo agrícola e depósito de material orgânico provavelmente foram determinantes para a diversificação metabólica das comunidades microbianas.

Desta forma, uma abordagem metagenômica, onde as sequências de um dado gene de interesse são diretamente analisadas por meio de técnicas de sequenciamento em larga escala (pirosequenciamento), permite o estudo mais detalhado da diversidade funcional dos membros da comunidade, mesmo de organismos que não são facilmente cultiváveis. Uma grande vantagem desta abordagem é que torna-se possível, em teoria, acelerar a identificação de novos genes, principalmente aqueles com grande importância biotecnológica (HANDELSMAN, 2004).

Com a finalidade de produzir dados com níveis de informação e confiabilidade elevados, o objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade de genes de dioxigenases para degradação de hidrocarbonetos aromáticos em amostras de solos de Terra Preta de Índio da Amazônia e carvão pirogênico por meio de pirosequenciamento. Com esta técnica, o DNA metagenômico é sequenciado diretamente, sem a etapa de clonagem e construção de bibliotecas, possibilitando a identificação de um maior número de genes em menor espaço de tempo (MEYER et al., 2008). Para tal, foram utilizados *primers* degenerados desenvolvidos por Iwai et al. (2010), que amplificam uma porção de aproximadamente 500 pb da subunidade alfa de dioxigenases aromáticas.

Um dos primeiros trabalhos a aplicar o pirosequenciamento para estudos de ecologia microbiana teve por objetivo caracterizar a diversidade de bactérias em amostras de solos da

América do Norte (EUA e Canadá) e da América do Sul (Brasil) (ROESCH et al., 2007). Os autores obtiveram entre 26 e 53 mil sequências do gene 16S rRNA por amostra, onde foi possível estimar o número total de espécies bacterianas em torno de 6 mil para os solos do Brasil e dos EUA, e 20 mil espécies no Canadá, segundo os índices de riqueza de ACE e Chao1. Esta estratégia permitiu detectar organismos raros (com baixa abundância) nas populações, considerada anteriormente uma limitação das técnicas tradicionais de clonagem e sequenciamento.

De forma a complementar as informações sobre a diversidade de genes funcionais em solos antrópicos, foi utilizada a técnica de PCR quantitativa em tempo real aplicada a genes para degradação de hidrocarbonetos aromáticos presentes em solos de Terra Preta e carvão pirogênico. A presença de material orgânico em grande quantidade nestes solos pode favorecer a sobrevivência de micro-organismos que possuem composição genética apropriada para utilizá-la, resultado em um aumento da atividade metabólica e da abundância de genes relacionados (GOMES et al., 2005; CÉBRON et al., 2008).

Nesse contexto, a utilização de métodos para a quantificação de genes funcionais em estudos de ecologia microbiana, como a PCR quantitativa em tempo real, é particularmente interessante para monitorar genes de interesse que podem servir como bioindicadores associados a funções específicas, como é o caso das atividades de degradação de compostos aromáticos no ambiente (BELLER et al., 2002).

Recentes avanços nas técnicas de sequenciamento e bioinformática, utilizando abordagens integradas de análise, têm gerado novas perspectivas para o estudo da ecologia e evolução de micro-organismos (BOUCK; VISION, 2007). Este fato torna-se ainda mais interessante para o estudo da diversidade de genes associados à ciclagem de carbono em TPI e principalmente no carvão pirogênico, cujas propriedades estruturais e químicas compõem um nicho estável de sobrevivência para comunidades microbianas que desenvolvem atividades fundamentais para a dinâmica de nutrientes no solo.

4.2 Desenvolvimento

Atualmente, técnicas de análise baseadas em metagenômica podem mitigar problemas relacionados à culturabilidade, além de gerar a compreensão das populações microbianas no nível de agregação, transcendendo o organismo individual para focar diretamente nos genes

da comunidade (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2007). Em função da extensa diversidade genética da maioria das comunidades microbianas, é praticamente impossível obter-se um número razoável de sequências para amostrar qualquer gene com cobertura suficiente para tirar conclusões significativas em relação à sua diversidade e características da população.

Este fato torna-se particularmente importante em estudos onde a busca por características funcionais específicas depende de padrões de expressão, como é o caso dos complexos protéicos. Para superar essa limitação, abordagens integradas são necessárias, como é o caso da detecção de genes funcionais baseada em PCR, associada à técnica de sequenciamento em larga escala ou pirosequenciamento (IWAI et al., 2010), similar ao que é utilizado para o estudo da diversidade de populações baseado no gene 16S rRNA (SOGIN et al., 2006; HUBER et al., 2007).

Esta abordagem pode prover informação mais ampla sobre a diversidade real de um dado ambiente, bem como fornecer informação sobre sequências para sondas que poderão ser utilizadas na recuperação do gene completo a partir de grupos de interesse. Como vários estudos têm demonstrado que a mutação de alguns aminoácidos pode afetar gravemente a estrutura de muitas enzimas, alterando a sua especificidade ao substrato e as atividades de degradação (PARALES et al., 2000; SUENAGA et al., 2002; BAGNÉRIS et al., 2005; VARDAR; WOOD, 2005), uma compreensão mais robusta da diversidade genética pode revelar os padrões funcionais, ecológicos e evolutivos de genes-chave para a ciclagem de nutrientes no solo.

Nesse contexto, esta análise integrada parece ser útil para estudos de diversidade de genes responsáveis por funções importantes nos ecossistemas e processos ecológicos, tais como ciclos biogeoquímicos, biodegradação, patogenicidade, resistência a antibióticos e sinalização celular. O presente estudo analisou genes bacterianos de dioxigenases aromáticas, muito importantes para a biotransformação de carbono orgânico na natureza, e os resultados demonstraram elevada diversidade destes genes catabólicos, ainda não descrita para os solos TPI e o carvão pirogênico na Amazônia Central.

4.2.1 Material e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, CENA/USP, Piracicaba-SP. As reações de pirosequenciamento foram realizadas no Center for Microbial Ecology, na Michigan State University (MSU, Michigan, EUA).

4.2.1.1 Áreas de estudo

De modo similar ao estudo anterior, foram analisados cinco sítios de TPI e seu respectivo carvão pirogênico, sendo que o sítio Balbina foi incorporado ao conjunto de áreas de estudo por constituir uma área de floresta secundária que está há muitos anos sem perturbação, assim como o caldeirão-Capoeira (Figura 4.1). Deste modo, o sítio Balbina é considerado como sendo um modelo de solo TPI com mínima perturbação, e pode ser utilizado para comparações sobre a influência do uso da terra nas comunidades bacterianas funcionais analisadas neste estudo.



Figura 4.1 - Localização das áreas de coleta dos solos TPI analisados no presente trabalho

Fonte: GPS Trackmaker (<http://www.gpstm.com/>)

4.2.1.2 Amostragem dos solos

As amostras de solos foram coletadas conforme descrito anteriormente no item 2.2.1.2. Os tubos foram encaminhados ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura-USP, Piracicaba-SP), sob refrigeração, e mantidos em ultra-freezer a -80°C .

4.2.1.3 Caracterização genética das comunidades microbianas

Extração do DNA genômico total da comunidade microbiana a partir dos solos TPI e do carvão pirogênico

O DNA total das comunidades microbianas dos solos TPI e seu respectivo carvão pirogênico foi extraído utilizando-se o *Power Soil DNA extraction* (MoBio, Carlsbad, CA), de acordo com instruções do fabricante. Foram utilizadas três repetições para cada sítio analisado, e a verificação da qualidade do material extraído foi feita em gel de agarose a 1%. O padrão de peso molecular utilizado foi o *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen Life Technologies).

Para a quantificação do material extraído, alíquotas de 5 μl foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) e coradas com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g/ml}$ de gel). Como padrão molecular foram utilizados 2 μl de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Life Technologies). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 min e depois registrado por foto-documentação.

O DNA extraído foi também quantificado em espectrofotômetro, adotando-se a relação de 1,0 densidade ótica a 260 nm (OD 260) como sendo igual a 50 ng de DNA/ μl (SAMBROOK et al., 1989).

4.2.1.4 Pirosequenciamento de genes funcionais em solos TPI e carvão pirogênico

Após a quantificação, o DNA genômico dos solos TPI e do carvão pirogênico foi concentrado em *Concentrador 5301* (Eppendorf) a 45°C por aproximadamente 10 minutos. Em seguida as amostras foram enviadas à Michigan State University (MSU), no Center for

Microbial Ecology, aos cuidados do Dr. James M. Tiedje, para realização do pirosequenciamento.

A amplificação inicial das amostras por técnica de PCR foi realizada pelo Dr. John Quensen (Center for Microbial Ecology, MSU), utilizando-se os *primers* descritos por Iwai et al. (2010), que amplificam uma fração de aproximadamente 500 pb da subunidade alfa de dioxigenases aromáticas (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - *Primers* utilizados para o pirosequenciamento de amostras de TPI e carvão pirogênico

<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')	Fragmento (pb)	Referência
BPHD-f3	ACTGGAARTTYGCIGCVGA	~ 500	IWAI et al. (2010)
BPHD-r1	ACCCAGTTYTCICCRTCGTC		

Para o desenho dos *primers*, os autores selecionaram sequências a partir do banco de dados do FunGene (Funcional gene pipeline & repository, <http://fungene.cme.msu.edu/>), de genes de dioxigenases da família/grupo do tolueno/bifenil (*bph*), tanto nucleotídicas quanto das proteínas, utilizando valores de *score* maiores que 900 e tamanho de sequências superiores a 400 pb.

As análises foram realizadas em sequenciador *Genome Sequencer FLX System* (454 *sequencing-by-synthesis technology*, Roche), com a plataforma *GS FLX Titanium*, cujo comprimento das sequências geradas (*reads*) fica em torno de 400 pb.

O pirosequenciamento foi inicialmente descrito por Ronaghi et al. (1996), ao demonstrar que a molécula de pirofosfato (PPi) produzida durante a reação de polimerização do DNA poderia ser utilizada para detectar a incorporação de um nucleotídeo específico. O método foi denominado “sequenciamento por síntese”, uma vez que a sequência-alvo é determinada na medida em que é sintetizada a fita complementar. Todo o processo envolve a participação quatro enzimas (Figura 4.2), responsáveis pela síntese da fita complementar através da incorporação de nucleotídeos, e da conversão do PPi em ATP e conseqüentemente em sinal luminoso, que pode ser detectado pelo equipamento. A conversão de PPi em luz é um processo estequiométrico, onde cada molécula de PPi gera uma quantidade definida de fótons e a intensidade luminosa emitida pela reação é captada pelos sensores do sequenciador (RONAGHI, 2001).

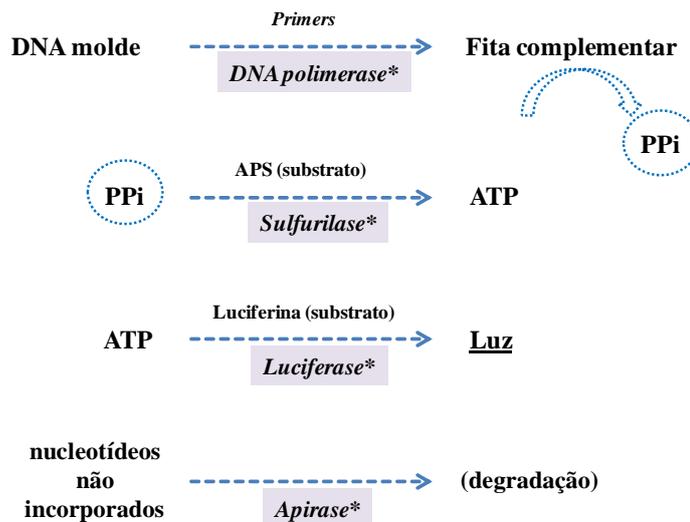


Figura 4.2. Esquema representativo das reações enzimáticas no processo de pirosequenciamento. (*) enzimas envolvidas no sistema

Outro avanço significativo da técnica de pirosequenciamento deve-se ao trabalho de Parameswaran et al. (2007), que adaptaram ao *primer* utilizado para a detecção do gene-alvo uma sequência curta de nucleotídeos, denominada “código de barras” ou *barcode*. Este código permitiu o uso da técnica de pirosequenciamento para várias amostras diferentes em paralelo, pois as sequências podem ser utilizadas posteriormente como referência na identificação e separação de diferentes amostras por ferramentas de bioinformática.

Os “mix” para as reações de pirosequenciamento foram preparados para um volume total de 20 μL , contendo 1X *FastStart High Fidelity Reaction Buffer* (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), 1,25 μM de cada *primer*, 150 ng/ μL de BSA (*bovine serum albumin*, New England BioLabs, Ipswich, MA, USA), 0,2 mM de dNTPs, 0,5 μL (2,5 U) de *FastStart High Fidelity PCR System Enzyme Blend* (Roche Diagnostics) e 4 ng de DNA molde. As condições de PCR foram otimizadas utilizando-se o DNA genômico da estirpe LB400 de *Burkholderia xenovorans* (GORIS et al., 2004), que possui um dos genes de dioxigenases amplificados pelos *primers* BPHD, para degradação de bifenil (*bph*).

As ampliações foram realizadas em triplicata como segue: 3 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 45 s a 95°C, 45 s a 60°C e 40 s a 72°C, além de extensão final de 4 min a 72°C. Os *amplicons* com 542 pb foram purificados utilizando-se o *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden, Germany), seguido de *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen). As

concentrações do material amplificado foram determinadas em espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000* (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Os produtos purificados foram então misturados com os *barcodes* e submetidos ao pirosequenciamento em sequenciador automático *Genome Sequencer FLX System* (454 Life Sciences, Branford, CT, USA).

Determinação das sequências válidas

Os processos de filtragem e obtenção das sequências válidas geradas a partir do pirosequenciamento foram realizados pela Dra. Qiong Wang (Center for Microbial Ecology, Michigan State University, MSU), utilizando programas de bioinformática e as ferramentas disponíveis no FunGene Pipeline Repository (<http://fungene.cme.msu.edu/FunGenePipeline/>).

Inicialmente, as sequências geradas foram analisadas para remoção daquelas com baixa qualidade e para remoção dos *primers*. Para eliminação de possíveis erros na fase de leitura das sequências (*frameshift*), todas as sequências foram comparadas com dioxigenases depositadas no NCBI por meio das ferramentas Blastx e Tblastx (ALTSCHUL et al., 1990), utilizando-se *E*value menores que 0,001 para determinar as maiores similaridades, considerando-se somente os dez primeiros resultados para todas as sequências. Somente sequências que passaram por esta filtragem inicial foram utilizadas nas análises para determinação dos índices de riqueza e diversidade dos sítios TPI analisados neste estudo.

4.2.1.5 Análises das sequências, parâmetros ecológicos e medidas de diversidade

As matrizes de dissimilaridade foram calculadas a partir dos alinhamentos par-a-par (*pairwise*) entre as sequências de aminoácidos, utilizando-se a ferramenta HMMER3 *aligner* disponível no FunGene Pipeline Repository. As matrizes geradas pelo software MOTHUR (SCHLOSS et al., 2009) foram utilizadas para o cálculo das medidas de riqueza e dos índices de diversidade de genes catabólicos presentes em solos TPI e carvão pirogênico.

Para as análises de conservação e comparação com sequências de referência depositadas em bancos de dados, foram selecionadas sequências de dioxigenases a partir do banco de dados de proteínas Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) (BATERMAN et al., 2008), que possuem ambos os domínios Rieske (PF00355) e Ring_hydroxyl_A (PF00848), contemplados pelos *primers* BPHD. Em seguida, as sequências de aminoácidos deduzidas a partir das

sequências nucleotídicas obtidas neste estudo foram alinhadas com a região correspondente das referências do banco de dados utilizando-se a ferramenta HMMER3 *aligner*, disponível no FunGene Pipeline Repository. Finalmente, uma matriz foi calculada a partir do alinhamento, considerando uma dissimilaridade de 94% ao nível de aminoácido, para verificação de agrupamentos significativos com o banco de dados de proteínas funcionais.

4.2.1.6 PCR quantitativo em tempo real

As análises de PCR em tempo real foram realizadas para quantificação do número de cópias de genes de dioxigenases aromáticas em solos TPI e amostras de carvão pirogênico para os cinco sítios analisados neste estudo. Como padrão para comparações, foi utilizado o gene ribossomal 16S rRNA. As reações foram realizadas no equipamento StepOnePlus® (Applied Biosystems), utilizando o sistema SYBR Green.

Amplificação de genes de dioxigenases aromáticas

A reação de amplificação para genes funcionais foi realizada com os *primers* BPHD-f3 e BPHD-r1 (IWAI et al., 2010), usando-se os valores de Cts (*cycle threshold*) como normalizadores para determinar a quantidade de DNA passível de amplificação em cada uma das amostras. Os Cts são definidos como o número de ciclos requeridos para que o sinal fluorescente exceda o nível de ruído (*background*), e é inversamente proporcional a quantidade de DNA-alvo presente na amostra.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em volume de 10 μ L contendo 5 μ L do Kit Syber Green Rox qPCR (Fermentas, Brasil), 2,5 μ M de cada primer e 10ng de DNA. A amplificação do DNA foi realizada com um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de amplificação de 95°C por 20 s, 60°C por 50 s e 72°C por 50 s e ao final da reação foi incluída uma curva de *melting* nas seguintes condições: 95°C por 15 seg, 60°C por 1 min e a temperatura foi aumentada até 95°C por 15 seg, com leitura de dados a cada 0,7°C. Para amplificação e obtenção de curva padrão, foi utilizado um clone obtido a partir de biblioteca contendo o gene funcional *bph* (bifenil dioxigenase), onde os plasmídeos foram quantificados em espectrofotômetro de espectro completo (190 a 840 nm - NanoDrop® ND-1000) e diluídos para construir uma curva padrão de 10^2 até 10^6 genes μ^{-1} .

Amplificação do gene ribossomal 16S rRNA

A reação de amplificação para o gene 16S rRNA foi realizada com os *primers* universais para o domínio *Bacteria* U968F (5'-AAC GCG AAG AAC CTT AC-3') e R1387 (5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3') (HEUER et al., 1997), que amplificam um fragmento de aproximadamente 400 pb, e os valores de *Cts* (*cycle threshold*) foram utilizados como normalizadores para determinar a quantidade de DNA passível de amplificação em cada uma das amostras. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em volume de 10 μ L contendo 5 μ L do *Kit Syber Green Rox qPCR* (Fermentas, Brasil), 2,5 μ M de cada primer e 10ng de DNA. A amplificação do DNA foi realizada com um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de amplificação de 94°C por 30 s, 56°C por 30 s e 72°C por 40 s e ao final da reação foi incluída uma curva de *melting* nas seguintes condições: 95°C por 15 seg, 56°C por 1 min e a temperatura foi aumentada até 95°C por 15 seg, com leitura de dados a cada 0,7°C. Diluições de um clone obtido a partir de uma biblioteca contendo o gene 16S rRNA foram utilizadas para amplificação e obtenção de curva padrão. Os plasmídeos foram quantificados em um espectrofotômetro de espectro completo (190 a 840 nm - NanoDrop® ND-1000) e diluídos para construir uma curva padrão de 10^3 até 10^7 genes μ^{-1} .

4.2.2 Resultados e discussão

4.2.2.1 Coleta e Caracterização dos Solos

As amostras de solo foram coletadas nos cinco sítios TPI analisados no presente trabalho (Costa do Açutuba, Balbina, Caldeirão-Capoeira, Caldeirão-Cultivado e Hatahara), situados na Amazônia Central. Cada ambiente apresenta distintos sistemas de uso da terra, caracterizados principalmente por agricultura de subsistência e floresta secundária. O sítio Balbina foi incluído no estudo por representar um modelo de sítio TPI não perturbado por manejo agrícola.

As amostras foram coletadas na profundidade de 0-10 cm. Após a coleta, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP, onde uma alíquota foi armazenada a -80°C para extração do DNA e futuras análises moleculares; outra

alíquota foi enviada ao Laboratório de Análises Químicas da ESALQ/USP para análise das características químicas das amostras de solo (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 - Características dos sítios TPI analisados neste estudo e atributos químicos do solo

Sítios TPI	Sistema de uso da terra	Idade (anos)	Horizonte antrópico (m)	pH	MO	P	S	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC	V
				(CaCl ₂)	(g/dm ⁻³)	(mg/dm ⁻³)		(mmolc/dm ⁻³)					(%)		
CALDEIRÃO-CAPOEIRA	Floresta secundária (~20 anos)	~1200	0,3 - 1,40	5,2	41,0	100,0	11,0	3,7	52,0	11,0	-	47,0	66,7	113,7	59,0
CALDEIRÃO-CULTIVADO	Cultivo de mandioca (~30 anos)	~1200	0,3 - 1,40	5,0	40,0	171,0	9,0	0,1	51,0	9,0	-	47,0	60,1	107,1	56,0
COSTA DO AÇUTUBA	Culturas de subsistência (agricultura familiar)	2000 - 2300	0,48 - 0,83	4,8	31,3	204,7	3,3	1,0	57,7	5,3	1,0	50,0	64,0	114,0	50,6
HATAHARA	Cultivo de banana e gramíneas	600 - 1000	0,43 - 0,69	5,2	53,0	508,7	4,3	1,1	138,3	13,7	-	48,7	153,7	201,7	76,0
BALBINA	Floresta secundária (>20 anos de abandono)	-	-	4,7	53,0	17,0	-	0,6	47,7	7,3	2,3	93,0	57,3	162,6	35,2

(-) Resultado <0,1 ou não determinado; MO: matéria orgânica do solo; SB: soma de bases; CTC: capacidade de troca catônica; V: saturação por bases. Adaptado de Grossman et al. (2010) e Liang et al. (2010).

De modo geral, a Análise de Componentes Principais (PCA) realizada com os dados químicos do solo revelou agrupamentos distintos para os cinco sítios estudados (Figura 4.3). Foi possível observar que o solo do sítio Hatahara apresentou valores elevados de cálcio (Ca), magnésio (Mg) e soma de bases (SB), além de valores consideráveis de fósforo (P), quando comparadas com as amostras dos outros quatro sítios, conforme observado anteriormente (Figura 2.4). O sítio Balbina, incluído neste estudo por representar um solo de TPI sem perturbação há muitos anos, ficou distante dos demais por apresentar teores de alumínio e acidez potencial, não detectados nas demais amostras. Pode-se notar também que as ordenações reuniram os sítios do Caldeirão e o Costa do Açutuba, que ficaram mais próximos entre si e relacionados a valores mais expressivos de potássio (K) e enxofre (S) no solo.

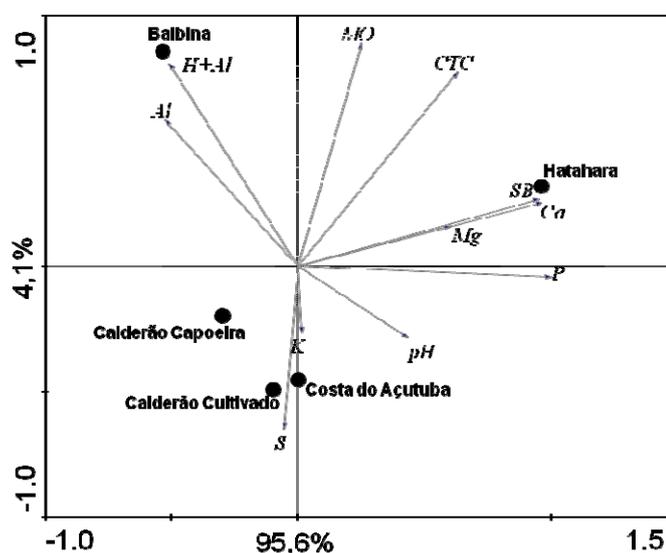


Figura 4.3 - Análise de Componentes Principais baseada nos elementos químicos dos solos de TPI

4.2.2.2 Caracterização genética da comunidade microbiana do solo e do carvão pirogênico

Extração do DNA genômico total da comunidade microbiana a partir dos solos TPI e do carvão pirogênico

O DNA total das comunidades microbianas dos solos TPI e seu respectivo carvão pirogênico foi extraído utilizando-se o *Power Soil DNA extraction* (MoBio, Carlsbad, CA), utilizando-se três repetições para cada sítio analisado, e a verificação da qualidade do material

extraído foi feita em gel de agarose a 1% (Figura 4.4). O padrão de peso molecular utilizado foi o *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen Life Technologies).



Figura 4.4 - Gel de agarose do DNA total dos solos TPI e seu respectivo carvão pirogênico. PM: padrão de peso molecular *Low DNA Mass Ladder*TM (Invitrogen Life Technologies)

A pureza e o rendimento das extrações foram satisfatórios para todos os sítios TPI e o carvão pirogênico. O material extraído referente às repetições para cada solo e carvão foi misturado para uma concentração final de 500ng de DNA genômico por amostra, e posteriormente foi enviado ao Center for Microbial Ecology da Michigan State University (MSU, EUA) para as reações de pirosequenciamento.

4.2.2.3 Pirosequenciamento de genes funcionais em solos TPI e carvão pirogênico

O pirosequenciamento das amostras foi realizado entre 27/05 e 01/07/2010 utilizando-se o sequenciador automático *Genome Sequencer FLX System* (454 Life Sciences) com a plataforma *GS FLX Titanium*, no Center for Microbial Ecology da Michigan State University (MSU, MI, EUA).

As sequências de genes catabólicos para degradação de hidrocarbonetos aromáticos obtidas para os cinco sítios TPI e seu respectivo carvão pirogênico, foram inicialmente analisadas quanto à qualidade de nucleotídeos pelo software do próprio equipamento

(*Genome Sequencer FLX System*, 454 Life Sciences), que descartou as leituras de baixa qualidade. As regiões correspondentes aos *primers* BPHD e aos *barcodes* foram também removidas no processo de filtragem inicial.

Como controle positivo para as reações de amplificação dos gene catabólicos e de pirosequenciamento, foi utilizada uma comunidade microbiana artificial (*mock community*), que compreende uma amostra de DNA onde se conhece a proporção do gene funcional. Neste caso, foi utilizada uma amostra contendo 10% de DNA genômico da estirpe *Burkholderia xenovorans* LB400, que contém um dos genes-alvo amplificados pelos *primers* BPHD, para degradação de bifenil (*bph*).

O número de sequências válidas geradas para os solos TPI e o carvão pirogênico dos cinco sítios analisados ficou entre 1525 para o solo TPI do Costa do Açutuba e 2610 para o carvão do sítio Caldeirão-Capoeira, como pode ser observado na Tabela 4.3. A média de comprimento das sequências obtidas entre todos os sítios foi de 462 pb.

Inicialmente, as amostras foram filtradas utilizando-se como parâmetros a presença do *primer* forward e dos *barcodes* utilizados, além de comprimento mínimo das sequências de 300pb. Em torno de 28.000 sequências foram positivas para os *barcodes* utilizados, totalizando 86,02% das sequências obtidas no pirosequenciamento. *Primers* e *barcodes* foram retirados e as sequências que passaram por este processo inicial de controle foram traduzidas *in silico* para a sequência de aminoácidos correspondente.

Tabela 4.3 - Dados do pirosequenciamento dos cinco sítios analisados neste estudo

Sample name	Sample name	Fonte	Barcode Name	Barcode Sequence	Sequences match barcode	Sequences average length	Valid sequences*	Valid sequences (%)*
CENA_1	COSTA DO AÇUTUBA	TPI	MID106	TCATCGAGTC	2339	463	1525	74,03
CENA_2	BALBINA	TPI	MID107	TCGAGCTCTC	2427	448	1666	74,31
CENA_4	CALDEIRÃO-CAPOEIRA	TPI	MID109	TCTGTCTCGC	2401	457	1923	86,43
CENA_5	CALDEIRÃO-CULTIVADO	TPI	MID110	TGAGTGACGC	3279	463	2428	85,95
CENA_6	HATAHARA	TPI	MID111	TGATGTGTAC	3087	465	2431	84,67
CENA_7	COSTA DO AÇUTUBA	Carvão	MID112	TGCTATAGAC	3267	465	2478	84,49
CENA_8	BALBINA	Carvão	MID113	TGCTCGCTAC	2639	467	1582	78,12
CENA_10	CALDEIRÃO-CAPOEIRA	Carvão	MID115	ACTCACAGAG	2975	455	2610	92,42
CENA_11	CALDEIRÃO-CULTIVADA	Carvão	MID116	AGACTCAGCG	2882	463	2396	90,86
CENA_12	HATAHARA	Carvão	MID117	AGAGAGTGTG	2656	468	1988	86,96
pos_Ctrl	CONTROLE POSITIVO	<i>Mock community</i>	MID109	TCTGTCTCGC	1080	470	882	99,32

*Sequências que passaram pelos processos de filtragem inicial e correção de *frameshifts*.

Em seguida, os erros em relação às fases de leitura das possíveis proteínas foram corrigidos utilizando-se a ferramenta RDP FrameBot (<http://fungene.cme.msu.edu/FunGenePipeline/>). Esta ferramenta permite que sejam selecionadas sequências de proteínas representativas de genes catabólicos, neste caso, do banco de dados do gene *bph* depositadas no FunGene (Funcional Gene Pipeline & Repository, <http://fungene.cme.msu.edu/>), para serem utilizadas na comparação entre as sequências resultantes do pirosequenciamento e correção das fases de leitura.

O RDP FrameBot produziu um bom alinhamento entre as sequências do pirosequenciamento e as do banco de dados, mesmo em presença de *frameshifts*. Somente os alinhamentos que produziram as melhores pontuações (*scores*) foram utilizados e reportados como sequências válidas, e como filtros foram ainda utilizados os parâmetros de porcentagem de identidade (>30%) e de comprimento de sequência no alinhamento (>130 aminoácidos).

Após o alinhamento, os *gaps* comuns foram removidos e as sequências únicas foram separadas em novo arquivo, de modo a diminuir o tempo de análise computacional. Em seguida, as sequências que passaram pelos filtros anteriores foram alinhadas utilizando-se a ferramenta HMMER3 *aligner*, disponível do FunGene, com a sequência de referência de *Pseudomonas putida* F1 (YP_001268196), que possui genes para degradação de hidrocarbonetos aromáticos, para a validação das sequências como possíveis proteínas funcionais. Foi gerado um histograma contendo as posições de início e fim dos alinhamentos em relação à sequência de referência, que pode ser observado na Figura 4.5.

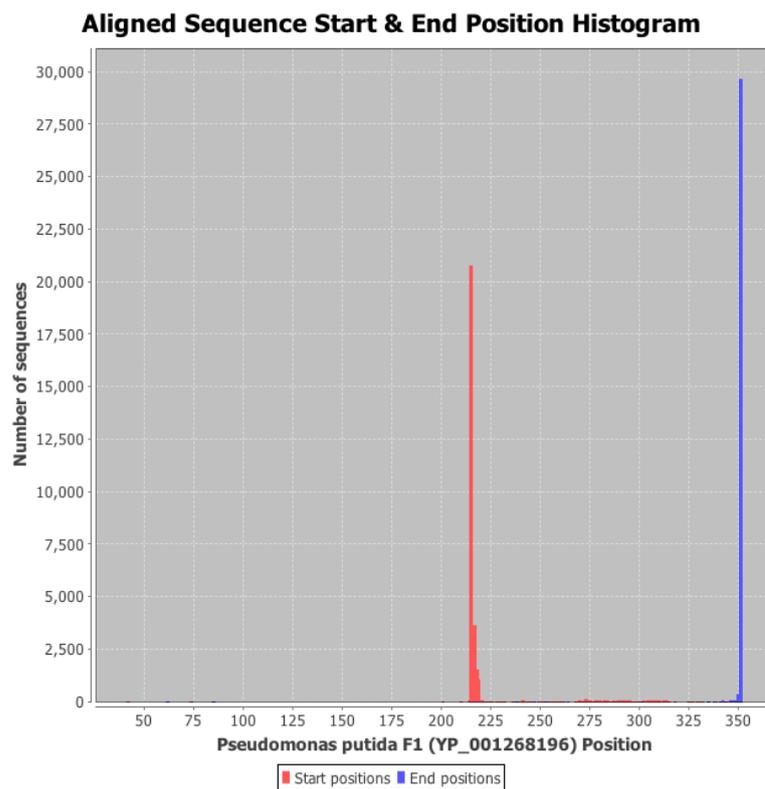


Figura 4.5 - Histograma demonstrativo das posições de alinhamento das seqüências do pirosequenciamento em relação à seqüência de referência de *P. putida* F1

Finalmente, as seqüências válidas foram agrupadas (*clustering*) utilizando-se o software MOTHUR (SCHLOSS et al., 2009), considerando-se um nível de dissimilaridade de 94% ao nível de aminoácido (*cutoff* 0,06) entre as seqüências de genes de dioxigenases aromáticas obtidas para os cinco sítios TPI analisados.

4.2.2.4 Parâmetros ecológicos e medidas de diversidade

O método de análise baseado na geração de UTOs ou, no caso de seqüências de aminoácidos, FPOs, permite analisar a freqüência de distribuição de seqüências de uma ou mais amostras através de uma matriz de distância. Esta estratégia possibilita calcular os índices de riqueza e diversidade de uma comunidade microbiana pela geração de grupos distintos em cada intervalo de *cutoff* da matriz de distância (DUARTE, 2010).

Para cada uma das amostras analisadas neste estudo foram calculados individualmente os índices de riqueza de ACE (CHAO et al., 1993), Chao1 (CHAO, 1984 e 1987) e *Jackknife*,

além dos índices de diversidade de *Shannon* e *Simpson*, juntamente com análises do esforço amostral, dadas pela curva de rarefação, e análises de membros compartilhados entre comunidades, baseados na matriz de distância e relacionadas nos diagramas de Venn (FAUTH et al., 1996).

Inicialmente, foi calculada a estimativa de rarefação de FPOs das amostras para diferentes *cutoffs* (Figura 4.6). Os dados foram plotados em função do número de sequências analisadas, que resulta em curvas de rarefação que são úteis para indicar se as sequências nucleotídicas ou de aminoácidos analisadas representam a riqueza de espécies de uma comunidade.

As curvas de rarefação para os diferentes *cutoffs* (0, 0,01, 0,03 e 0,06) demonstraram que o esforço amostral não foi suficiente para cobrir a riqueza de genes de dioxigenases tanto para amostras de TPI quanto de carvão pirogênico. Entretanto, para o sítio do Caldeirão sob cultivo, as curvas empregando *cutoff* de 0,06, utilizado para o cálculo da matriz de distância, começaram a apresentar um platô por volta de 2500 sequências, e para o sítio TPI sob capoeira o esforço amostral parece ter sido alcançado com pouco menos de 2000 sequências, sugerindo que a estimativa de riqueza de espécies foi contemplada.

Por outro lado, a amostra de carvão pirogênico do sítio Balbina apresentou claramente as curvas com maior inclinação entre as amostras analisadas. Este resultado, que sugere haver maior riqueza de espécies nesta amostra, pode também ter ocorrido como efeito do cálculo de estimativa de riqueza em função de um menor número de sequências de carvão amostradas (em torno de 1500).

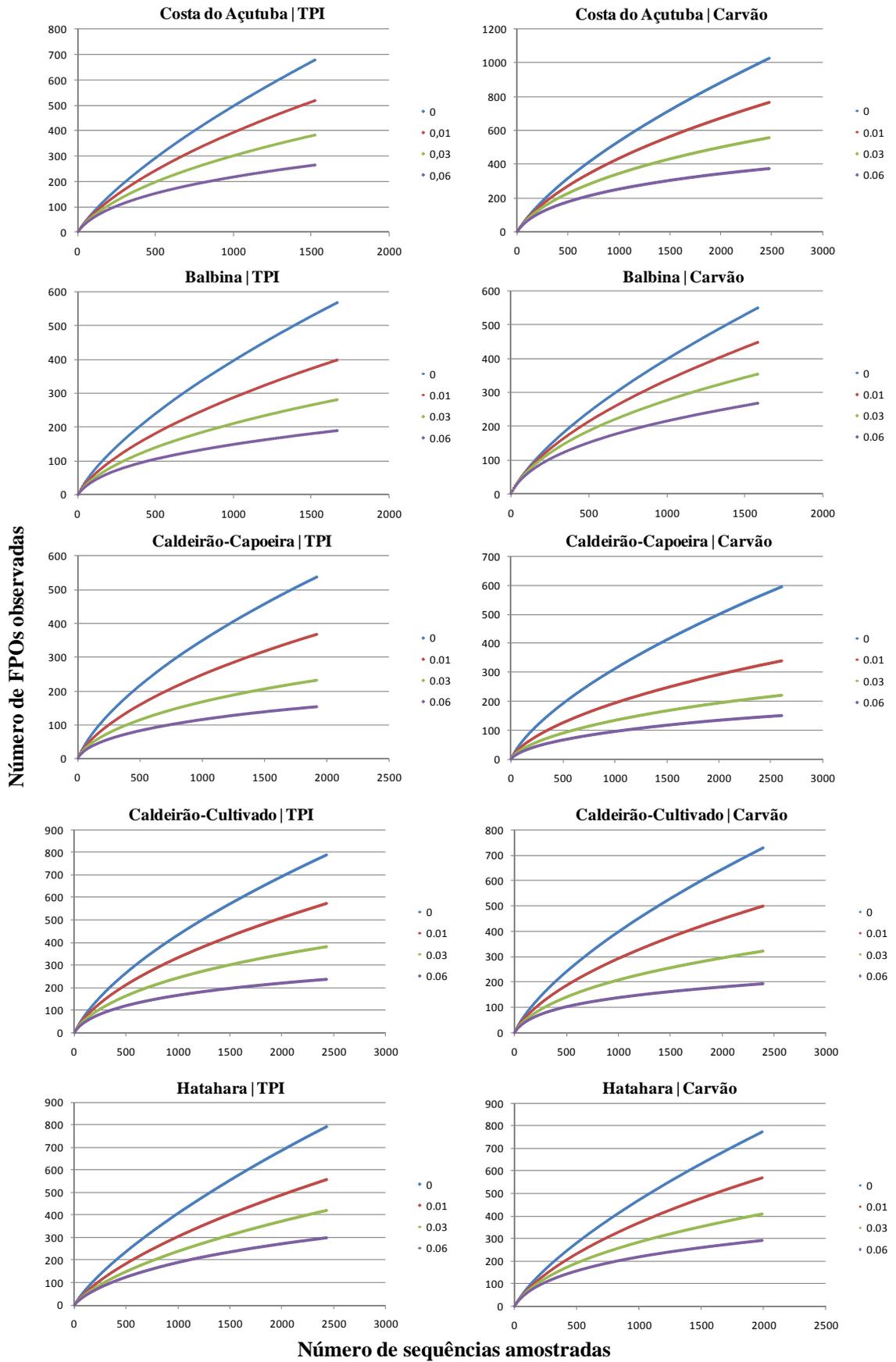


Figura 4.6 - Análises de rarefação para genes de dioxigenases aromáticas de TPI e carvão pirogênico para os cinco sítios analisados por pirosequenciamento, com valores de *cutoff* variando de 0 a 0,06

As estimativas de diversidade das amostras apresentaram diferenças claramente significativas, apesar de corresponderem a solos antrópicos com processos de formação similares. Entre os solos TPI, ao comparar duas amostras em função do mesmo número de sequências analisadas (em torno de 2500), a curva de rarefação para os sítios Caldeirão-Cultivado e Hatahara estimou aproximadamente 800 espécies de genes de dioxigenases únicas (*cutoff* 0) para ambos os sítios, sugerindo similaridade na estimativa de riqueza entre estes sítios. O Costa do Açutuba e o Balbina também apresentaram número elevado de sequências únicas, entre 600 e 700 para aproximadamente 1500 amostragens, assim como o Caldeirão sob capoeira, cujo número de sequências analisadas ficou em torno de 2000.

Em relação às amostras de carvão pirogênico, em três dos cinco sítios de TPI foram analisadas em torno de 2500 sequências do gene funcional para degradação de hidrocarbonetos aromáticos, onde o Costa do Açutuba apresentou a curva mais inclinada, estimando em torno de mais de 1000 espécies únicas de dioxigenases.

Os índices de riqueza e diversidade para as amostras de TPI e carvão pirogênico obtidas pelo pirosequenciamento foram calculados a partir de uma matriz de distância entre as sequências (*cutoff* 0,06), e os resultados encontram-se na Tabela 4.4. O número de FPOs encontradas com 94% de similaridade entre as sequências do mesmo grupo, em nível de aminoácido, foi maior para o carvão em relação aos solos TPI para os sítios Costa do Açutuba e Balbina. No sítio Hatahara, o número de FPOs no solo TPI foi ligeiramente maior em relação à amostra de carvão pirogênico, assim como no sítio do Caldeirão sob capoeira.

Tabela 4.4 – Dados do pirosequenciamento de genes de dioxigenases aromáticas obtidos para cada sítio TPI analisado neste estudo, incluindo as medidas de riqueza e índices de diversidade

Sítio TPI	Amostra	Sequências válidas	FPOs*	Medidas de riqueza*			Índices de Diversidade*		C (%)
				Chao1	ACE	Jackknife	Shannon (H')	Simpson	
Costa do Açutuba	TPI	1525	265	428,28 ± 116,04	541,66 ± 98,52	531,05 ± 124,36	4,41 ± 0,12	0,04 ± 0,009	91
	Carvão	2478	374	523,22 ± 93,22	666,48 ± 95,15	595,44 ± 82,86	4,86 ± 0,09	0,02 ± 0,004	93
Balbina	TPI	1666	189	339,61 ± 128,72	439,73 ± 98,64	390,50 ± 95,93	3,35 ± 0,14	0,15 ± 0,024	93
	Carvão	1582	269	497,60 ± 163,99	556,66 ± 104,96	628,57 ± 162,79	4,57 ± 0,10	0,02 ± 0,003	90
Caldeirão-Capoeira	TPI	1923	153	225,73 ± 71,68	294,60 ± 68,10	255,10 ± 56,53	3,28 ± 0,11	0,09 ± 0,011	95
	Carvão	2610	151	212,00 ± 59,24	284,57 ± 67,75	217,53 ± 33,71	2,32 ± 0,12	0,32 ± 0,028	96
Caldeirão-Cultivado	TPI	2428	237	353,00 ± 96,09	334,42 ± 62,72	417,80 ± 91,97	3,98 ± 0,10	0,06 ± 0,010	96
	Carvão	2396	194	300,50 ± 99,69	276,82 ± 60,08	321,32 ± 62,62	3,45 ± 0,11	0,14 ± 0,019	95
Hatahara	TPI	2431	299	462,44 ± 106,15	590,03 ± 102,25	522,86 ± 84,15	3,71 ± 0,12	0,08 ± 0,009	93
	Carvão	1988	292	454,68 ± 117,52	429,90 ± 77,29	525,50 ± 99,99	4,61 ± 0,10	0,03 ± 0,004	92

*Medidas de heterogeneidade calculadas com base em 94% de similaridade entre as sequências de genes de dioxigenases de *Bacteria* para as amostras de TPI e de carvão pirogênico (*cutoff* 0,06). Os desvios padrão estão mostrados na tabela.

FPOs: Famílias Protêicas Operacionais. C: cobertura das bibliotecas (GOOD, 1953).

De modo geral, os valores do índice de heterogeneidade de *Shannon* revelaram maior diversidade nas amostras do carvão pirogênico para três dos cinco sítios analisados (Figura 4.7). Diferentemente do estudo anterior, com as bibliotecas do gene funcional α -ARHD, os sítios do Caldeirão apresentaram maiores índices de diversidade nos solos de TPI para os genes de dioxigenases obtidos pelo pirosequenciamento, bem como as estimativas de riqueza de espécies, dadas por Chao1, ACE e *Jackknife*.

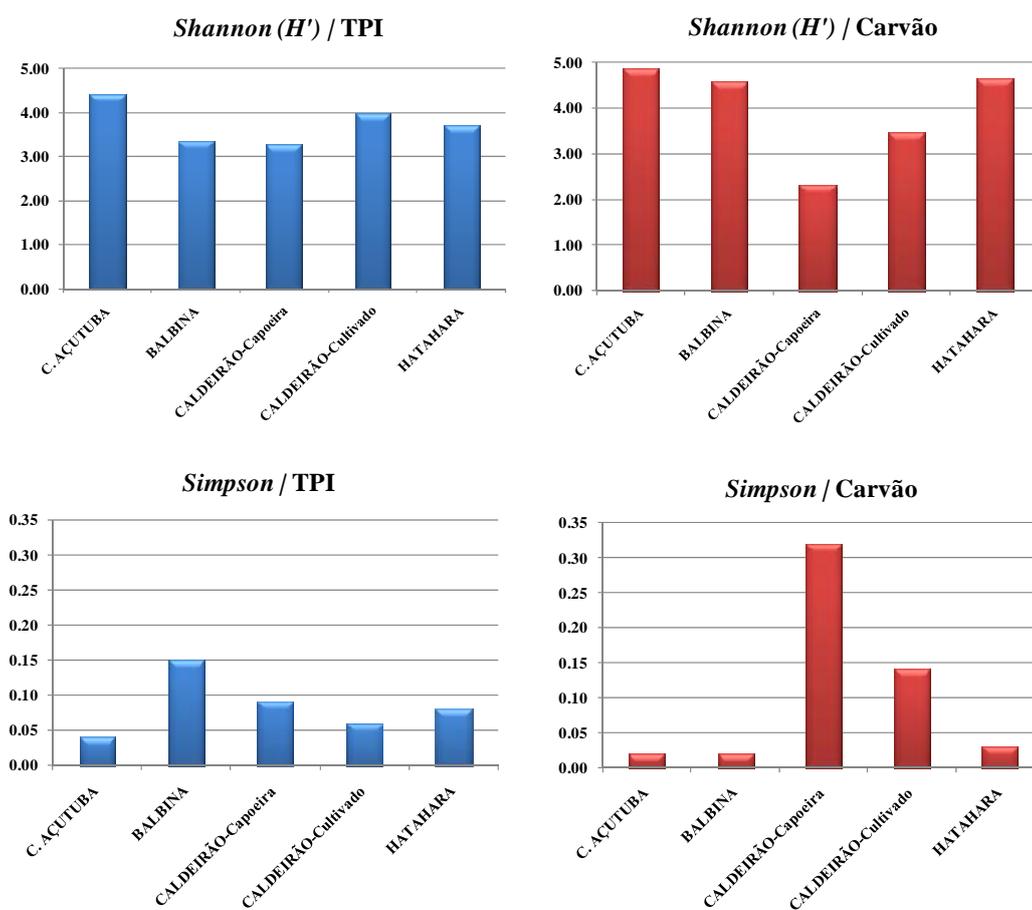


Figura 4.7 – Gráficos demonstrativos dos índices de diversidade estimados para os cinco sítios de TPI analisados, em relação às amostras de solo e carvão obtidas no pirosequenciamento

Uma possível explicação para esta diferença pode ser o maior número de seqüências analisadas por pirosequenciamento, em relação ao número de clones obtidos nas bibliotecas contendo os genes funcionais (em torno de 100 por amostra). Este aumento no número de seqüências pode ter favorecido a amostragem de espécies (FPOs) menos frequentes, e este fato pode ter influenciado diretamente os valores de diversidade de TPI e carvão pirogênico

no Caldeirão. A mesma relação de diversidade de FPOs foi estabelecida entre as amostras de TPI e do carvão com os valores obtidos pelo índice de diversidade de *Simpson*.

Os valores obtidos com os métodos não-paramétricos de Chao1, ACE e *Jackknife* para a estimativa de riqueza de FPOs nas amostras dos demais sítios analisados (Figura 4.8), corroboraram a interpretação obtida com os índices de diversidade, exceto para o sítio Hatahara, onde os estimadores ACE e Chao1 apresentaram valores maiores para a amostra de solo TPI. A explicação para isto pode estar no número elevado de sequências analisadas por pirosequenciamento e na equação utilizada em cada estimador. O valor obtido com o estimador *Jackknife*, que utiliza o valor de FPOs únicas para o cálculo da estimativa de riqueza, foi maior na amostra de carvão para o Hatahara, mesmo para um número menor de sequências analisadas em relação ao solo TPI.

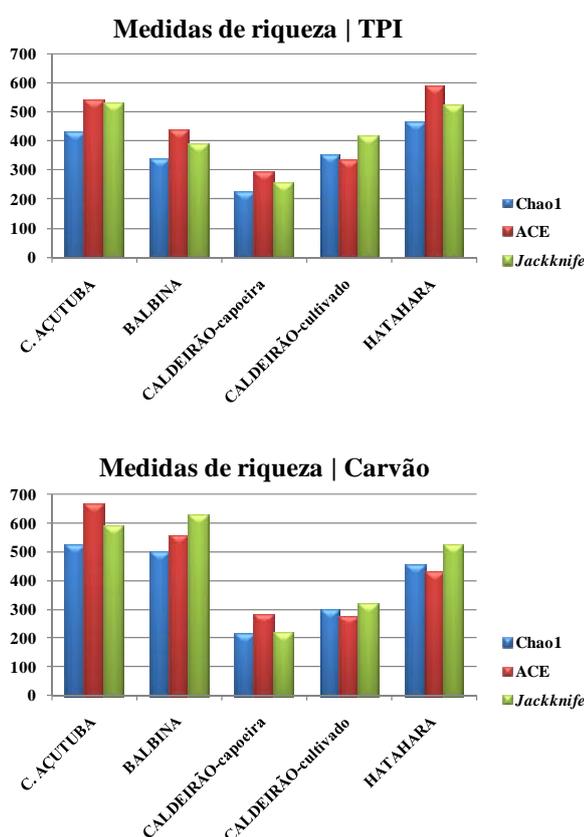


Figura 4.8 – Gráficos demonstrativos das medidas de riqueza de espécie estimadas para os cinco sítios de TPI analisados, em relação às amostras de solo e carvão obtidas no pirosequenciamento

De modo geral, as sequências de genes funcionais foram muito diversas em termos de heterogeneidade de espécies. Os índices de diversidade obtidos para os sítios Balbina e

Caldeirão-Capoeira, ambos sob floresta não perturbada há mais de 20 anos, além do Hatahara, apresentaram diferença elevada entre os valores para as FPOs do carvão e dos solos TPI, diferente do que foi observado para os demais, onde os índices de *Shannon* e de *Simpson* demonstraram diferenças mais sutis entre os valores obtidos para os solos TPI e o carvão pirogênico.

Apesar das similaridades entre a diversidade para algumas amostras, a análise realizada com o programa β -Libshuff, incluído no MOTHUR, apontou diferença estatística significativa entre todas as amostras analisadas, indicando que as comunidades funcionais de *Bacteria* presentes em solos TPI e carvão pirogênico são influenciadas diretamente pelas diferentes condições físico-químicas e ecológicas de ambientes distintos, conforme observado no estudo anterior com as bibliotecas de genes funcionais.

A amostra analisada a partir do carvão pirogênico presente no sítio Costa do Açutuba apresentou os maiores índices de diversidade entre os cinco sítios analisados, sendo que os menores valores foram encontrados na amostra de carvão do sítio do Caldeirão sob capoeira. A mesma relação foi encontrada para as amostras de solos TPI dos dois sítios para o índice de *Shannon*.

A estimativa do valor máximo de sequências (espécies) em um nível filogenético pode ser feita utilizando-se métodos estatísticos capazes de estimar a relação de espécies em função do número de sequências, a partir da curva de rarefação ou de métodos não-paramétricos. Para verificar a riqueza de FPOs das amostras de TPI e carvão analisadas por pirosequenciamento, foi utilizado o método de rarefação ao nível de 94% de similaridade, além dos estimadores de ACE, Chao1 e *Jackknife*.

O número de espécies (grupos) detectados em uma dada amostra, ou o número de organismos em um dado nível filogenético, são fortemente influenciados pelo número de sequências analisadas (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005). Deste modo, as estimativas do número de FPOs variam em função do número de sequências analisadas, e esta relação pode ser verificada pela construção das curvas de rarefação. Os resultados obtidos pela análise de rarefação indicaram que o número de sequências de genes de dioxigenases aromáticas não foi suficiente para amostrar completamente a riqueza de espécies das comunidades microbianas dos solos TPI e do carvão pirogênico (Figuras 4.9 a 4.13).

No entanto, as curvas de rarefação revelaram grandes diferenças entre as FPOs para todos os sítios TPI analisados, onde é possível notar claramente uma maior riqueza de FPOs nas amostras do carvão pirogênico em comparação com os solos TPI, exceto para os sítios do Caldeirão. De maneira mais pronunciada, foi possível observar uma maior riqueza para a amostra do carvão no sítio Balbina, considerado modelo de sítio TPI sem perturbação, sendo que no Hatahara as curvas de rarefação foram distribuídas de modo mais similar para ambos carvão e TPI.

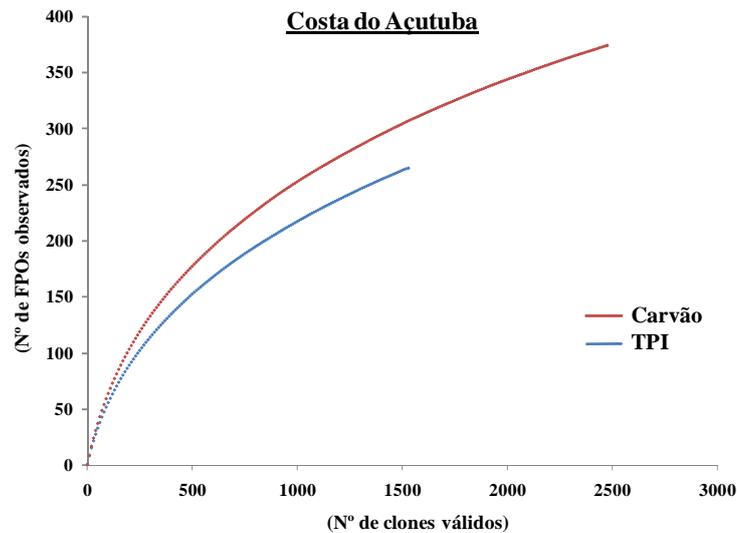


Figura 4.9 - Análise de rarefação estimada para genes de dioxigenases aromáticas em solos TPI e carvão pirogênico do sítio Costa do Acutuba. As FPOs foram agrupadas com base na similaridade das sequências com nível de 94%

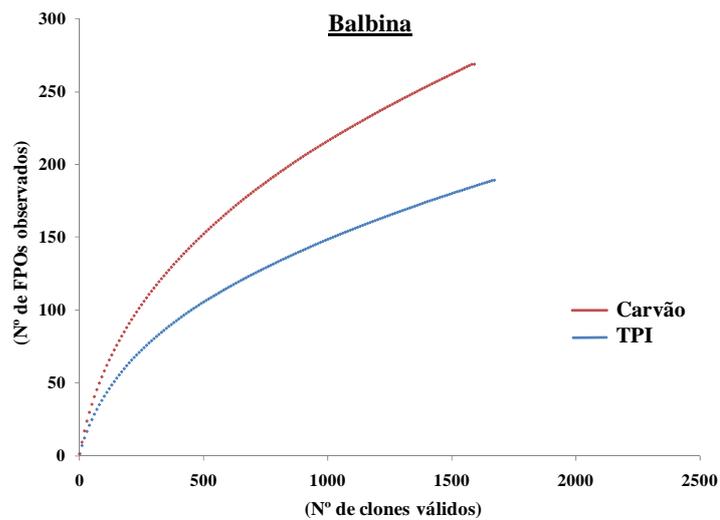


Figura 4.10 - Análise de rarefação estimada para genes de dioxigenases aromáticas em solos TPI e carvão pirogênico do sítio Balbina. As FPOs foram agrupadas com base na similaridade das sequências com nível de 94%

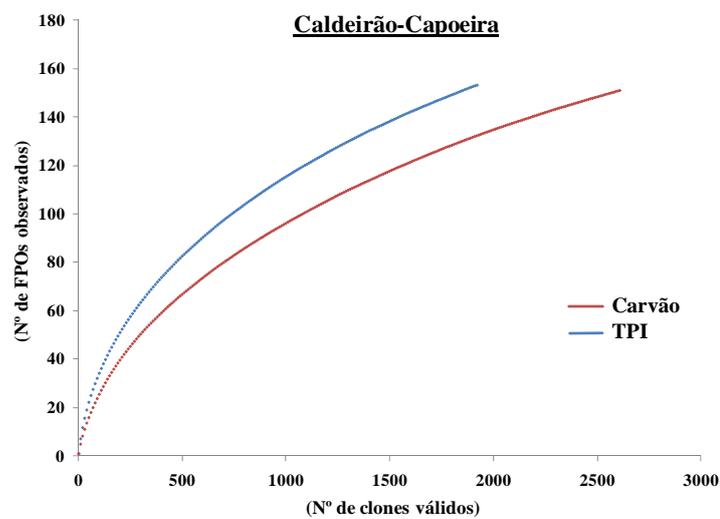


Figura 4.11 - Análise de rarefação estimada para genes de dioxigenases aromáticas em solos TPI e carvão pirogênico do sítio Caldeirão-Capoeira. As FPOs foram agrupadas com base na similaridade das sequências com nível de 94%

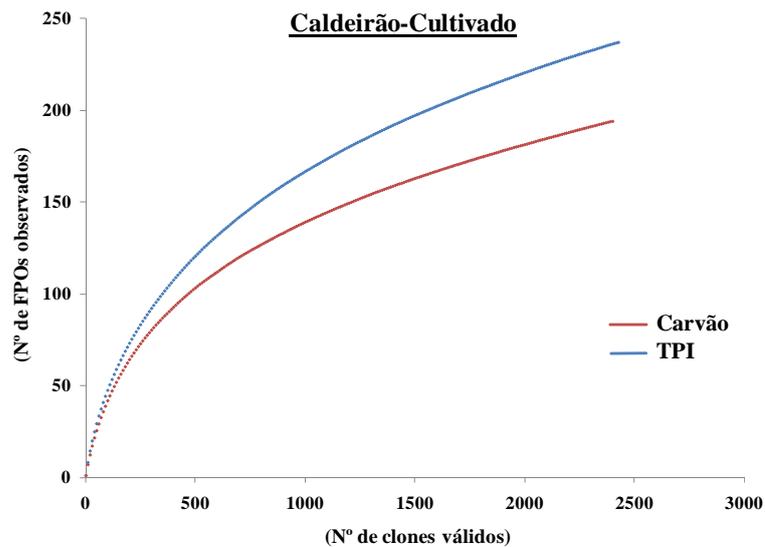


Figura 4.12 - Análise de rarefação estimada para genes de dioxigenases aromáticas em solos TPI e carvão pirogênico do sítio Caldeirão-Cultivado. As FPOs foram agrupadas com base na similaridade das sequências com nível de 94%

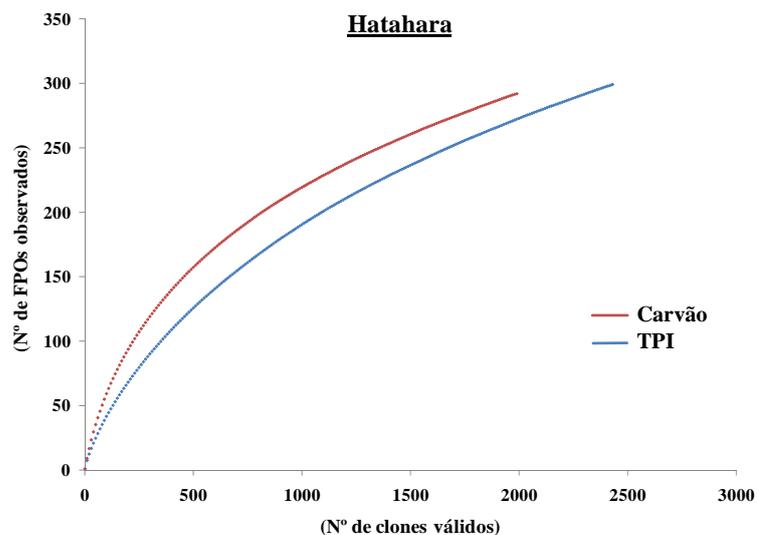


Figura 4.13 - Análise de rarefação estimada para genes de dioxigenases aromáticas em solos TPI e carvão pirogênico do sítio Hatahara. As FPOs foram agrupadas com base na similaridade das sequências com nível de 94%

Para verificar as intersecções e peculiaridades de cada ambiente, foram construídos diagramas de Venn, identificando o número de FPOs exclusivas e compartilhadas entre os solos TPI e o carvão pirogênico para cada sítio TPI analisado (Figura 4.14).

Foi possível observar maior quantidade de FPOs únicas nas amostras do carvão em comparação com as TPI, para três dos cinco sítios analisados, sendo que nos sítios do Caldeirão a quantidade de grupos únicos foi maior para os solos TPI, embora para o solo sob capoeira essa diferença tenha sido muito sutil, com apenas três FPOs a mais. Estes resultados concordam com as análises de rarefação, onde a riqueza de espécies no carvão pirogênico do Caldeirão sob cultivo agrícola e sob capoeira foi menor em comparação aos solos TPI.

A porcentagem de FPOs compartilhadas entre as amostras de TPI e carvão nos sítios Costa do Açutuba, Caldeirão-Cultivado e Hatahara foi muito similar, variando entre 20 e 22% do total de FPOs. Entretanto, no caso dos sítios Balbina e Caldeirão-Capoeira, caracterizados por cobertura vegetal de floresta secundária, a porcentagem de FPOs compartilhadas entre os solos TPI e o carvão pirogênico foi muito menor, ficando entre nove e 15% respectivamente, demonstrando elevada diferença entre as sequências de genes funcionais nestes ambientes.

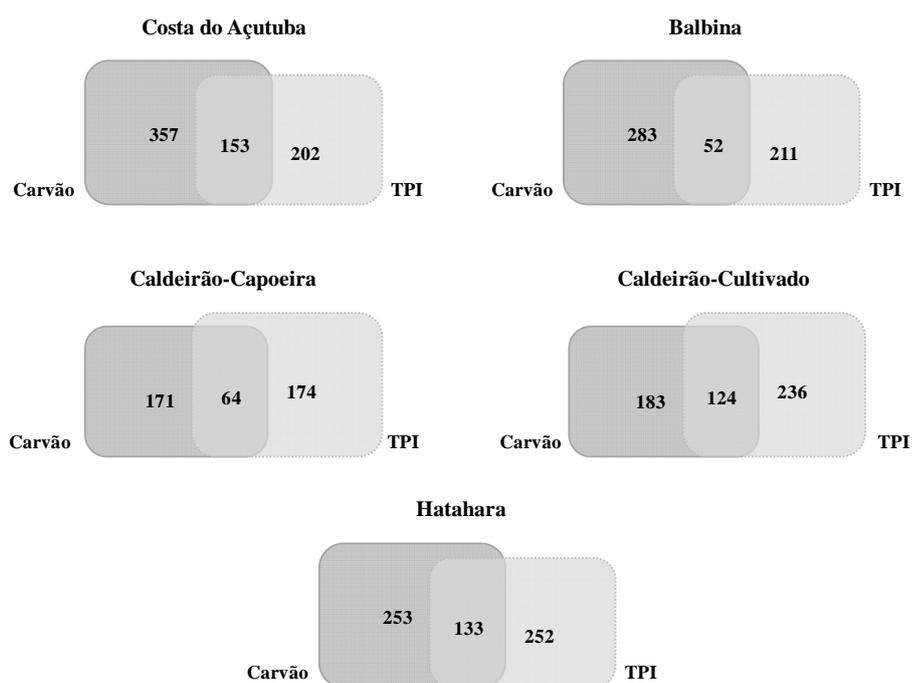


Figura 4.14 - Diagramas de Venn baseados nas FPOs de dioxigenases aromáticas únicas e compartilhadas (*cutoff* 0,06) para os solos de TPI e carvão pirogênico dos cinco sítios analisados por pirosequenciamento

Estes dados confirmam os resultados obtidos no estudo anterior, que sugerem que o carvão pirogênico, presente em grande quantidade nos solos TPI, parece ser o principal responsável pela manutenção da diversidade funcional de comunidades microbianas

envolvidas em processos metabólicos fundamentais nestes solos antrópicos, como a ciclagem de nutrientes e a dinâmica da matéria orgânica.

Em seguida às análises de diversidade e riqueza de espécies, foram obtidos os agrupamentos (*clusters*) entre as sequências de dioxigenases de TPI e carvão pirogênico com o banco de proteínas Pfam, com o objetivo de validar as sequências e estabelecer as relações filogenéticas entre estas e as enzimas disponíveis em bancos públicos de sequências. Uma vez que o pirosequenciamento produz grande quantidade de dados, é necessário agrupar as sequências para reduzir o número de análises.

As quase 22 mil sequências válidas produzidas pelo pirosequenciamento foram agrupadas com as dioxigenases de referência, baseado nas sequências de aminoácidos. Para isto, foram selecionadas 693 sequências com mais de 350 aminoácidos a partir do banco de dados de proteínas, que possuem ambos os domínios Rieske (PF00355) e Ring_hydroxyl_A (PF00848), contemplados pelos *primers* BPHD utilizados neste estudo.

Em média, foram gerados 900 grupos distintos a partir da matriz de dissimilaridade (94% ao nível de aminoácido) com as sequências de dioxigenases de solo e carvão pirogênico dos cinco sítios de TPI e as sequências do banco de dados. A Figura 4.15 sumariza os agrupamentos obtidos para este estudo.

O grande desafio de trabalhos envolvendo dados provenientes de metagenoma gene-específico, como no presente estudo, é a análise de grande quantidade de dados. Inicialmente, foram feitas tentativas de construção de árvores filogenéticas utilizando sequências representativas de cada cluster gerado neste estudo, sem, entretanto, obter-se resultados confiáveis, uma vez que as sequências são muito diversas e os valores de *bootstrap* muito baixos.

Desta forma, os *clusters* foram analisados separadamente e classificados como (i) novos grupos, compostos unicamente por sequências de TPI, carvão pirogênico e por ambos, (ii) *clusters* constituídos por dioxigenases do banco de dados e TPI ou carvão, além de grupos mistos de sequências de TPI, carvão pirogênico e Pfam, e finalmente, (iii) *clusters* que incluíram somente sequências do banco de dados.

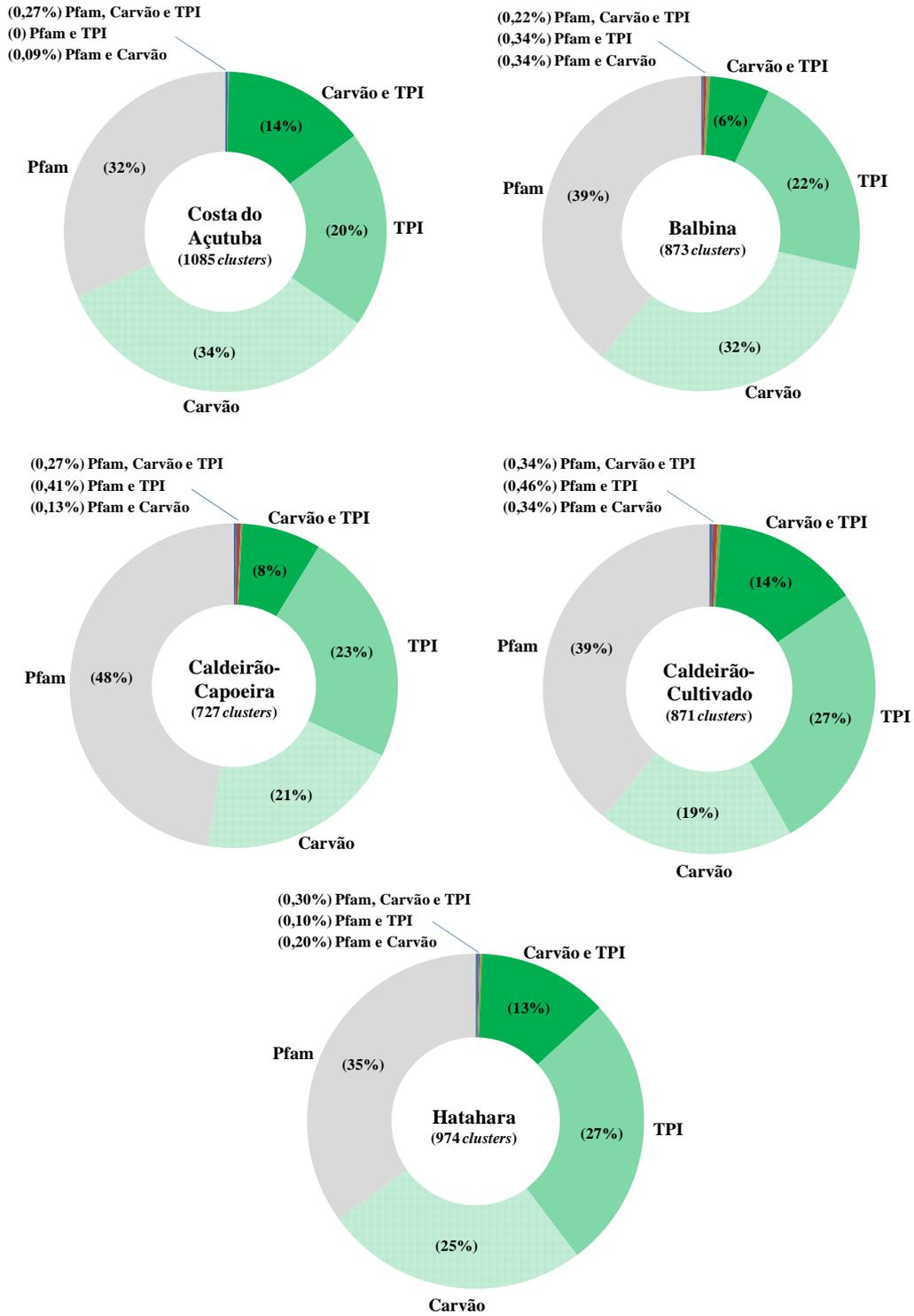


Figura 4.15 – Gráficos de abundância relativa dos agrupamentos (*clusters*) formados entre as sequências de dioxigenases de TPI e carvão pirogênico analisadas neste estudo e proteínas do banco de dados (Pfam), com dissimilaridade de 94% (*cutoff* 0,06) ao nível de aminoácido. Números entre parênteses: porcentagem de *clusters* em cada sítio

O sítio Costa do Açutuba produziu o maior número total de *clusters*, além do maior número de agrupamentos entre sequências unicamente encontradas em TPI e carvão, com 156 grupos. Conforme observado nos Diagramas de Venn para as sequências deste estudo, o Costa do Açutuba também incluiu o maior número de *clusters* com dioxigenases obtidas exclusivamente de carvão (366 grupos), e o sítio Hatahara reuniu a maioria de grupos com sequências únicas de solos TPI (259 grupos). Por outro lado, o Caldeirão-Capoeira produziu o menor número de grupos com dioxigenases exclusivas de TPI e também de grupos com sequências de carvão pirogênico (170 e 149 grupos, respectivamente) em relação ao total de *clusters*, entre todos os sítios analisados.

Em termos de sequências obtidas exclusivamente neste estudo (i), o Costa do Açutuba apresentou 68% de *clusters* compostos unicamente por dioxigenases não similares a enzimas depositadas no banco de dados, sendo o sítio com a maior porcentagem de sequências exclusivas de solos TPI e carvão pirogênico, seguido do Hatahara, com 65% do total de grupos obtidos para este sítio. No Costa do Açutuba e no Balbina, a porcentagem de grupos exclusivos do carvão foi bastante elevada (34 e 32%, respectivamente) em relação aos agrupamentos únicos de TPI (20 e 22%, respectivamente).

No presente estudo, o sítio Balbina reuniu a menor porcentagem de grupos constituídos por sequências compartilhadas entre TPI e carvão pirogênico (6% do total). De modo geral, as porcentagens de *clusters* únicos para TPI, bem como exclusivos de carvão, foram maiores do que os valores encontrados para os grupos mistos entre estas amostras, fato que demonstra que grupos bacterianos distintos são encontrados nestes dois ambientes, conforme observado anteriormente por Navarrete et al. (2010). Estes autores avaliaram sequências de pirosequenciamento do gene 16S rRNA no sítio Hatahara, para amostras de solo TPI e carvão pirogênico, onde foi possível verificar que 41% do total de UTOs encontradas no carvão foram únicas para este ambiente, não ocorrendo nas amostras do solo. Estes *clusters*, constituídos unicamente por dioxigenases descritas neste estudo, incluíram a maioria das sequências analisadas.

O número de grupos que reuniram somente dioxigenases aromáticas do banco de dados (iii) foi praticamente o mesmo para os cinco sítios, em torno de 340 (aproximadamente 39%). Por outro lado, a porcentagem de *clusters* mistos entre dioxigenases de TPI e carvão pirogênico com as sequências do banco de proteínas Pfam (ii) foi bastante reduzida para todos os sítios analisados, constituindo menos que 1% dos agrupamentos em todos os casos.

De modo geral, estes grupos mistos incluíram sequências de tolueno/bifenil dioxigenases selecionadas do banco de dados, como os genes *bphA1* de *B. xenovorans* LB400 (AAB63425) e *bphAa* de *Rhodococcus* sp. RHA1 (ABG99107), além de enzimas para degradação de HPAs, como o naftaleno e o fenantreno, descritas como dioxigenases amplamente distribuídas no ambiente (SMETS et al., 1993; PENG et al., 2008; WANG et al., 2008). Estes dados demonstram a extensa diversidade de genes funcionais presentes em solos de TPI e, principalmente, no carvão pirogênico, cuja maioria das dioxigenases não produziu agrupamentos significativos com sequências do banco de dados, conforme também observado no estudo anterior a partir da análise de bibliotecas contendo o gene catabólico.

4.2.2.5 PCR quantitativo em tempo real

Métodos baseados em PCR são ferramentas muito investigativas, que não dependem de técnicas de cultivo de micro-organismos para a obtenção de dados. Nesse contexto, a técnica de PCR quantitativo em tempo real permite quantificar a abundância (DNA) ou a atividade (mRNA) de genes funcionais específicos em amostras ambientais de modo relativamente rápido, cujos dados podem ser facilmente interpretados (JOHNSEN; KARLSON, 2007).

A quantificação de genes envolvidos em atividades funcionais de biotransformação e biodegradação, baseada em técnica de PCR em tempo real, permite o monitoramento destes processos no nível do DNA. Em presença de substratos específicos, as comunidades microbianas funcionais aumentam sua atividade metabólica, e esta sucessão pode ser estudada pela análise do aumento da quantidade de genes catabólicos, requeridos para a produção de enzimas degradativas (PISKONEN et al., 2005; BAELUM et al., 2006).

Deste modo, os dados obtidos a partir da técnica de PCR quantitativo podem permitir a comparação entre as comunidades funcionais dos cinco sítios analisados, sob diferentes coberturas vegetais e usos da terra, quanto ao número de cópias de genes de dioxigenases aromáticas, a fim de verificar a presença desta atividade metabólica nos solos TPI, e o papel do carvão pirogênico na sobrevivência de micro-organismos diretamente envolvidos na manutenção da qualidade biológica destes solos.

PCR quantitativa para os genes 16S rRNA e *bph*

Na PCR quantitativa para o gene 16S rRNA, a temperatura de *melting* média foi de 85,64°C, e a eficiência de amplificação foi de 99,3% com um valor de $R^2 > 0,99$ (Figuras 4.16 e 4.17). Este gene foi utilizado nas análises para a confirmação e validação dos resultados, considerando-se que múltiplas cópias do gene ribossomal ocorrem por célula bacteriana.

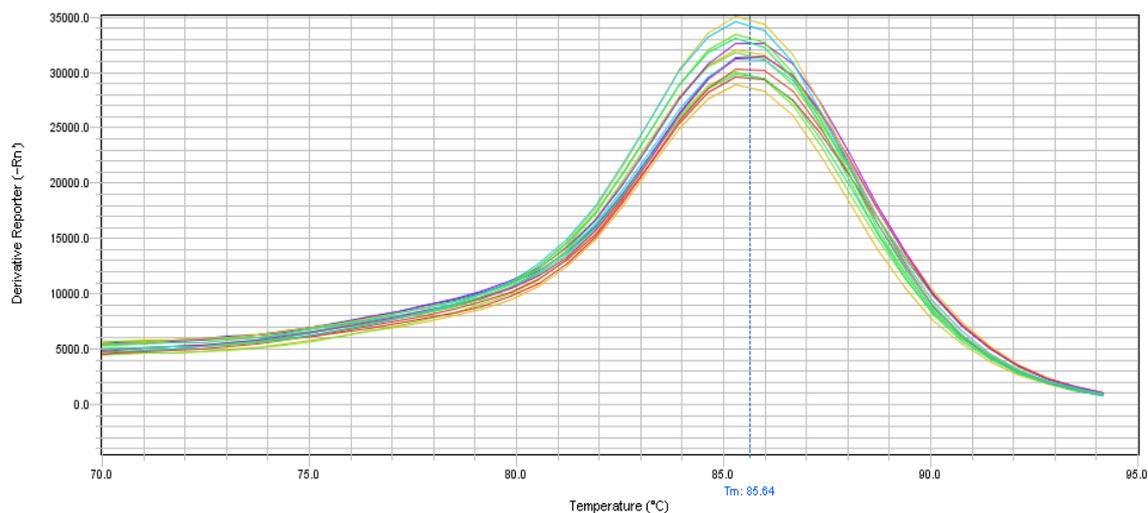


Figura 4.16 - Curva de *Melting* da reação para confirmação da amplificação específica do fragmento do gene 16S rRNA das amostras de TPI e carvão pirogênico e do clone de biblioteca genômica contendo o gene ribossomal utilizado na padronização

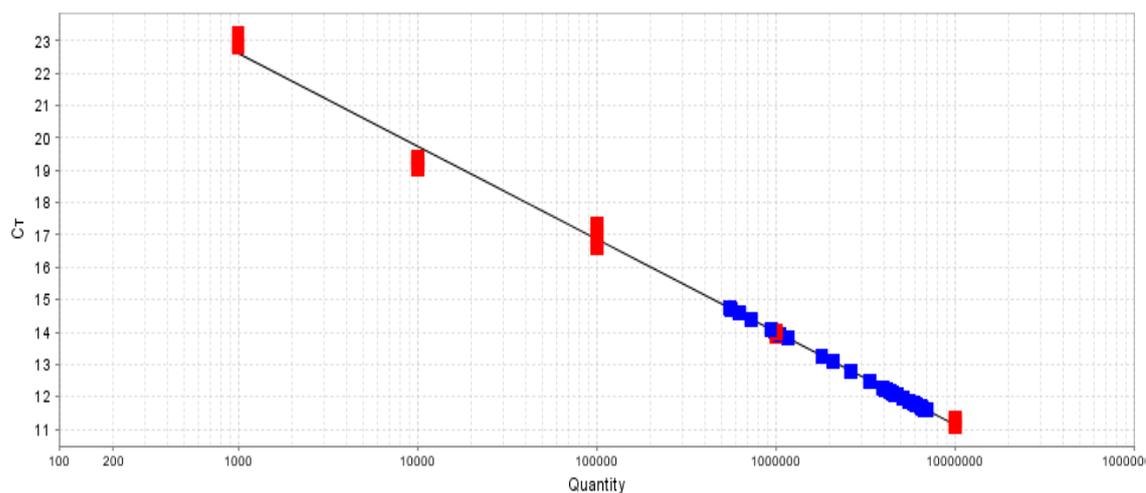


Figura 4.17 - Curva de amplificação padrão e quantificação do gene 16S rRNA para as amostras de solo TPI e carvão pirogênico. Os valores de Cts (*cycle threshold*) obtidos na reação foram utilizados para normalização dos dados. Pontos em vermelho: curva padrão a partir de clone de biblioteca genômica contendo o gene ribossomal; pontos em azul: amostras de solos TPI e carvão pirogênico analisadas neste estudo

Na PCR quantitativa para o gene *bph*, utilizado neste estudo como padrão para genes de dioxigenases aromáticas, a temperatura de *melting* média foi de 88,42°C, e a eficiência de amplificação foi de 99,9% com um valor de $R^2 > 0,99$ (Figuras 4.18 e 4.19).

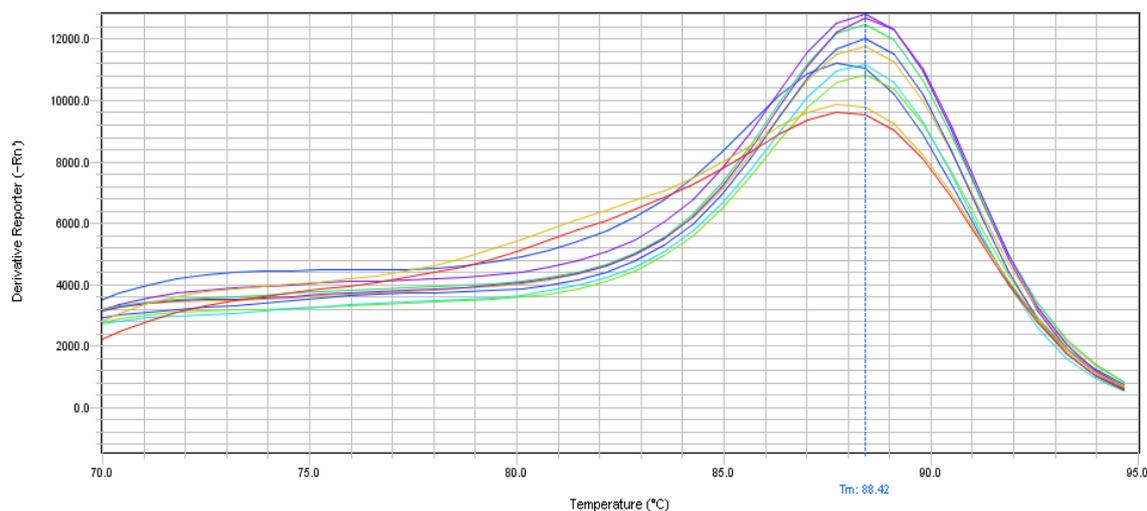


Figura 4.18 - Curva de *Melting* da reação para confirmação da amplificação específica do fragmento do gene de dioxigenases aromáticas das amostras de TPI e carvão pirogênico e do clone de biblioteca contendo o gene funcional *bph* utilizado na padronização

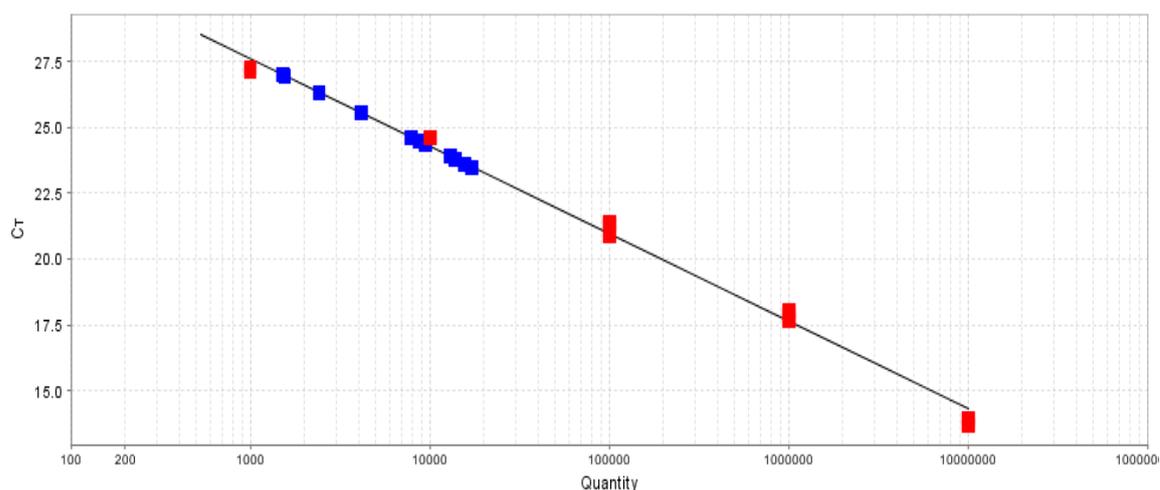


Figura 4.19 - Curva de amplificação padrão e quantificação de genes de dioxigenases aromáticas para as amostras de solo TPI e carvão pirogênico. Os valores de Cts (*cycle threshold*) obtidos na reação foram utilizados para normalização dos dados. Pontos em vermelho: curva padrão a partir de clone de biblioteca contendo o gene funcional *bph*; pontos em azul: amostras de solos TPI e carvão pirogênico analisadas neste estudo

A PCR quantitativa em tempo real permitiu a quantificação do gene ribossomal bacteriano 16S rRNA em amostras de solo e carvão de diferentes sítios de Terra Preta, além da quantificação do gene catabólico de dioxigenases aromáticas nas amostras analisadas. O número de cópias do gene ribossomal em amostras tanto de TPI quanto de carvão foi

praticamente o mesmo para todos os sítios, sendo que o Caldeirão sob cultivo agrícola e também sob capoeira apresentou as menores quantidades desse gene em relação aos demais.

De modo geral, foi possível verificar maior número de cópias de genes catabólicos nas amostras de carvão pirogênico quando comparadas ao solo dos seus sítios de origem (Figura 4.20). O sítio que apresentou maior número de cópias do gene ribossomal 16S por grama de solo e por grama de carvão foi o Hatahara, com $8,50 \times 10^8$ e $13,0 \times 10^8$ cópias de genes, respectivamente. Em relação às dioxigenases aromáticas, o sítio Caldeirão-Cultivado apresentou maior número de cópias do gene por grama de solo TPI ($7,20 \times 10^6$). Para o carvão pirogênico, o sítio Caldeirão-Capoeira demonstrou ter mais cópias de genes funcionais em relação às outras amostras analisadas, com $3,40 \times 10^6$ cópias, seguido do Balbina, com $2,70 \times 10^6$ genes / g de carvão.

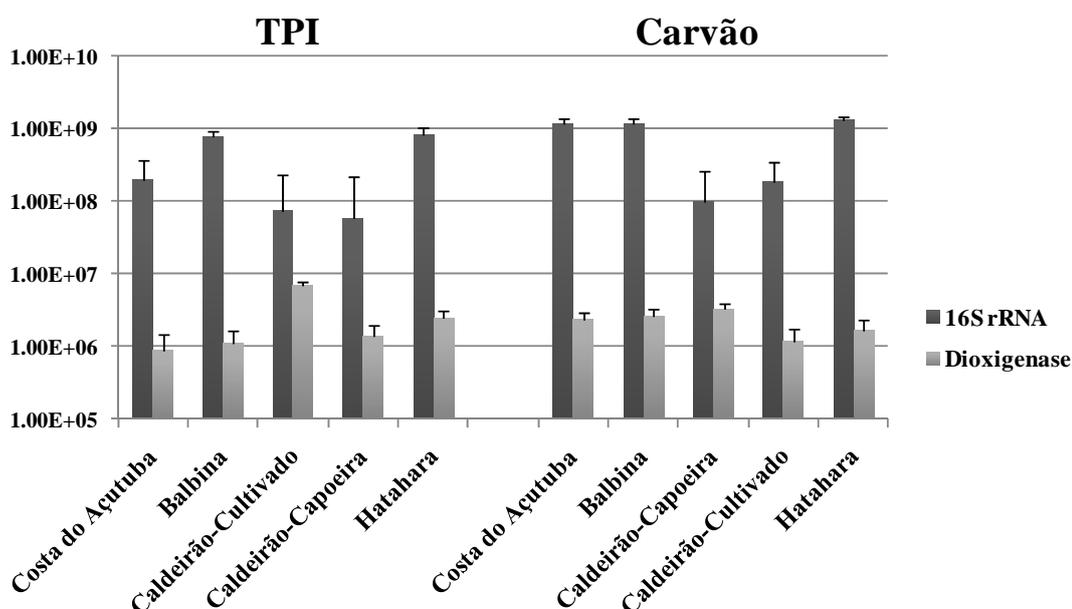


Figura 4.20 – Gráfico com a quantificação (abundância relativa) dos genes 16S rRNA e dioxigenases aromáticas nas amostras de solo TPI e carvão dos cinco sítios (indicados no eixo horizontal) analisados por PCR em tempo real. Eixo vertical: escala logarítmica (cópias do gene g^{-1}). Barra de erros representa o erro padrão ($n=3$)

A aplicação da PCR quantitativa em tempo real é uma ferramenta importante e útil para detectar e monitorar genes envolvidos em processos metabólicos no solo. Nesse contexto, é essencial não somente obter informação quantitativa sobre funções catabólicas específicas, mas também ser capaz de relacionar esta informação com a filogenia e a biologia das populações microbianas correspondentes. Ao invés de monitorar um único genótipo, o

foco deste tipo de análise é a detecção de certas funções biológicas realizadas por grupos microbianos específicos (FUTAMATA et al., 2001; BALDWIN et al., 2003).

Neste estudo, a PCR quantitativa em tempo real indicou que os sítios do Caldeirão, sob cultivo agrícola e sob capoeira, apresentaram maior número de cópias do gene catabólico em solos TPI e carvão pirogênico, respectivamente. Conforme descrito anteriormente, as Terras Pretas apresentam elevado grau de resiliência da fertilidade (GLASER et al., 2001), e esse fenômeno pode estar diretamente relacionado às comunidades funcionais, principalmente as populações microbianas envolvidas na ciclagem de carbono e nitrogênio (TAKETANI; TSAI, 2010).

Dentro de cada sítio analisado houve diferenças significativas entre o número de cópias do gene catabólico presente nos solos TPI e no carvão pirogênico. Os sítios Caldeirão-Cultivado e Hatahara apresentaram maior número de cópias do gene funcional nos solos TPI em relação às amostras de carvão pirogênico, a exceção dos demais, indicando que apesar do processo similar de formação antrópica das TPI, as comunidades microbianas funcionais são fortemente influenciadas pelos distintos sistemas de uso da terra e a cobertura vegetal. Somam-se a isso fatores edáficos e as diferentes épocas de ocupação das populações indígenas, com a consequente formação do carvão pirogênico presente nestes solos, onde os horizontes antrópicos são mais recentes, por exemplo, em relação aos solos do Costa do Açutuba.

Os resultados apresentados neste estudo sobre a diversidade de genes funcionais nas Terras Pretas da Amazônia produziram informação importante acerca do papel da comunidade bacteriana em processos metabólicos relacionados à fertilidade destes solos, e reforçam a necessidade de futuros estudos sobre os fatores que afetam e controlam a diversidade e a função de grupos microbianos relacionados a processos de biodegradação e biotransformação no ambiente. Da mesma forma, os dados permitiram elucidar o papel do carvão pirogênico na sobrevivência de populações funcionalmente ativas e, conseqüentemente, na manutenção da diversidade biológica de solos tropicais no Brasil.

4.3 Conclusões

Níveis apropriados de matéria orgânica e da ciclagem biológica de nutrientes são cruciais para o sucesso da manutenção da fertilidade de qualquer solo nos trópicos úmidos. O

manejo adequado, que inclui, entre outras práticas, a rotação com culturas de coberturas, a compostagem e a adição de adubos orgânicos, tem sido utilizado com sucesso, fornecendo nutrientes para as culturas por meio da ciclagem rápida de material orgânico através da biomassa microbiana e, conseqüentemente, ajudando a reter por mais tempo os fertilizantes minerais aplicados ao solo.

Os benefícios deste manejo adequado possuem, entretanto, curta durabilidade especialmente nos trópicos, uma vez que as taxas de decomposição são muito elevadas e o material orgânico adicionado é usualmente mineralizado para CO₂ após poucos ciclos de cultivo e, desse modo, a adição de fertilizantes orgânicos deve ser realizada a cada ano de modo a sustentar a produtividade do solo.

As Terras Pretas de Índio da Amazônia são solos antrópicos criados pelas populações indígenas entre 500 e 2500 anos atrás. Estes solos possuem elevadas concentrações de carbono orgânico, e a elevada fertilidade permanece constante mesmo após anos de abandono pelas populações que produziram as TPI. O carvão pirogênico consiste em uma forma de material orgânico altamente aromático, com concentrações de C entre 70 e 80%, e a presença deste material em solos tropicais pode constituir uma forma alternativa de manejo da fertilidade.

Este estudo analisou cinco sítios de TPI na Amazônia Central em relação à variabilidade de populações bacterianas funcionais contendo genes para degradação de compostos aromáticos. Para inferir o papel do carvão pirogênico na manutenção da diversidade destes solos, o DNA total da comunidade microbiana do carvão foi analisado separadamente, através de técnicas de pirosequenciamento e PCR quantitativo.

Para o pirosequenciamento, o comprimento dos produtos de PCR não devem ser muito longos para não reduzir a eficiência da reação. Desse modo, a região do gene selecionada para este estudo (aproximadamente 500 pb) é constituída de sítios conservados para o reconhecimento dos *primers*, além de possuir tamanho suficiente e ser funcionalmente importante, por conferir a especificidade da enzima ao substrato. A mesma região gênica foi utilizada com sucesso na PCR quantitativa, com o objetivo de avaliar o papel das populações funcionalmente ativas em solos TPI, com elevada quantidade de carvão pirogênico.

Através da técnica de pirosequenciamento foi gerada uma grande quantidade de dados para as amostras de TPI e carvão pirogênico e, como resultado, as quase 22 mil seqüências

analisadas ficaram reunidas em aproximadamente 2800 *clusters*, onde mais de 98% ficou composto por sequências descritas unicamente neste estudo, representando uma diversidade ainda não reportada para genes catabólicos bacterianos em solos TPI.

Foram encontradas diferenças nas proporções dos *clusters* que incluíram as sequências exclusivas deste estudo entre os cinco sítios de TPI analisados. Isto sugere a enorme complexidade de dioxigenases ambientais, principalmente em solos tropicais, que ficaram reunidas em diferentes combinações entre os *clusters* classificados como novos (i) em cada sítio.

Da mesma forma, o número de cópias de genes de dioxigenases em amostras de carvão, determinada por PCR quantitativo, foi frequentemente maior em relação aos solos TPI, confirmando o papel do carvão pirogênico na manutenção da diversidade microbiana e, conseqüentemente, na sustentação da qualidade biológica destes solos antrópicos.

As interações do carvão pirogênico com micro-organismos do solo são muito complexas. De um lado, a diversidade microbiana do solo e o tamanho das populações, bem como a composição e atividades específicas, podem ser afetadas pela quantidade e o tipo de carvão presente ou adicionado ao solo. Por outro lado, os micro-organismos são capazes de alterar diretamente as propriedades do carvão pirogênico. Ambas as interações influenciam de modo significativo a ciclagem de nutrientes no solo e, conseqüentemente, a disponibilidade de nutrientes para as plantas.

O efeito de grandes quantidades de carvão pirogênico nas comunidades microbianas funcionais é difícil de determinar, considerando que o carvão constitui uma forma de carbono altamente recalcitrante e microbiologicamente inerte. Mas por este mesmo motivo, a presença de carvão nos solos TPI pode ser responsável pela formação de micro-habitats estáveis, que suportam a sobrevivência de micro-organismos envolvidos em processos enzimáticos fundamentais no solo. Nesse contexto, o carvão pirogênico pode servir como elemento de recuperação de ambientes degradados, agindo como condicionador do solo, e como forma alternativa de manejo de solos agrícolas no Brasil, melhorando as características biológicas do ambiente.

As abordagens metagenômicas baseadas em genes específicos, como utilizado neste estudo, podem revelar muito mais informação sobre as sequências ambientais. Embora os genes funcionais ofereçam menor conservação entre as sequências em relação a marcadores

filogenéticos, como os genes ribossomais, análises que incluem técnicas combinadas em abordagens integradas podem prover uma melhor compreensão da biologia envolvida na diversidade de genes em ambientes antrópicos, como as Terras Pretas de Índio da Amazônia.

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.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 59, p. 143–169, 1995.
- BAELUM, J.; HENRIKSEN, T.; HANSEN, H.C.B.; JACOBSEN, C.S. The degradation of 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid in top- and subsoil is quantitatively linked to the class III *tfdA* gene. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 72, p. 1476–1486, 2006.
- BAGNÉRIS, C.; CAMMACK, R.; MASON, J.R. Subtle difference between benzene and toluene dioxygenases of *Pseudomonas putida*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 71, p. 1570–1580, 2005.
- BALDWIN, B.R.; NAKATSU, C.H.; NIES, L. Detection and Enumeration of Aromatic Oxygenase Genes by Multiplex and Real-Time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 3350-3358, 2003.
- BATEMAN, A.; COIN, L.; DURBIN, R.; FINN, R.D.; HOLLICH, V.; GRIFFITHS-JONES, S.; KHANNA, A.; MARSHALL, M.; MOXON, S.; SONNHAMMER, E.L.; STUDHOLME, D.J.; YEATS, C.; EDDY, S.R. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Research**, London, v. 36, p. D281–D288, 2008.
- BELLER, H.R.; KANE, S.R.; LEGLER, T.C.; ALVAREZ, P.J. A real-time polymerase chain reaction method for monitoring anaerobic, hydrocarbon-degrading bacteria based on a catabolic gene. **Environmental Science Technology**, Easton, v. 36, p. 3977–3984, 2002.
- BOUCK, A.; VISION, T. The molecular ecologist's guide to expressed sequence tags. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, p. 907-924, 2007.
- CÉBRON, A.; NORINI, M.-P.; BEGUIRISTAIN, T.; LEYVAL, C. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHDa) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 73, p. 148–159, 2008.
- CHAO, A. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. **Scandinavian Journal of Statistics**, Oxford, v. 11, p. 265-270, 1984.
- CHAO, A. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. **Biometrics**, Washington, DC, v. 43, p. 783-791, 1987.
- CHAO, A.; MA, M.C.; YANG, M.C.K. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. **Biometrika**, Cambridge, v. 80, p. 193-201, 1993.
- DUARTE, R.T.D. **Micro-organismos em ambientes criogênicos**: gelo glacial, solos expostos por recuo de geleiras e *permafrost* polares. 2010. 202 p. Tese (Doutorado em

Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

FAUTH, J.E.; BERNARDO, J.; CAMARA, M.; RESETARITS JUNIOR, W.J.; VAN BUSKIRK, J.; McCOLLUM, S.A. Simplifying the jargón of community ecology: a conceptual approach. **The American Naturalist**, Chicago, v. 147, n. 2, p. 282-286, 1996.

FUTAMATA, H.; HARAYAMA, S.; WATANABE, K. Groupspecific monitoring of phenol hydroxylase genes for a functional assessment of phenol-stimulated trichloroethylene bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, p. 4671–4677, 2001.

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

GOMES, N.C.M.; KOSHELEVA, I.A.; ABRAHAM, W.R.; SMALLA, K. Effects of the inoculant strain *Pseudomonas putida* KT2442 (pNF142) and of naphthalene contamination on the soil bacterial community. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 54, p. 21–33, 2005.

GOOD, I.J. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. **Biometrika**, Cambridge, v. 40, p. 237-264, 1953.

GORIS, J.; DE VOS, P.; CABALLERO-MELLADO, J.; PARK, J.; FALSEN, E.; QUENSEN 3rd, J.F.; TIEDJE, J.M.; VANDAMME, P. Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, n. 5, p. 1677-1681, 2004.

GROSSMAN, J.; O’NEILL, B.; TSAI, S.M.; LIANG, B.; NEVES, E.G.; LEHMANN, J. Amazonian anthrosols support similar microbial communities that differ distinctly from those extant in adjacent, unmodified soils of the same mineralogy. **Microbial Ecology**, Heidelberg, v. 60, p. 192–205, 2010.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 68, p. 669–685, 2004.

HARAYAMA, S.; KOK, M.; NEIDLE, E.L. Functional and evolutionary relationships among diverse oxydases. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 46, p. 565-601, 1992.

HARAYAMA, S.; TIMMIS, K.N. Catabolism of aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas*. In: HOPWOOD, D.A.; CHARTER, K. (Ed.). **Genetics of bacterial diversity**. New York: Academic Press, 1989. p. 151-174.

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

HUBER, J.A.; WELCH, D.B.M.; MORRISON, H.G.; HUSE, S.M.; NEAL, P.R.; BUTTERFIELD, D.A.; SOGIN, M.L. Microbial population structures in the deep marine biosphere. **Science**, Washington, DC, v. 318, p. 97–100, 2007.

IWAI, S.; CHAI, B.; SUL, W.J.; COLE, J.R.; HASHSHAM, S.A.; TIEDJE, J.M. Gene-targeted-metagenomics reveals extensive diversity of aromatic dioxygenase genes in the environment. **The ISME Journal**, London, v. 4, p. 279-285, 2010.

JOHNSEN, A.R.; KARLSON, U. Diffuse PAH contamination of surface soils: environmental occurrence, bioavailability, and microbial degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 76, n. 3, p. 533-543, 2007. Review.

KIMURA, N.; NISHI, A.; GOTO, M.; FURUKAWA, K. Functional analyses of a variety of chimeric dioxygenases constructed from two biphenyl dioxygenases that are similar structurally but different functionally. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 179, p. 3936-3943, 1997.

LIANG, B.; LEHMANN, J.; SOHI, S.P.; THIES, J.E.; O'NEILL, B.; TRUJILLO, L.; GAUNT, J.; SOLOMON, D.; GROSSMAN, J.; NEVES, E.G.; LUIZÃO, F.J. Black carbon affects the cycling of non-black carbon in soil. **Organic Geochemistry**, Amsterdam, v. 41, p. 206–213, 2010.

ROESCH, L.F.; FULTHORPE, R.R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A.K.; KENT, A.D.; DAROUB, S.H.; CAMARGO, F.A.; FARMERIE, W.G.; TRIPLETT, E.W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME Journal**, London, v. 1, p. 283–290, 2007.

MEYER F, PAARMANN D, D'SOUZA M, OLSON R, GLASS EM, KUBAL M, PACZIAN T, RODRIGUEZ A, STEVENS R, WILKE A, WILKENING J AND EDWARDS RA. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, London, v. 9, p. 386-393, 2008.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Why metagenomics? In: _____. **The New Science of Metagenomics**. Washington, DC: The National Academies Press, 2007. p. 12–32.

NAVARRETE, A.A.; CANNAVAN, F.S.; TAKETANI, R.G.; TSAI, S.M. A molecular survey of the diversity of microbial communities in different Amazonian agricultural model systems. **Diversity**, Bethesda, v. 2, p. 787-809, 2010.

PARALES, R.E.; LEE, K.; RESNICK, S.M.; JIANG, H.; LESSNER, D.J.; GIBSON, D.T. Substrate specificity of naphthalene dioxygenase: effect of specific amino acids at the active site of the enzyme. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 182, p.1641–1649, 2000.

PARAMESWARAN, P.; JALILI, R.; TAO, R.; SHOKRALLA, S.; GHARIZADEH, B.; RONAGHI, M.; FIRE, A.Z. A pyrosequencing-tailored nucleotide barcode design unveils opportunities for large-scale sample multiplexing. **Nucleic Acids Research**, London, v. 35, e.130, 2007. doi: 10.1093/nar/gkm760.

PENG, R.H.; XIONGM, A.S.; XUE, Y.; FU, X.Y.; GAO, F.; ZHAO, W.; TIAN, Y.S.; YAO, Q.H. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 32, n. 6, p. 927-955, 2008. Review.

PISKONEN, R.; NYSSÖNEN, M.; RAJAMÄKI, T.; ITÄVAARA, M. Monitoring of accelerated naphthalene-biodegradation in a bioaugmented soil slurry. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 16, n. 2, p. 127-134, 2005.

RONAGHI, M.; KARAMOHAMED, S.; PETTERSSON, B.; UHLEN, M.; NYREN, P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 242, p. 84-89, 1996.

RONAGHI, M. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. **Genome Research**, Woodbury, v. 11, p. 3-11, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 78, p. 117-130, 1989.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Toward a census of bacteria in soil. **PLOS Computational Biology**, Cambridge, v. 2, p. 786-793, 2006.

SCHLOSS, P.D.; WESTCOTT, S.L.; RYABIN, T.; HALL, J.R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E.B.; LESNIEWSKI, R.A.; OAKLEY, B.B.; PARKS, D.H.; ROBINSON, C.J.; SAHL, J.W.; STRES, B.; THALLINGER, G.G.; VAN HORN, D.J.; WEBER, C.F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 75, p. 7537-7541, 2009.

SMETS, B.F.; RITTMANN, B.E.; STAHL, D.A. The specific growth rate of *Pseudomonas putida* PAW1 influences the conjugal transfer rate of the TOL plasmid. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 59, n. 10, p. 3430-3437, 1993.

SOGIN, M.L.; MORRISON, H.G.; HUBER, J.A.; MARK WELCH, D.; HUSE, S.M.; NEAL, P.R.; ARRIETA, J.M.; HERNDL, G.J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored 'rare biosphere'. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 103, p. 12115-12120, 2006.

SUENAGA, H.; OHNUKI, T.; MIYAZAKI, K. Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 9, p. 2289-2297, 2007.

TAKETANI, R.G.; TSAI, S.M. The influence of different land uses on the structure of archaeal communities in Amazonian anthrosols based on 16S rRNA and amoA genes. **Microbial Ecology**, Heidelberg, v. 59, p. 734-743, 2010.

VARDAR, G.; WOOD, T.K. Protein engineering of toluene-o-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1 for enhanced chlorinated ethene degradation and o-xylene oxidation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 68, p. 510-517, 2005.

WANG, L.; QIAO, N.; SUN, F.; SHAO, Z. Isolation, gene detection and solvent tolerance of benzene, toluene and xylene degrading bacteria from nearshore surface water and Pacific Ocean sediment. **Extremophiles**, Berlin, v. 12, n. 3, p. 335-342, 2008.