Universidade de São Paulo Centro de Energia Nuclear na Agricultura

A estrutura e composição de comunidades microbianas (*Bacteria* e *Archaea*) em fragmentos de carvão pirogênico de Terra Preta de Índio da Amazônia Central

FABIANA DE SOUZA CANNAVAN

Piracicaba

2011

FABIANA DE SOUZA CANNAVAN

A estrutura e composição de comunidades microbianas (*Bacteria* e *Archaea*) em fragmentos de carvão pirogênico de Terra Preta de Índio da Amazônia Central

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da 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

Cannavan, Fabiana de Souza

A estrutura e composição de comunidades microbianas (*Bacteria* e *Archaea*) em fragmentos de carvão pirogênico de Terra Preta de Índio da Amazônia Central / Fabiana de Souza Cannavan; orientadora Siu Mui Tsai. - - Piracicaba, 2011.

138 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.

Biologia molecular 2. Dados de sequência molecular 3. Ecologia microbiana
Ecologia do solo 5. Solo tropical I. Título

CDU 579.26:662.711

Especialmente aos meus pais,

Luis e Clarice,

por me darem apoio em todos os momentos...

Às minhas irmãs, Cristina e Graziela,

Às minhas sobrinhas, Mariane e Leticia,

Ao Dimas,

que me ensinaram que o amor é TUDO!

DEDICO

Agradeço...

- ✓ à Deus, por me auxiliar em mais uma etapa concluída da minha vida;
- ✓ aos meus queridos pais Luis e Clarice, as minhas irmãs Cristina e Graziela e minhas sobrinhas Mariane (+1) e Leticia, por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida...vocês são tudo para mim!;
- à minha querida orientadora Dra. Siu Mui Tsai, pelo incentivo, confiança, pela contribuição marcante na minha formação profissional e em especial a sólida amizade que construímos durante esse tempo, e que tempo...;
- ✓ à FAPESP Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de estudos para a realização deste trabalho;
- ✓ ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura por permitir a realização deste trabalho;
- ✓ ao Dimas, pelo amor, carinho, companheirismo, pelo auxílio nos momentos difíceis e principalmente pelo bom humor;
- ✓ as minhas amigas da Terra Preta: Mari, Amanda e Maju, que tanto me ajudaram durante o desenvolvimento deste trabalho, pela amizade e pela ótima convivência. Adoro vocês;
- ✓ ao Acácio, além da nossa amizade, agradeço pelo apoio sempre positivo, pelas discussões, pela fundamental ajuda nas análises e ainda pela revisão do texto;
- ✓ ao Lucas, pela companhia nas coletas, congressos, pela amizade e apoio nas análises deste trabalho e pela revisão do texto;
- ✓ aos técnicos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Chiquinho, Elias, Fábio e Wagner, pelos ensinamentos e amizade;
- ✓ a Ludi, pela ajuda, amizade e pela diversão garantida... chão, chão, chão....
- ✓ à Dra. Eiko Kuramae, pelo apoio e orientação durante a realização do estágio no exterior (NIOO - Holanda);
- ✓ ao Dr. Johannes A van Veen, chefe do departamento de Ecologia microbiana do NIOO-KNAW, Wageningen/Holanda, pelo apoio durante minha pesquisa na Holanda;
- ✓ ao Dr. James M. Tiedje, da Michigan State University (MSU-EUA), pelo suporte na realização do pirosequenciamento;
- ✓ à bibliotecária do Cena Marília Henyei pela ajuda prestada;
- ✓ aos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular: Aline, Bia, Bianca, Caio, Clóvis, Denis, Ézio, Felipe, Jane, Lina, Marcela, Marília, Marina, Naíssa,...;

- ✓ aos colegas da salinha: Milena, Ana, Aline, Enéas e Gustavo, pelos vários momentos de descontração;
- ✓ à Dani, pela amizade, dicas e companhia no laboratório "Genoma";
- ✓ aos meus familiares que sempre me apoiaram, agradeço pelos momentos de alegria, união... em especial a Família Pallu, Família Pereira e Família Rodrigues de Moraes;
- ✓ às minhas grandes amigas Denise e Lidiane, que me apóiam em qualquer situação;
- ✓ à Carol, pela amizade e anos de convivência e cumplicidade;
- às minhas amigas Ana Paula, Camila, Érica, Giana, Graziela, Marcinha, Mariane, Thaís e Sabrina pelos bons momentos de alegria que compartilhamos.
- ✓ aos meus cunhados Rogério, Fernando e Renê;
- ✓ a turma do Apoio Acadêmico e pós-graduação do Cena, Alzira, Gilson, Sonia, Claudia, Neuda e Fábio pela ajuda durante o doutorado;
- ✓ ao Sandoval, pelo auxílio durante as coletas de amostras de solos;
- ✓ à todos que de alguma forma contribuíram com esta conquista.

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

CANNAVAN, F. S. A estrutura e composição de comunidades microbianas (*Bacteria* e *Archaea*) em fragmentos de carvão pirogênico de Terra Preta de Índio da Amazônia Central. 2011. 138 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

As Terras Pretas de Índio (TPI), também conhecida por Amazonian Dark Earth, apresentam horizonte A antrópico, elevado pH, nutrientes importantes para o crescimento das plantas, elevado teor de carvão pirogênico e intensa atividade biológica quando comparadas aos seus solos de origem. A comunidade microbiana do solo é essencial para o funcionamento dos ecossistemas, sendo fundamentais em processos de decomposição da matéria orgânica, na disponibilização de nutrientes para as plantas e na ciclagem de nutrientes. Este estudo teve como objetivo acessar as estruturas e composição das comunidades de Bacteria e Archaea em fragmentos de carvão pirogênico (provenientes de TPI), TPI e solo adjacente (ADJ) utilizando as técnicas moleculares. Os solos foram coletados em quatro sítios arqueológicos (Balbina, Barro Branco, Costa do Açutuba e Hatahara), localizados na Amazônia Central. Em geral, as TPIs apresentaram elevados valores de pH, P e Ca corroborando com resultados anteriores em TPIs. As amostras de TPI dos sítios Balbina, Barro Branco e Hatahara apresentaram maior número de cópias do gene 16S rRNA de Bacteria quando comparadas com as amostras de solo ADJ. Os resultados obtidos pelas técnicas de fingerprinting (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism – T-RFLP e Denaturing Gradient Gel Electrophoresis – DGGE) utilizando o gene 16S rRNA de Bacteria e Archaea revelaram que as estruturas das comunidades bacterianas em fragmentos de carvão apresentaram diferenças significativas quando comparados com os solos ADJ. A partir da técnica de pirosequenciamento, os filos Proteobacteria, Actinobacteria e Crenarchaeota apresentaram predominância nos fragmentos de carvão. Observou-se também que em fragmentos de carvão, os microorganismos encontrados podem estar diretamente relacionados aos ciclos do N e C. Além disso, a presença desses micro-organismos em fragmentos de carvão pode favorecer a microbiota do solo e, consequentemente, sua qualidade. Neste sentido, o carvão pode também servir como elemento de recuperação em ambientes degradados, agindo como condicionador do solo sendo esta uma alternativa promissora no manejo de solos agrícolas.

Palavras-chave: Carvão pirogênico, Solos, *Bacteria*, *Archaea*, Biologia molecular, Ecologia microbiana

ABSTRACT

CANNAVAN, F. S. Structure and composition of bacterial communities (Bacteria and Archaea) in fragments of pyrogenic charcoal from Amazonian Dark Earth in the Central Amazon. 2011. 138 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Amazonian Dark Earth (ADE), also known as Terra Preta de Índio, present tropical A horizon, high pH, important nutrients for plant growth, high pyrogenic charcoal levels and intense biological activity when compared to its soil of origin. Soil microbial community is essential for ecosystem function, which is involved in fundamental processes such as the decomposition of organic matter, availability of nutrients to plants and the nutrient cycling. The objective of this study was to assess the structure and composition of bacterial and archaeal communities in fragments of pyrogenic charcoal (from ADE), ADE and adjacent soil (ADJ) using molecular techniques. The soils were collected in four archaeological sites (Balbina, Barro Branco, Costa do Acutuba and Hatahara), located in the central Amazon. In general, ADE presented high values of pH, P and Ca agreeing with previous results in ADE. ADE samples in *Balbina*, *Barro Branco* and Hatahara sites presented higher bacterial 16S rRNA gene copy number in comparison with ADJ soil samples. The results obtained with the fingerprinting techniques (Terminal Restriction Length Polymorphism, T-RFLP and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) using the bacterial and archaeal 16S rRNA genes revealed that bacterial community structure in charcoal fragments differed significantly when compared to the ADJ soils. Using the pyrosequencing technique, the phyla Proteobacteria, Actinobacteria and Crenarchaeota were predominant in charcoal fragments. It was also observed that microorganisms from charcoal fragments may be directly related to the N and C cycles. Furthermore, the presence of these microorganisms in charcoal fragments may favor the soil microbiota and, consequently, its quality. In this context, pyrogenic charcoal can serve as an element to recover degraded areas acting as soil conditioner and a promising alternative to the management of agricultural soils.

Key-words: Pyrogenic charcoal, Soils, *Bacteria*, *Archaea*, Molecular Biology, Microbial Ecology

SUMÁRIO

1 Introdução	13
1.1 Características da Terra Preta de Índio	13
1.2 Diversidade microbiana em Terra Preta de Índio	16
1.3 Carvão pirogênico em Terra Preta de Índio	20
1.4 Objetivos	24
1.4.1 Objetivo geral	24
1.4.2 Objetivos específicos	24
Referências	25
2 O carvão pirogênico favorece a diversidade de filos bacterianos em Terra Preta de Índio	31
Resumo	31
Abstract	32
2.1 Introdução	33
2.2 Desenvolvimento	34
2.2.1 Material e Métodos	34
2.2.1.1 Área de estudo	35
2.2.1.2 Amostragem dos solos.	38
2.2.1.3 Separação dos fragmentos de carvão pirogênico de Terra Preta de Índio	38
2214 Extração de DNA genômico das amostras de solos e fragmentos de carvão	
isolados de Terra Preta de Índio	39
2.2.1.5 PCR quantitativo em tempo real	39
2.2.1.6 Análise por T-RFLP do gene 16S rRNA de <i>Bacteria</i>	41
2.2.1.0 Thinkise por 1 Tri Dr do gene 105 Tri Tri de Bueleria	44
2.2.1.7 Thosequenerality and the second seco	45 1
2.2.2 Resultados e Discussão	45
2.2.2.1 Flopfiedades químicas dos solos	43 51
2.2.2.2 FCK qualitativo en tempo real para o gene 105 fKNA de <i>Bacteria</i>	51
2.2.2.3 Analise da estrutura da comunidade bacteriana por 1-RFLP	33
2.2.2.4 Composição da comunidade bacteriana.	00 71
2.2.2.5 Influencia dos atributos do solo sob a comunidade bacteriana	/1
2.3 Conclusoes	79
Referencias	80
2 Detensiel de convõe ninegênice em hecheder neves files de Auchaes	07
Posumo	07 97
Abstract	0/
AUSITACI	00
2.2 Desenvechimente	09
3.2 Desenvolvimento	91
3.2.1 Material e Metodos.	91
3.2.1.1 Areas de estudo.	91
3.2.1.2 Amostragem dos solos.	91
3.2.1.3 Extração de DNA genomico dos solos e fragmentos de carvão pirogênico	91
3.2.1.4 Analise por T-RFLP do gene 16S rRNA de <i>Archaea</i>	92
3.2.1.5 Análise por DGGE do gene 16S rRNA de <i>Archaea</i>	94
3.2.1.6 Pirosequenciamento	95
3.2.2 Resultados e Discussão	96
3.2.2.1 Propriedades químicas dos solos	96

3.2.2.2 Analise da estrutura da comunidade de <i>Archaea</i> por I-RFLP	
3.2.2.3 Análise da estrutura da comunidade de <i>Archaea</i> por DGGE	1
3.2.2.4 Composição da comunidade de <i>Archaea</i>	3
3.3 Conclusões	7
Referências	9
ANEXO 11.	5

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características da Terra Preta de Índio

A floresta Amazônica estende-se por nove países do continente Sul Americano e representa 70% das florestas tropicais do mundo. No Brasil sua extensão atinge cerca de 5,1 milhões de km² e apresenta uma grande variedade de solos que, em sua grande maioria, apresentam baixa fertilidade natural, baixa capacidade de retenção de nutrientes e elevados teores de acidez (COCHRANE; SÁNCHEZ, 1982), sendo estes fatores limitantes para a produtividade agrícola. Evidências arqueológicas na região Amazônica indicam que as atividades humanas antigas transformaram significativamente as paisagens na vizinhança dos seus assentamentos, especialmente no período pré-histórico colombiano entre 500 e 8700 anos antes do presente (KERN; COSTA, 1997). Acredita-se que sociedades indígenas formaram extensos depósitos de resíduos (e.g. origem vegetal: folhas, cascas de mandioca e sementes; origem animal: ossos, sangue e carapaças de quelônios; e resíduos de fogueiras: carvão vegetal), que alteraram as propriedades do solo (LEHMANN et al., 2003). Devido à intensa interação entre o homem pré-histórico e a paisagem amazônica, vários aspectos da Amazônia atual podem ter sido resultantes da atividade humana (NEVES et al., 2003). Evidências arqueológicas indicam que atividades humanas antigas nos habitats amazônicos transformaram significativamente as paisagens na vizinhança dos seus assentamentos, notadamente no pré-histórico tardio (KERN et al., 2009).

As Terras Pretas de Índio (TPI), também conhecida por *Amazonian Dark Earths*, apresentam horizonte A antrópico em diversas classes de solos, sendo mais comuns em Latossolos e Agrissolos (KERN et al., 2003), e normalmente se localizam em terra firme próxima aos cursos de águas claras, brancas e negras (KERN et al., 2003). Os sítios das TPIs ocupam normalmente posições em áreas mais elevadas do terreno, onde não ocorrem inundações periódicas, entre 5 a 25 m de altura em relação à água corrente mais próxima e apenas 4% ocupam áreas mais elevadas que 40 m (KERN et al., 2009). Essas áreas estão distribuídas aleatoriamente em toda a Amazônia, especialmente na parte brasileira (Figura 1.1) sendo estas também encontradas na Amazônia do Peru, Colômbia, no sul da Venezuela e nas Guianas (GLASER; BIRK, 2011). Estima-se que as TPIs

ocupem uma área equivalente de 6 a 18 mil km^2 (0,1 a 0,3%) na Bacia Amazônica (SOMBROEK et al., 2003).



Figura 1.1 – Localização de sítios arqueológicos de Terra Preta na Amazônia Central Fonte: Glaser (2007) – modificado e citado por Glaser e Birk (2011)

Contrastando aos solos da região amazônica, que apresentam baixa fertilidade e acidez elevada, as TPIs apresentam alta fertilidade e elevados valores de pH. São caracterizadas por exibirem coloração escura (Figura 1.2), normalmente contendo fragmentos de cerâmica e artefatos indígenas (LIMA et al., 2002), além da alta capacidade de retenção de nutrientes. A elevada concentração de fragmentos cerâmicos encontradas nas TPIs têm a capacidade de aumentar a retenção de água em potenciais elevados, devido aos poros existentes nas cerâmicas, que podem ser preenchidos de água na estação chuvosa.



Figura 1.2 – Perfis de sítio de Terra Preta de Índio (**a**) e solo adjacente (**b**). Fonte: Glaser et al. (2001)

Um dos aspectos mais contundentes são as manchas de solos de cor escura e com grande potencial produtivo, conhecido como Terra Preta de Índio (KAEMPF; KERN, 2005). As TPI são diferenciadas por apresentarem elevados níveis de nutrientes, principalmente Ca, Mg, P, Ca, Mn e Zn (LEHMANN et al., 2003), baixa saturação por Al e Fe (KERN; KÄMPF, 1989). A TPI apresenta elevados níveis de CTC e soma de bases (SB), abundância de carvão vegetal e intensa atividade biológica quando confrontados aos solos não antrópicos ou solos adjacentes (GLASER et al., 2001; LIMA et al., 2002). Um dos principais fatores responsáveis pelo comportamento diferenciado das TPIs, comparado aos solos adjacentes, é a maior quantidade e a diferença qualitativa da sua matéria orgânica. Os níveis de matéria orgânica, N e P encontrados em TPI chegam a ser três vezes maiores do que nos solos adjacentes (GLASER, 2007). Segundo Smith (1980), o P é considerado um dos atributos do solo mais significativos da ocupação humana atribuído às cinzas oriundas de fogueiras, ossos de animais e dejetos humanos. Quanto à espessura, as TPIs apresentam de 30 a 60 cm de profundidade, podendo eventualmente chegar a dois metros (KERN et al., 2003). Essas variações de profundidades estão diretamente relacionadas com o padrão de assentamento do homem pré-histórico, por conta 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. Devido a sua alta e duradoura fertilidade, as áreas de TPI são frequentemente procuradas pelas populações locais para cultivos de subsistência, tais como mandioca, banana, milho, mamão, entre outros (KERN et al., 2009). No entanto, as TPIs não são homogêneas quanto à fertilidade e potencial produtivo, podendo haver diferenças inclusive entre TPIs de uma mesma região e há uma grande variedade nas propriedades de fertilidade dentro de uma área (LEHMANN et al., 2003).

Durante as últimas duas décadas, houve grande avanço nas pesquisas em TPI relacionadas às suas estruturas química, física e biológica. Essas pesquisas buscam conhecimentos para o aprimoramento de técnicas de manejo sustentável na agricultura. No entanto, são poucos os trabalhos que indicam a importância das comunidades microbianas existentes em TPI e a função específica da diversidade destes solos no desenvolvimento da sua fertilidade sustentável. A presença de material orgânico estável e a grande atividade biológica indicam que a TPI pode ser um sítio de alta riqueza de espécies e diversidade microbiana, constituindo em uma fonte de germoplasma microbiano, os quais são benéficos para as plantas cultivas (LIANG et al., 2006; O'NEILL et al., 2009; GROSSMAN et al., 2010; NAVARRETE et al., 2010). Tsai et al. (2003) e Kim et al. (2007) avaliaram a diversidade bacteriana desse solo com base no sequenciamento do gene 16S rRNA e encontraram alta ocorrência de clones homólogos a bactérias não cultivadas, sendo os micro-organismos do solo fundamentais para a persistência da fertilidade do solo.

1.2 Diversidade microbiana em Terra Preta de Índio

A comunidade microbiana do solo é essencial 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, 2006). Além disso, os micro-organismos do solo podem ser importantes bioindicadores da qualidade do solo, devido ao seu dinamismo e a rápida resposta às alterações ambientais. Contudo, mudanças na estrutura das comunidades microbianas do solo podem afetar as funções realizadas por elas e, consequentemente, a sustentabilidade do ecossistema.

As atividades dos micro-organismos estão baseadas em sua notável diversidade metabólica e adaptabilidade genética (KURTBOKE; SWINGS; STORMS, 2004), que os torna uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento sustentável.

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; POLY; NAZARET, 2000). Estimativas indicam que em uma única grama de solo há aproximadamente de 2000 a 8 milhões de bactérias (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2006), sendo que apenas uma pequena fração dos micro-organismos é cultivável através do uso de técnicas microbiológicas tradicionais, deixando uma vasta porção dessa biota desconhecida e não estudada.

Para garantir a qualidade do solo é importante manter a diversidade microbiana, pois os micro-organismos desempenham funções importantes, removendo toxinas e participando no ciclo de C, N e P, dentre outros (BORNEMAN et al., 1996). No entanto, alguns estudos que acessam os micro-organismos do solo têm sido realizados em TPIs para uma melhor compreensão da interação das comunidades microbianas com sua alta fertilidade. Nos últimos anos, o interesse em estudos de taxonomia e diversidade microbiana deve-se ao desenvolvimento das técnicas moleculares, as quais aumentam a disponibilidade de métodos que permitem a identificação e classificação mais rápida e precisa dos micro-organismos ainda desconhecidos e não identificados, além de não requerer o isolamento e cultivo desses micro-organismos.

Tsai et al. (2003) avaliaram a diversidade bacteriana em TPI coletados na Amazônia Ocidental, em uma área com histórico de uso agrícola. Contudo, a área considerada no referido estudo tem sido abandonada há cerca de 20 anos, permitindo o estabelecimento de uma vegetação secundária. O trabalho mencionado utilizou técnicas moleculares com base no sequenciamento do gene 16S rRNA, e os autores encontraram além de elevada diversidade bacteriana, alta ocorrência de clones homólogos e bactérias não cultivadas. Isto demonstra a necessidade de maior intensidade de estudos nesses ambientes, que podem ser *"hot spot"* de diversidade bacteriana ainda pouco conhecida. Atualmente, há um grande interesse científico na elucidação da gênese das TPIs, principalmente pela possibilidade de replicação destas áreas.

Um dos primeiros estudos a utilizar métodos moleculares para avaliar a diversidade das comunidades bacterianas em TPI foi realizado por Kim et al. (2007). Os autores realizaram estudos de diversidade bacteriana com amostras de TPI e solos de floresta na região da Amazônia Ocidental. O referido estudo utilizou sequências do gene 16S rRNA de 1500 clones. Mostrando uma maior predominância de *Acidobacteria* em ambos os solos, porém, ambientes de TPI apresentaram maior diversidade bacteriana.

Posteriormente, Tsai et al. (2009) estudou a diversidade bacteriana em amostras de TPI coletadas na Amazônia Central e Amazônia Oriental. Neste estudo, foram utilizadas técnicas moleculares independentes de cultivo. Os resultados apresentaram predominância de micro-organismos não conhecidos representando cerca de 42% e 85% das sequências em amostras TPI em dois diferentes sítios amostrados. Em solos da Amazônia Central, *Firmicutes* foi o filo predominante em amostras de TPI, representando cerca de 37% do total de sequências analisadas. A comunidade bacteriana de TPI desta região também foi composta por *Proteobacteria* (9,6%), *Verrucomicrobia* (5,6%), *Acidobacteria* (2,5%), *Gemmatimonadetes* (2,5%), *Actinobacteria* (0,5%) e *Nitrospira* (0,5%). Em TPI da Amazônia Oriental, os filos identificados foram *Proteobacteria* (6,5%), *Acidobacteria* (4,7%), *Firmicutes* (1,4%), *Nitrospira* (1,1%), *Planctomycetes* (1,1%) e *Verrucomicrobia* (0,4%).

O'Neill e colaboradores (2009) avaliaram comunidades bacterianas em amostras de TPI por meio de técnicas moleculares e técnicas dependentes de cultivo. Neste estudo, foi verificado um maior número de bactérias cultiváveis em amostras de TPI. Além disso, observou-se maior população e diversidade bacteriana em amostras de TPI quando comparados com os solos adjacentes.

Recentemente, Grossman et al. (2010) buscaram expandir o conhecimento sobre a diversidade microbiana em TPI avaliando as comunidades dos domínios *Bacteria* e

Archaea. Para tanto, foram utilizadas técnicas independentes de cultivo, tais como Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*, DGGE) e análise do polimorfismo do fragmento de restrição terminal (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*, T-RFLP). Essas técnicas vêm sendo muito utilizadas para aprimorar os estudos da diversidade microbiana nos mais diferentes ambientes. A técnica de DGGE tem recebido especial atenção sendo utilizada em diferentes *habitats* naturais com sucesso (YANG; CROWLEY, 2000) e tem se mostrado capaz de detectar variações na comunidade microbiana que refletem tanto a população dominante cultivável como também as populações dominantes não cultiváveis presentes no ambiente. Grossman et al. (2010), indicaram maior riqueza da comunidade bacteriana em comparação com a comunidade de *Archaea*. Em TPI, os autores detectaram os filos *Verrucomicrobia, Pseudomonas, Acidobacteria* e *Flexibacter* sp. Por outro lado, em solos adjacentes, sem atividade antrópica, foi possível a identificação de *Proteobacteria* e *Cyanobacteria* sp., além de *Pseudomonas, Acidobacteria* e *Flexibacter* sp.

O primeiro estudo com amostras de TPI utilizando método de sequenciamento em larga escala (pirosequenciamento) foi desenvolvido por Navarrete et al. (2010). O estudo avaliou a estrutura bacteriana em TPI, nos seus respectivos solos adjacentes e em fragmentos de carvão isolados de Terra Preta de Índio. A estrutura da comunidade bacteriana nos referidos solos foi avaliada com base no método molecular de T-RFLP. O T-RFLP é uma técnica altamente reprodutível e robusta que produz fingerprintings de alta qualidade consistindo de fragmentos de tamanhos precisos, os quais permitem inferir afiliação filogenética (OSBORN; MOORE; TIMMIS, 2000). O método de pirosequenciamento consiste em uma nova abordagem molecular que envolve o sequenciamento de DNA e tem por finalidade estimar melhor a diversidade taxonômica de bactérias presentes no solo. Dentre suas vantagens, o pirosequenciamento isenta a necessidade de clonagem e, consequentemente, sequências que são difíceis de clonar podem ser obtidas por esse método. Os resultados encontrados por Navarrete et al. (2010) mostraram diferenças na estrutura e diversidade das comunidades bacterianas em TPI e fragmentos de carvão, apresentando alta diversidade em TPI. Os autores sugerem que a alta fertilidade da TPI está associada com a elevada diversidade bacteriana presente nestes solos.

A maioria dos estudos realizados com TPI aborda aspectos geológicos e antropológicos, sendo os aspectos biológicos ainda pouco considerados. A elaboração de uma prospecção da diversidade microbiana em TPI é de suma importância para o conhecimento da extensão da diversidade deste bioma tropical, e para a sustentabilidade da agricultura regional na Amazônia. 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 em processos biotecnológicos.

Neste sentido, esses solos têm chamado a atenção de cientistas como uma solução possível para a questão da agricultura sustentável em solos pobres e intemperizados que cobrem extensas áreas nos trópicos (MADARI; SOMBROEK; WOODS, 2004). Os estudos das TPIs podem contribuir com lições valiosas sobre o potencial de fertilidade nos trópicos gerando dados para apoiar no desenvolvimento de tecnologias sustentáveis de uso da terra, além de descobrir quais tipos de recursos e práticas de manejo de solos e recursos foram utilizados pelos grupos pré-históricos (FALCÃO; COMERFORD; LEHMANN, 2003; LEHMANN et al., 2003).

1.3 Carvão pirogênico em Terra Preta de Índio

O carvão pode ser entendido como um contínuo entre materiais orgânicos parcialmente carbonizados, tais como carvão e material grafítico e partículas de fuligens condensadas na fase gasosa (GONZÁLES-PÉREZ et al., 2004), altamente resistente à oxidação termal, química e foto-oxidação. Embora o carvão sofra alguma degradação natural nos solos e no ambiente, sua incorporação no solo é um mecanismo importante de sequestro de carbono (SCHMIDT; NOACK, 2000). Diferentes termos como sinônimos de carvão são encontrados na literatura, tais como carvão pirogênico, fuligem, carbono pirogênico, *black carbon* e *biochar*.

A presença de carvão em TPI pode chegar a ser 70 vezes maior que o teor desse material em solos adjacentes (GLASER, 2007). A presença de carvão em TPI indica que resíduos da queima de materiais orgânicos contribuem para a matéria orgânica a TPI, as quais são responsáveis pela estabilidade da matéria orgânica neste ambiente (GLASER et al., 2000). Segundo Glaser et al. (2001), a matéria orgânica em TPIs consiste de aproximadamente 35% de carvão ao longo do espesso horizonte A antrópico, podendo alcançar até 1 m de profundidade. No entanto, nos solos adjacentes, a matéria orgânica do solo ocorre somente nos primeiros centímetros do perfil constituindo cerca de 14%.

Embora o carvão seja reportado como material pouco reativo (inerte), ele estabiliza a matéria orgânica do solo (GLASER et al., 2000), aumenta os níveis de pH, favorece a atividade microbiana, ajuda a repelir insetos e reduz a lixiviação de nutrientes, mantendo a fertilidade do solo e, consequentemente, a produtividade agrícola e a sustentabilidade (STEINER et al., 2004). O carvão é resistente no ambiente por séculos, sendo o responsável pela estabilidade dos estoques de carbono nas TPI. Esse carvão, que provavelmente se originou de queimadas periódicas de lavouras e restos de atividade diária carbonizados, foi incorporado ao solo pelo homem e pela atividade biológica no solo durante centenas de anos (MADARI et al., 2006).

A TPI, com índices elevados de biomassa derivada de carvão, possui uma maior capacidade de troca catiônica (CTC) por unidade de carbono orgânico em relação aos solos adjacentes de florestas com mineralogia similar e com baixo índice de carvão (LIANG et al., 2006). Acredita-se que o enriquecimento do solo com carvão possa ser o principal responsável pela elevada CTC em antrossolos, que mantém a disponibilidade de cátions elevada (LIMA et al., 2002). Contudo esse mecanismo não é ainda totalmente conhecido (GLASER et al., 2001).

Glaser et al. (2003) sugeriram que a oxidação do carbono aromático e a formação de grupos carboxil possa ser a razão principal para a elevada CTC observada. Tal formação de grupos carboxil ou outros grupos funcionais com carga líquida negativa na escala de pH dos solos, pode ser principalmente o resultado de dois processos diferentes: a oxidação de partículas de superfície do carvão; ou adsorção de grande quantidade de matéria orgânica oxidada na superfície do carvão (LEHMANN et al., 2005).

Vários estudos propõem a aplicação do carvão no solo como uma maneira inovadora para estabelecer a qualidade do solo, o aumento da produtividade agrícola, além de estabelecer o sequestro de carbono em ecossistemas terrestres (LEHMANN; GAUNT; RONDON, 2006; MARRIS, 2006). A aplicação de carvão no solo pode também reduzir a emissão

de gases do efeito estufa, promover o aumento do sequestro de carbono no solo (LEHMANN; GAUNT; RONDON, 2006) e reduzir a emissão de oxido nitroso (N₂O) . O N₂O possui um potencial de emissão de gás do efeito estufa 300 vezes maior que o dióxido de carbono CO_2 (FORSTER et al., 2007).

O carvão apresenta uma estrutura porosa, uma vez que a água e os compostos voláteis foram eliminados, deixando espaços vazios sendo que cerca de 70 a 80% do volume do carvão é formado por poros. Devido a sua porosidade, e consequentemente a sua grande superfície específica, a presença de fragmentos de carvão pode aumentar significativamente a capacidade de retenção de água, especialmente em solos de textura arenosa. A Figura 1.3 mostra a presença de porosidade existente em fragmentos de carvão de Terra Preta de Índio coletados na Floresta Nacional de Caxiuanã, estado do Pará.



Figura 1.3 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de fragmento de carvão separado de TPI (Cortesia de Mateus de S. Terceti)

Estudos realizados por Liang et al. (2006), utilizando análise de espectroscopia de absorção de raio X de estruturas finas (NEXAFS), mostraram que partículas de carvão são altamente oxidadas perto da superfície, indicando a presença de material orgânico adsorvido, possivelmente de origem microbiana ou vegetal. Estes mesmos autores, através de microscopia de fluorescência confocal, demonstraram a presença de micro-organismos vivos na superfície do carvão, indicando que os fragmentos de carvão podem servir como um habitat para micro-organismos, apesar de sua recalcitrância química.

A interação dos micro-organismos com o carvão não é ainda bem compreendida, e os organismos envolvidos na degradação do carvão são desconhecidos até o presente

momento, sendo que as taxas de decomposição microbiana têm ainda de ser quantificadas. Uma experiência realizada por Baldock e Smernik (2002) expôs o carvão de lenha, produzido em uma escala de temperaturas até 350°C, a um inóculo microbiano, e demonstrou perdas muito pequenas de carvão após 120 dias, confirmando a refractividade do material e sugerindo que é possível certo nível de degradação microbiana. Comunidades microbianas do solo respondem de forma complexa ao fogo e à presença do carvão de lenha, e existe uma literatura ecológica significativa sobre este tópico (PIETIKAINEN; FRITZE, 1995; PIETIKAINEN; KIIKKILA; FRITZE, 2000). A Figura 1.4 apresenta microscopia de fluorescência de fragmentos de carvão previamente separado da TPI. Tal comprovação da elevada atividade biológica indica que o carvão pode ser utilizado pelas comunidades microbianas do solo diretamente como plataforma de troca de nutrientes para os micro-organismos (GROSSMAN et al., 2006). Navarrete et al. (2010) reportaram a diversidade bacteriana em fragmentos de carvão provenientes de TPI e observou-se a predominância dos filos Acidobacteria, Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia e Firmicutes, dentre outros. Nesse mesmo estudo, identificou-se a elevada abundância do filo Actinobacteria em fragmentos de carvão em contraste às TPI. Nesse sentido, vale destacar que Khodadad et al. (2011) apontaram um aumento dos filos Actinobacteria e Gemmatimonadetes em solos de floresta tratados com biochar, indicando os possíveis impactos das comunidades microbianas.



Figura 1.4 – Imagens por microscopia Fluorescente (a) e Confocal (b) demonstram presença de micro-organismos vivos em superfícies de carvão. (Fonte: Grossman et al., 2006)

Assim, embora o carvão seja um material relativamente inerte no solo e de alta estabilidade, dependendo das condições da sua formação e das transformações que sofre no solo, possui a capacidade de contribuir para a melhoria das propriedades físicas, químicas e, consequentemente, das características biológicas do solo (STEINBEISS; GLEIXNER; ANTONIETTI, 2009).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo geral

Avaliar a estrutura e a diversidade das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* por meio de técnicas moleculares em fragmentos de carvão (*Biochar*) presentes em TPI, em Terra Preta de Índio (TPI) e solos adjacentes à TPI em quatro diferentes áreas localizadas na Amazônia Central. O trabalho também teve como objetivo identificar quais fatores ambientais explicam a variação na estrutura e diversidade das comunidades microbianas nos diferentes ambientes.

1.4.2 Objetivos específicos

Capítulo 2

- Determinar a estrutura das comunidades de *Bacteria* predominantes em fragmentos de carvão, TPI e solos ADJ, utilizando a técnica de T-RFLP;
- Avaliar a diversidade a partir de resultados de sequenciamento em larga escala (pirosequenciamento) do gene 16S rRNA bacteriano amplificado a partir de amostras de TPI, em fragmentos de carvão separados de TPI e solos adjacentes.

Capítulo 3

- Determinar as estruturas das comunidades de *Archaea* predominantes em fragmentos de carvão, TPI e solos ADJ, utilizando as técnicas moleculares de T-RFLP e DGGE;
- Avaliar a diversidade a partir de sequências de pirosequenciamento das comunidades de *Archaea* em TPI, em fragmentos de carvão separados de TPI e solos adjacentes.

Referências

BALDOCK, J.A.; SMERNIK, R.J. Chemical composition and bioavailability of thermally altered Pinus resinosa (Red pine) wood. **Organic Geochemistry**, Amsterdam, v. 33, p. 1093-1109, 2002.

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.

COCHRANE, T.T.; SÁNCHEZ, P.A. Land resources, soils and their management in the Amazon region: a state of knowledge report. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON AMAZONIAN AGRICULTURE AND LAND USE RESEARCH, 1982, Cali, Colombia. **Proceedings...** Cali: CIAT, 1982. p. 137-209. (CIAT Series 03E-3-82).

FALCÃO, N.P.S.; COMERFORD, N.; LEHMANN, J. Determining nutrient bioavailability of Amazonian Dark Earth soils - methodological challenges. In: LEHMANN, J.; KEM, D.C.; GLASEER, B.; WOODS, W.I. (Ed.). Amazonian Dark Earths: Origins, properties, management. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 255-270.

FORSTER, P.V.; RAMASWAMY, P.; ARTAXO, T.; BERNTSEN, R.; BETTS, D.W.; FAHEY, J.; HAYWOOD, J.; LEAN, D.C.; LOWE, G.; MYHRE, J.; NGANGA, R.G.; PRINN, G.; RAGA, M.; SCHULZ, R. VAN D. 2007. Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing. In: SOLOMON, S.; QIN, D.; MANNING, M.; CHEN, Z.; MARQUIS, M.; AVERYT, K.B.; TIGNOR, M.; MILLER, H.L. (Ed.). **Climate change 2007**: h e physical basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. P. 129-234.

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

GLASER, B.; BIRK, J. State of the scientific knowledge on properties and genesis of Anthropogenic Dark Earths in Central Amazonia (terra preta de Índio). **Geochimica et Cosmochimica Acta**, New York, 2011. Disponível em: http://wendepunktzukunft.org/wp-content/uploads/2011/09/101121-Terra-Preta-Science-Direct-Glaser-und-Birk.pdf.

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.

GONZÁLEZ-PÉREZ, J.A.; GONZÁLEZ-VILA, F.J.; ALMENDROS, G.; KNICKER, H. The effect of fire on soil organic matter – a review. **Environmental International**, Amsterdam, v. 30, p. 855-870, 2004.

GROSSMAN, J.M.; SHEAFFER, C.; WYSE, D.; BUCCIARELLI, B.; VANCE, C.; GRAHAM, P.H. An assessment of nodulation and nitrogen fixation in inoculated Inga oerstediana, a nitrogen-fixing tree shading organic coffee in Chiapas, Mexico. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v. 38, n. 4, p. 769-784, 2006.

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

KÄMPF, N.; KERN, D.C. O solo como registro da ocupação humana pré-histórica na Amazônia. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M.; SILVA, A.P. DA; CARDOSO, E.J. (Org.). **Tópicos em ciência do solo**. 1. ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. v. 6, p. 277-320.

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**, Viçosa, 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'AQUINTO, G.D.; RODRIGUES, T.E.; FRAZAO, F.; SOMBROEK, W.; MEYERS, T.M.; NEVES, E. G. Distribution of Amazonian Dark Earth in the Brazilian Amazon. In: LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GLASSER, B.; WOODS, W.I. Amazonian Dark Earths: Origin, properties and management. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 51-77.

KERN, D.C.; KAMPF, N.; WOODS, W.I.; DENEVAN, W.M.; COSTA, M.L.; FRAZAO, F.J.L. Evolução do conhecimento em 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. p. 285-296.

KHODADAD, C.L.M.; ZIMMERMAN, A.R.; GREEN, S.J.; UTHANDI, S.; FOSTER, J. S. Taxa-specific changes in soil microbial community composition induced by pyrogenic carbon amendments. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 43, p. 385-392, 2011.

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

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

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.

LEHMANN, J.; LIANG, B.Q.; SOLOMON, D.; LEROTIC, M.; LUIZAO, F.; KINYANGI, J.; SCHAFER, T.; WIRICK, S.; JACOBSEN, C. Near-edge xray absorption fine structure (NEXAFS) spectroscopy for mapping nano-scale distribution of organic carbon forms in soil: Application to black carbon particles. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, DC, v. 19, 12 p., 2005. doi:10.1029/2004GB002435.

LEHMANN, J.; GAUNT, J.; RONDON, M. Bio-char Bio-char sequestration in terrestrial ecosystems - a review. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, Heidelberg, v. 11, p. 403-427, 2006.

LIANG, B.; LEHMANN, J.; SOLOMON D.; KINYANGI, J.; GROSSMAN, J.; O'NEILL, B.; SKEJMSTAD, J.O.; THIES, J.; LUIZAO, 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.

LIMA, H.N.; SCHAEFER, C.E.R.; MELLO, J.W.V.; GILKES, R.J.; KER, J.C. Pedogenesis and pre-colombian land use of "Terra Preta Anthrosols" ("Indian black earth") of Western Amazonia. **Geoderma**, Amsterdam, v. 110, p. 1–17, 2002.

MADARI, B.; SOMBROEK, W.G.; WOODS, W.I. Research on anthropogenic Dark Earth Soils. Could it be a solution for sustainable agricultural development in the Amazon? In: GLASER, B.; WOODS, W.I. (Ed.). Amazonian Dark Earths: Explorations in space and time. Berlim: Springer, 2004. cap. 181, p. 169.

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, GO: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. 6 p. (Comunicado Técnico, 125).

MARRIS, E. Putting the carbon back: black is the new green. **Nature**, London, v. 442, p. 624–626, 2006.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia do solo. 2. ed. Lavras: Editora da UFLA, 2006. 729 p.

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.

NEVES, E.G.; PETERSON, J.B.; BARTONE, R.N.; Da SILVA, C.A. Historical and socio-cultural origins of Amazonian dark earths. In: LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GLASSER, B.; WOODS, W.I. Amazonian Dark Earths: Origin, properties and management. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 29-50.

O'NEILL, B.; GROSSMAN, J.M.; TSAI, M.T.; GOMES, J.E.; LEHMANN, J.; PETERSON, J.; NEVES, E.; THIES, J.E. Bacterial community composition in Brazilian anthrosols and adjacent soils characterized using culturing and molecular identification. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, p. 23–35, 2009.

OSBORN, A.M.; MOORE, E.R.B.; TIMMIS, K.N. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 39-50, 2000.

PIETIKAINEN, J.; FRITZE, H. Clear-cutting and prescribed burning in coniferous forest: comparison of effects on soil fungal and total microbial biomass, respiration activity and nitrification. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 101–109, 1995.

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 Microbiology**, Amsterdam, v. 151, p. 167-177, 2000.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Towards a census of bacteria in soil. **PLoS Computional Biology**, San Francisco, v. 2, n. 7, p. 92, 2006.

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

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

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

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

STEINBEISS, S.; GLEIXNER, G.; ANTONIETTI, M. Effect of biochar amendment on soil carbon balance and soil microbial activity. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 1301–1310, 2009.

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, SP. **Resumos...** Ribeirão Preto: SBCS, 2003. 1 CD-ROM.

TSAI, S.M.; O'NEILL, B.; CANNAVAN, F.S.; SAITO, D.; FALCÃO, N.P.S.; KERN, D.; GROSSMAN, J.; THIES, J. The microbial world of Terra Preta. In: WOODS, W.I.; TEIXEIRA, W.G.; LEHMANN, J.; STEINER, C.; WINKLERPRINS, A.; REBELLATO, L.S. Amazonian Dark Earth: Wim Sombroek's Vision. Berlin: Springer, 2009. p. 299-308.

YANG, C.H.; CROWLEY, D.E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 345-351, 2000.

2 O CARVÃO PIROGÊNICO FAVORECE A DIVERSIDADE DE FILOS BACTERIANOS EM TERRA PRETA DE ÍNDIO

RESUMO

Os solos com horizonte A antrópico (Terra Preta de Índio - TPI) apresentam aproximadamente três vezes mais matéria orgânica, N e P, e 70 vezes mais fragmentos de carvão pirogênico quando comparados aos solos adjacentes (ADJ). A aplicação de carvão em solos agrícolas vem sendo promovida como um potencial condicionador do solo beneficiando a manutenção da fertilidade nesses solos, e possivelmente servir como abrigo para os micro-organismos do solo. Portanto, este estudo teve como objetivo acessar as estruturas das comunidades de Bacteria em fragmentos de carvão pirogênico (provenientes de TPI), TPI e solo ADJ utilizando as técnicas moleculares de PCR quantitativo (qPCR) para estimar a abundância de Bacteria, T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) para avaliar o perfil da estrutura das comunidades bacterianas e pirosequenciamento visando estimar a abundância e acessar a composição das comunidades bacterianas. Os solos foram coletados em quatro sítios arqueológicos (Balbina, Barro Branco, Costa do Acutuba e Hatahara), localizados na Amazônia Central. Em geral, as TPIs apresentaram elevados valores de pH, P e Ca corroborando com resultados anteriores em TPIs. As amostras de TPI dos sítios Balbina, Barro Branco e Hatahara apresentaram maior número de cópias do gene 16S rRNA de Bacteria quando comparadas com as amostras de solo ADJ. Os resultados obtidos pela técnica de T-RFLP utilizando o gene 16S rRNA de Bacteria revelaram que as estruturas das comunidades bacterianas em fragmentos de carvão pirogênico apresentaram diferenças significativas quando comparado com os solos adjacentes. Para explorar as diferenças observadas na análise de T-RFLP, o pirosequenciamento foi essencial para acessar a predominância de algumas bactérias nos fragmentos de carvão pirogênico, como por exemplo, bactérias pertencentes aos filos Proteobacteria e Actinobacteria. Observouse também que os fragmentos de carvão apresentaram bactérias que podem estar diretamente relacionadas com os ciclos do N e C. Além disso, a presença desses microorganismos nos fragmentos de carvão pode favorecer a microbiota do solo e, consequentemente, sua qualidade. Neste sentido, o carvão pode servir como elemento de recuperação em ambientes degradados, agindo como condicionador do solo sendo esta uma alternativa promissora no manejo de solos agrícolas.

Palavras-chave: Carvão pirogênico, Terra Preta de Índio, *Bacteria*, qPCR, T-RFLP, Pirosequenciamento

2 PYROGENIC CHARCOAL FAVOR THE DIVERSITY OF BACTERIAL PHYLA IN AMAZONIAN DARK EARTH

ABSTRACT

Soils with anthropic A horizon (Amazonian Dark Earth - ADE) present three times higher organic matter, N and P, and 70 times more biochar when compared to its adjacent soils (ADJ). The application of pyrogenic charcoal in agricultural soils is being promoted as a potential soil conditioner to maintain soil fertility, and is possibly a suitable habitat for soil microorganisms. Therefore, the objective of this study was to assess the bacterial community structure of pyrogenic charcoal (from ADE), ADE and ADJ soils using molecular techniques such as Quantitative PCR (qPCR) to estimate the abundance of Bacteria, T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) to evaluate the bacterial community structure, and pyrosequencing to estimate the abundance and assess the composition of bacterial communities. The soils were collected in four archaeological sites (Balbina, Barro Branco, Costa do Acutuba and Hatahara) in the Central Amazon. In general, ADE presented high values of pH, P and Ca agreeing with previous findings in ADE. ADE samples from the Balbina, Barro Branco and Hatahara sites presented high gene copy number in comparison to the ADJ soil samples. The T-RFLP results based on bacterial 16S rRNA gene indicated that bacterial community structure in pyrogenic charcoal differed significantly from those of the ADJ soils. To further explore the differences observed in the T-RFLP analysis, the pyrosequencing assay was essential to assess the majority of some bacteria in pyrogenic charcoal, as for example, bacteria from the phylum Proteobacteria and Actinobacteria. It was also observed that pyrogenic charcoal presented bacteria which may be directly related to the N and C cycles. In addition, the presence of microorganisms in pyrogenic charcoal may favor soil microbiota and, consequently, its quality. In this context, pyrogenic charcoal can serve as an element to recover degraded areas acting as soil conditioner and appear to be a promising alternative to the management of agricultural soils.

Key-words: Pyrogenic charcoal, Amazonian Dark Earth, Bacteria, qPCR, T-RFLP, Pyrosequencing

2.1 INTRODUÇÃO

Um registro marcante proporcionado pelo homem pré-histórico na paisagem da região amazônica são as manchas de solos de cor escura, ricos em matéria orgânica, com muitos fragmentos de artefatos cerâmicos e altos teores de Ca, Mg, Zn, Mn, P e C (LEHMANN et al., 2003). Em função da coloração escura da camada superficial, esses solos são conhecidos como Terra Preta de Índio (TPI). As cores escuras neste ambiente ocorrem em razão à elevada concentração de C total e elevada concentração de C de origem pirogênica (GLASER, 2007). Os carvões apresentam atividades no sentido de absorver compostos orgânicos solúveis, estabilizam a matéria orgânica do solo (GLASER et al., 2000), aumentam os níveis de pH do solo, reduzem a lixiviação de nutrientes, mantendo a fertilidade do solo e, consequentemente, a produtividade agrícola e a sustentabilidade (STEINER et al., 2004), além de servirem como abrigo para alguns micro-organismos do solo (PIETIKAINEN; KIIKKILA; FRITZE, 2000).

Os micro-organismos presentes no solo, e por instância nos fragmentos de carvão, têm presumível importância para a sustentabilidade desse ambiente, visto que são responsáveis por numerosos processos biológicos, tais como a ciclagem de nutrientes, nutrição de plantas, purificação de água e manutenção da estrutura do solo (FILIP, 2002). A alta riqueza de espécies e diversidade microbiana em TPI indicam que esse solo constitui uma fonte de germoplasma microbiano benéfico para as plantas cultivadas (LIANG et al., 2006; O'NEILL et al., 2009; GROSSMAN et al., 2010; NAVARRETE et al., 2010).

O primeiro levantamento bacteriano para avaliar a diversidade de TPI foi conduzido por Kim et al. (2007), onde o número máximo de sequências do gene 16S rRNA *Bacteria* foi baseado em 1500 clones usando a técnica de sequenciamento tradicional. Posteriormente, um estudo mais refinado em ambientes de TPI foi desenvolvido por Navarrete et al. (2010), que apresentou a diversidade da comunidade bacteriana a partir de 10.857 sequência do gene 16S rRNA utilizando método de sequenciamento em larga escala (pirosequenciamento). Ambos os trabalhos apresentaram resultados da comunidade bacteriana em TPI a partir de amostras compostas de solo. Até o momento, ainda não foram sistematicamente descritas as possíveis conexões entre as

propriedades químicas de TPI e as comunidades bacterianas, além de falta de conhecimento a respeito dos micro-organismos presentes em fragmentos de carvão presentes em TPI.

Os estudos anteriormente realizados têm se demonstrado insuficientes para acessar a elevada diversidade de micro-organismos presentes em TPI. No entanto, pouco ou nada se conhece sobre a diversidade bacteriana presente em fragmentos de carvão da Amazônia.

Dessa forma, avaliar o impacto antrópico no ambiente do solo sobre as comunidades microbianas torna-se importante não somente para o manejo do solo, como também para o delineamento de práticas que favoreçam a funcionalidade dos agroecossistemas e a produtividade agrícola sustentável. Neste contexto, várias abordagens são empregadas, dentre elas aquela independente de cultivo via métodos advindos da biologia molecular. Neste estudo, foram avaliadas comunidades bacterianas presentes em fragmentos de carvão segregados de TPI, além de amostras de TPI de quatro diferentes sítios arqueológicos localizados na Amazônia brasileira, e em solo adjacente a esses diferentes sítios de origem antrópica. O presente estudo empregou três diferentes metodologias que avaliam o gene 16S rRNA bacteriano: PCR quantitativo em tempo real, para estimar a abundância do gene 16S rRNA *Bacteria*; *fingerprinting* baseado na análise de T-RFLP, com o propósito de avaliar o perfil da estrutura das comunidades bacterianas; e sequenciamento em larga escala (pirosequenciamento) visando estimar a abundância e acessar a composição da comunidade bacteriana.

2.2 Desenvolvimento

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. As reações de amplificações para o pirosequenciamento foram realizadas no *Netherlands Institute of Ecology* (NIOO-KNAW), Wageningen/Holanda.
2.2.1.1 Área de estudo

Para a realização do estudo, foram escolhidos quatro sítios arqueológicos localizados na Amazônia Central: Balbina (BA), Barro Branco (BB), Costa do Açutuba (CA) e Hatahara (HA). Em cada sítio foi amostrado solos de origem antropogênica, conhecido como Terra Preta de Índio (TPI), e adjacente ao sítio arqueológico (solo de origem não-antropogênica) designado como solo adjacente. As Terras Pretas de Índios constituem áreas que apresentam horizonte A antrópico em diversas classes de solos. Essa classificação foi determinada pela grande quantidade de artefatos cerâmicos arqueológicos, indicativo de assentamentos humanos. Os solos adjacentes, sem a presença do horizonte A antrópico, são pobres em nutrientes e derivados a partir de sedimentos terciários, principalmente laterita. A localização das áreas onde foram realizadas as coletas de solo é exibida na Figura 2.1.



Figura 2.1 – Localização dos quatro sítios arqueológicos estudados no presente trabalho. Fonte: GPS Trackmaker (http://www.gpstm.com/)

O sítio Balbina está localizado próximo à comunidade Rumo Certo no município de Presidente Figueiredo (AM), a aproximadamente 180 km de Manaus. Este sítio encontra-se às margens do lago da Hidroelétrica Balbina, no Rio Uatumã, um dos

afluentes do Rio Amazonas. As coordenadas geográficas das áreas de TPIs do sítio Balbina e das áreas de solos adjacentes são 01° 30' 26,4"S - 60° 05' 34"W e 01° 30' 27"S - 60° 05' 33"W, respectivamente. Nessa área, a vegetação é secundária e em estágio inicial de sucessão, com indivíduos arbóreos de no máximo 4 m de altura. Os solos da área apresentam características arenosas nas áreas mais altas e argilosas nas áreas mais baixas. O horizonte antrópico típico das TPIs não tem sido cultivado ou perturbado por mais de 20 anos. Na Figura 2.2 pode-se observar a diferença entre a coloração escura do horizonte A antrópico com coloração marrom do solo adjacente, além da presença de fragmentos de carvão e cerâmica encontradas nas áreas TPIs.



Sítio Balbina Área Terra Preta de Índio

Figura 2.2 – Sítio de TPI Balbina



Sítio Balbina Área adjacente a Terra Preta de Índio

Descoberto em 1997, o sítio Hatahara está localizado no município de Iranduba – AM, aproximadamente a 30 km de Manaus, situado na margem esquerda do Rio Solimões sobre um terraço elevado. A estimativa de idade deste sítio é de aproximadamente 600 – 1000 anos. O local foi impactado por ocupações coloniais e recentes (áreas de pasto, cultivo e construções), entretanto seu grau de integridade mantém-se elevado. O horizonte antrópico típico da TPI no sítio Hatahara (coordenadas geográficas: 03° 16' 28.45"S - 60° 12' 17.14"W) está sob cultivo de banana e o solo adjacente a este sítio (coordenada geográfica: 03° 16' 24.43"S - 60° 11' 58.74"W) sob gramíneas (Figura 2.3). Esta região compreende um dos sítios arqueológicos mais explorados por arqueólogos e geólogos para estudo de caracterização das TPIs. A área amostrada não tem sido perturbada por mais de 10 anos.



Sítio Hatahara Área Terra Preta de Índio sob o cultivo de banana Figura 2.3 – Sítio de TPI Hatahara (Iranduba, AM)

Localizado próximo ao município de Iranduba as margens do Rio Solimões, o sítio Barro Branco apresenta áreas de TPI (coordenadas geográficas: 03° 18' 24.76"S - 60° 32' 05.10"W) sob o cultivo de citrus e o solo adjacente (coordenadas geográficas: 03° 18' 05.01"S - 60° 32' 07.38"W) sob o cultivo de mandioca.

O sítio Costa do Açutuba, por sua vez, encontra-se situado às margens do baixo Rio Negro, no município de Iranduba – AM a aproximadamente 50 km de Manaus. Dentre os cultivos intensivos em TPI neste sítio destacam-se: feijão de corda, berinjela, maxixe, abobrinha, couve, maracujá, jerimum e mamão (FALCÃO; BORGES, 2006). Durante o período de coleta o horizonte antrópico típico das TPIs (coordenadas geográficas: 03° 05' 53.92"S - 60° 21' 19.90"W) encontrava-se sob cultivo de beringela e o solo adjacente (coordenadas geográficas: 03° 05' 59.12"S - 60° 21' 20.77"W) sob gramíneas (Figura 2.4). Neste sítio, a TPI é cultivada por pequenos agricultores, na forma de agricultura de subsistência, no sistema de agricultura itinerante de corte e queima, deixando as glebas em pousio após um ano de cultivo intensivo.



Sítio Costa do Açutuba Área Terra Preta de Índio sob o cultivo deberinjela Área adjacente a Terra Preta de Índio sob capim

Figura 2.4 – Sítio de TPI Costa do Açutuba (Iranduba, AM)

2.2.1.2 Amostragem dos solos

Amostras de solos foram coletadas em pontos demarcados nos quatro sítios arqueológicos, em campanhas de campo realizadas durante os anos de 2008 e 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 do ponto central (norte, sul, leste e oeste), com distância de 1,5 metros entre cada ponto. Em seguida, foram coletadas 5 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 Separação dos fragmentos de carvão pirogênico de Terra Preta de Índio

Fragmentos de carvão foram segregados sob lupa a partir de amostras de TPI com o auxílio de pinça de ponta fina esterilizada (Figura 2.5). A segregação do carvão foi feita em triplicata para cada sítio utilizando o aparelho *Biochiller* para manutenção dos fragmentos de carvão selecionados e mantidos sob baixa temperatura. Após a obtenção de 0,25 g de carvão para cada amostra o carvão foi macerado em cadinho de porcelana com auxílio de pistilo, previamente esterilizados. O material macerado foi utilizado para a extração do DNA genômico.



Figura 2.5 – Separação dos fragmentos de carvão presentes em Terra Preta de Índio, com o auxílio de lupa e pinça, e o aparelho *Biochiller* usado no resfriamento das amostras

2.2.1.4 Extração de DNA genômico das amostras de solos e fragmentos de carvão isolados de Terra Preta de Índio

O DNA genômico dos solos amostrados e dos fragmentos de carvão foi extraído em triplicata utilizando-se o *Kit Power Soil DNA Extraction*TM (MoBio, Carlsbad, CA). Em microtubo contendo micro esferas de vidro foram adicionados 0,25 g de amostras de solo e agitados gentilmente para homogeneizar. Após a lise celular, o DNA total do solo foi extraído de acordo com as instruções do fabricante. A verificação da qualidade do DNA extraído foi feita em gel de agarose 1%. A quantificação foi feita 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; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

2.2.1.5 PCR quantitativo em tempo real

As análises de PCR em tempo real (qPCR) foram realizadas para quantificação do número de cópias do gene 16S rRNA de *Bacteria* em amostras de TPI, fragmentos de carvão e solos adjacentes para os quatro sítios analisados neste estudo. Como padrão para comparações, foi utilizado o gene ribossomal 16S rRNA. As reações foram realizadas no equipamento StepOnePlus® (Applied Biosytems), utilizando o sistema SYBR Green.

• Amplificação do gene 16S rRNA de Bacteria

A reação de amplificação para o gene 16S rRNA foi realizada com os *primers* universais para o domínio *Bacteria* U968F e R1387 (Tabela 2.1), que amplificam um fragmento de aproximadamente 400 pb. Os valores de Ct (*cycle threshold*) foram

utilizados como normalizadores para determinar a quantidade de DNA passível de amplificação em cada uma das amostras. Tais valores refletem o número de ciclos que a fluorescência gerou dentro do limite de uma curva padrão. O valor atribuído a um Ct mostra o ponto no qual um número suficiente de amplicons foi acumulado significativamente acima da linha de base durante a reação.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em volume de 10 μ L contendo 5 μ L do *Kit Sybr Green Rox qPCR* (Fermentas, Brasil), 2,5 μ M de cada primer e 10 ng 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 s, 56°C por 1 min e a temperatura foi elevada até 95°C por 15 s, 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 da 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 103 até 107 genes μ -1.

Tabela 2.1 - Primers da região 16S rRNA utilizados nas reações para Pirosequenciamento

Primers	Sequências (5' - 3')	Fragmento (pb)	Referência	
U968F	AACGCGAAGAACCTTAC	. 400		
R1387	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	~ 400	HEUER et al., 1997	

Para a comparação dos resultados obtidos entre as amostras de Terra Preta, carvão e solo adjacente de cada sítio foi utilizado o programa Statistica v10 (StatSoft – Tulsa, EUA). Foi realizada a análise ANOVA, utilizando o programa Statistica v10 (StatSoft – Tulsa, EUA), com nível de significância de 5% (p<0,05) para verificar diferenças do gene 16S rRNA de *Bacteria* entre as amostras de Terra Preta, Carvão e solo adjacente de cada sítio.

2.2.1.6 Análise por T-RFLP do gene 16S rRNA de Bacteria

• Amplificação do gene 16S rRNA de Bacteria

A reação de amplificação do gene 16S rRNA de Bacteria foi feita utilizando o seguinte conjunto de primers: 27F e 1492R (Tabela 2.2). Para posterior detecção dos amplicons utilizando a técnica de T-RFLP em seguenciador automático o primer 27F foi marcado com 6-carboxyfluorescein (6-FAM) na extremidade 5'. A amplificação foi feita em triplicata em solução contendo: 5-10 ng de DNA genômico, 1 x tampão de PCR, 200 µM dNTPs, 2,0 mM de uma solução de 25 mM MgCl₂, 400 µg/ml BSA (Bovine Serum Albumin), 1,25 U de Tag polimerase, 100 ng de cada primer e água ultrapura (Milli-O) esterilizada para um volume final de 25 µL. A reação foi feita em termociclador (GeneAMP PCR System 9700 - Applied Biosystems) nas seguintes condições: 3 min a 94°C para desnaturação inicial, seguida por 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento dos primers a 59°C por 45 s, extensão a 72°C por 1 min e extensão final por 15 min a 72°C. Em todas as reações de amplificações foram utilizados como controle positivo o DNA de E. coli (ATCC 25922), cepa cedida pelo Laboratório de Materiais de Referência da FIOCRUZ (INCQS). Foi também utilizado como controle negativo, o DNA de clone de biblioteca de Archaea (PAZINATO, 2007) e controle negativo sem DNA. O produto amplificado foi verificado em gel de agarose 1%, utilizando como padrão de tamanho de DNA o marcador molecular 1 kb Plus DNA LadderTM (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil). O gel foi documentado usando o programa Kodak digital science 1D (Scientific Imaging Systems).

Primers	Sequências (5' - 3')	Fragmento (pb)	Referência
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG		EDWARDS et al., 1989
1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	~1500	WOESE et al., 1990

Tabela 2.2 - Primers da região 16S rRNA de Bacteria utilizados nas reações de PCR/T-RFLP

• Purificação das amostras amplificadas

Após a obtenção do produto da PCR, foi feita a purificação dos fragmentos amplificados utilizando *Kit QIAquick PCR Purification* (Qiagen), e seguiu-se o protocolo de acordo com as instruções do fabricante. Uma alíquota do material purificado foi quantificado em gel de agarose 1%. O produto purificado foi armazenado a -20°C até posterior utilização.

Digestão com enzimas de restrição

Os produtos de PCR purificados foram digeridos com a enzima de restrição *Msp*I. A mistura para digestão foi preparada para um volume final de 15 μ L contendo 40-60 ng do produto da PCR, 1X do tampão de reação da enzima *(Buffer* B (Promega), 5 U da enzima de restrição, e 0,01 μ g/ μ l de BSA (Bovine Serum Albumine). A digestão foi feita em termociclador (GeneAMP PCR System 9700 – Applied Biosystems) nas seguintes condições: 37°C por 3 horas e a 65°C por 10 min para inativação da enzima.

Precipitação do produto digerido

O produto de PCR digerido foi precipitado em acetato de sódio/EDTA e etanol. Adicionou-se 2 μ L de solução acetato de sódio/EDTA e 60 μ L de etanol absoluto. O material foi agitado em vortex e centrifugado a 14.000 rpm, por 25 mimutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 150 μ L de etanol 70%. O material foi centrifugado a 14.000 rpm, por 5 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 150 μ L de etanol 70%. O material foi centrifugado a 14.000 rpm, por 5 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e as amostras foram secas no termociclador a 40°C, por 10 min.

Determinação dos fragmentos terminais de restrição

A determinação do comprimento dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFs) foi realizada no sequenciador capilar automático modelo ABI PRISM 3100 *Genetic Analyzer – Applied Biosystems/HITACHI*. Para a análise de fragmentos no sequenciador, o produto de digestão precipitado foi ressuspendido em Formamida Hi-Di e padrão de comprimento GeneScan 500 ROXTM (Applied Biosystems). As amostras ressuspendidas foram desnaturadas a 94°C por 5 min e imediatamente incubadas no gelo por 3 min.

• Análise dos dados de T-RFLP

Os arquivos gerados pelo programa Data Collection software do sequenciador, foram analisados no programa Peak Scanner 1.0 (Applied Biosystems) para determinação do comprimento dos fragmentos terminais de restrição através de comparação com os fragmentos do padrão de comprimento (TROTHA et al., 2002). Após a verificação da qualidade da corrida e dos comprimentos dos T-RFs, os dados foram então exportados para o software T-REX (*T-RFLP analysis Expedited*) (CULMAN et al., 2009) para o processamento das análises. Os valores de T-RFs foram arredondados para o T-RF mais próximo, com o objetivo de corrigir diferenças na quantidade de DNA entre as amostras (CULMAN et al., 2009). Para as amostras de *Bacteria*, T-RFs menores que 50 pares de base (pb) e maiores que 800 pb foram eliminados de todos os dados. Além disso, os pseudos-T-RFs (falsos T-RFs) foram excluidos das análises (EGERT; FRIEDRICH, 2003).

Os picos normalizados no programa T-REX foram utilizados para calcular a abundância relativa dos T-RFs. A avaliação dos T-RFs de *Bacteria* obtidos pelo T-RFLP foi realizada pela análise em escala multidimensional (*multidimensional scaling*, MDS), utilizando o coeficiente de similaridade de Bray-Curtis. Posteriormente, uma análise de similaridade (ANOSIM) foi realizada para determinar diferenças estatísticas entre as amostras estudadas (CLARKE, 1993). A análise SIMPER (CLARKE; WARWICK, 2001) foi utilizada para identificar a porcentagem de dissimilaridade entre ADJ *vs.* carvão e TPI *vs.* ADJ.

Para avaliar quais variáveis ambientais melhor explicam a distribuição espacial das TPIs e solos adjacentes foi aplicada a análise de Bio-Env. Esta análise utiliza a matriz de similaridade de Bray-Curtis para os dados bióticos, e a matriz de dissimilaridade construída a partir das variáveis ambientais normalizadas a partir do coeficiente de distância Euclidiana. As matrizes são comparadas pelo coeficiente de correlação de Spearman ponderado para comparar as duas matrizes, uma vez que estas não podem ser comparadas diretamente devido a diferenças em suas escalas (CLARKE; WARWICK, 1994). Todos as análises multivariadas foram realizadas no programa PRIMER 6 (Playmouth Marine Laboratory, Primer E, Reino Unido).

2.2.1.7 Pirosequenciamento

• Amplificação por PCR e purificação

Os primers F515 e R806 (Tabela 2.3) utilizados para reação de PCR foram desenhados a partir da região V3 do gene 16S rRNA. Foi adicionado no primers F515 sequências barcode Roche 454-B pyrosequencing e adaptador GT, enquanto no primers R806 foi adicionado sequências barcode Roche 454-A pyrosequencing e adaptador GC. Barcode com 12-pb foram incluídos em ambos os primers. A reação de amplificação foi realizada em triplicata em solução contendo 2,5 x tampão para reação de PCR, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada primer (Alpha DNA, Montreal, Canadá), 10 ng de DNA e 0,056 U de FastStart High Fidelity PCR System enzyme blend (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para um volume final de 25 µL. Os ciclos utilizados foram: desnaturação inicial de 95°C por 5 min; 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento dos primers a 53°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min; e extensão final a 72°C por 10 min. O produto amplificado foi verificado em gel de agarose, purificados com Qiagen PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) e quantificados em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Os produtos purificados foram submetidos ao pirosequenciamento em sequenciador automático Genome Sequencer FLX System (454 Life Sciences, Branford, CT, USA) pela Macrogen Inc. Company, Coréia do Sul.

Primers	Sequências (5' - 3')	Fragmento (pb)	Referência
F515	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	~350	
R806	GGACTACVSGGGTATCTAAT		LAUBER et al., 2008

Tabela 2.3 - Primers da região 16S rRNA utilizados nas reações para Pirosequenciamento

• Análises das sequências

As sequências foram extraídas do arquivo *Standard Flowgram Format* (SFF) usando o conversor de SFF na interface Galaxy (GOECKS; NEKRUTENKO; TAYLOR, 2010). As sequências foram filtradas utilizando-se como parâmetros a presença dos *primers forward* e *reverse* e dos *barcodes* usados em cada amostra, além do comprimento das sequências entre 200 e 350pb que apresentaram qualidade acima de 20. Essas

sequências foram utilizadas para posteriores analises no *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (Qiime versão 1.2.1), disponibilizado na plataforma Galaxy. As sequências que apresentaram erros introduzidos durante o pirosequenciamento foram detectadas utilizando a opção para os dados de titânio no programa Denoiser 0.91 (REEDER; KNIGHT, 2010), além de verificar sequências que apresentavam quimeras utilizando o UCHIME (EDGAR et al., 2011). As sequências válidas foram agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO) usando o UCLUST versão 1.2.21 (EDGAR, 2010), considerando-se uma distância evolutiva de 0,03 (*cutoff* de 97%). Sequências com baixa qualidade foram descartadas.

A taxonomia das sequências foi atribuída com outras previamente depositadas no banco de dados de sequências do gene 16S rRNA do *Ribosomal Database Project* (RDP) II, utilizando a ferramenta *Classifier*. Posteriormente, foi estimada a abundância relativa dos filos bacterianos, comparando o número de sequências classificadas de cada filo com o número total de sequências por amostra. Foi realizada a análise ANOVA, utilizando o programa Statistica v10 (StatSoft – Tulsa, EUA), com nível de significância de 5% (p<0,05) para verificar diferenças a nível de filo, classe e subgrupos de *Bacteria* entre as amostras de Terra Preta, Carvão e solo adjacente de cada sítio. Também foram calculados os coeficientes de correlação de Spearman entre fatores químicos do solo (pH, matéria orgânica – MO, P, Ca, Mg, Al, H+Al, SB e CTC) e abundância relativa das Classes de *Proteobacteria* e Subgrupos de *Acidobacteria* utilizando o programa Statistica v10 (StatSoft – Tulsa, EUA).

2.2.2 Resultados e Discussão

2.2.2.1 Propriedades químicas dos solos

No presente estudo, foram analisadas algumas propriedades químicas dos solos que apresentam horizonte A antrópico (Terra Preta de Índio) e de seus respectivos solos adjacentes coletados nos quatro sítios arqueológicos deste estudo situados na Amazônia Central (Balbina, Barro Branco, Costa do Açutuba e Hatahara). Os diferentes sítios apresentam distintos sistemas de uso da terra, sendo caracterizados principalmente por uso com agricultura de subsistência e cobertura vegetal em estágio de regeneração. As principais propriedades químicas da Terra Preta de Índio (TPI) e dos solos adjacentes (ADJ) podem ser visualizados na Tabela 2.4. Com base na caracterização dos atributos químicos do solo, o pH, a saturação por basess (SB) e os teores de Ca, Mg apresentaram diferença estatística significativa ao nível de 0.0005 % entre as amostras de TPI e os solos adjacentes. Os teores de P e Al diferiram entre os solos de TPI e solos adjacentes ao nível de significância de 0.005 %. Os teores de MO, e os valores de H+Al e CTC por sua vez mostraram diferença estatística ao nível de 0.05 % entre os solos TPI e os solos adjacentes.

A média dos valores de pH foi 5 em TPI nas amostras dos quatro diferentes sítios estudados, enquanto nos solos adjacentes, a acidez foi mais elevada (valor médio de pH igual a 4). Os resultados referente ao pH do solo mostrados neste estudo corroboram os achados de Lima et al. (2002) e Falcão; Borges (2006) em solos TPI. O uso do fogo por atividades antrópicas pode ter sido a causa da elevação do pH nas TPIs. Glaser; Lehmann e Zech, 2002 e Lehmann et al., 2003 reportaram o aumento do pH em estudos envolvendo sistemas de corte e queima *slash-and-burn* e em solos que receberam adição de carvão. Vale ressaltar que os solos que apresentam horizonte A antrópico contêm cerca de 70 vezes mais carvão do que solos com horizonte A não-antrópico, justificando, dessa forma, as diferenças estatísticas do pH observadas entre as TPIs e os solos ADJ. A Tabela 2.4 mostra correlações positivas entre o pH do solo , os teores de P, Ca, Mg e os valores de SB e correlações negativas com os teores de Al e os valores de H+Al.

Em solos tropicais, a MO possui importância expressiva no fornecimento de nutrientes, na retenção de cátions, na estabilidade da estrutura, na infiltração e retenção de água e na atividade da biomassa microbiana, constituindo um componente fundamental para a capacidade produtiva (BAYER; MIELNICZUK, 1998). Associa-se a isto o aumento da capacidade de retenção de água que também é favorecida pela alta quantidade de carvão presente nesse ambiente. Este fato corrobora para evitar a perda de nutrientes por lixiviação, que por sua vez tem implicação nos elevados teores de nutrientes encontrados em TPI.

No entanto, em média, a MO na TPI apresentou 24% a mais que os solos adjacentes. Devido à intensa atividade agrícola em áreas de TPI do sítio Costa do Açutuba, foi constatado menores teores de MO nestes solos.

A capacidade de troca de cátions (CTC) e a SB também foram mais elevadas na TPI quando comparadas aos solos ADJ. Esta observação pode estar associada à presença de elevados teores de matéria orgânica altamente reativa e de carvão nestes solos (LIANG et al., 2006). O carvão pode sofrer lenta oxidação nos lados da sua estrutura aromática, formando grupos carboxílicos que são responsáveis tanto pelo potencial de formação de complexos organo-minerais, bem como pela sustentabilidade da CTC nestes solos (GLASER et al., 2001).

		,							
	Т	Terra Preta de Í	ndio		Solo Adjacente	ente			
Atributos	Balbina	Barro	Costa	Hatahara	Balbina	Barro	Costa	Hatahara	-
químicos		Branco	Açutuba			Branco	Açutuba		
рН	4,7±0,7	5,1±0,1	4,8±0,6	5,2±0,2	3,9±0,1	3,4±0,1	$4,6\pm 0,4$	3,7±0,1	
MO	49±4,5	55±7,5	22±16	53±2,6	32±10	35±5,6	36±7,8	33±1,1	
Р	90±49	130±27	205±168	509±88	3±1,5	4±2,0	41±19	7±1,1	
Ca	45±49	86±11	58±50	138±7,6	3±2,3	2±0,5	36±17	6±1,1	
Mg	3±2,0	11±0,9	5±2,3	14±3,0	2±1,7	1 ± 0	6±3,6	1 ± 0	
Al	5±5	$0{\pm}0$	1±1	0 ± 0	13±4,3	24±3,0	2±2,6	14±1,7	
H+A1	78±34	42±3,6	50±19	49±5,7	73±41	132±30	57±13	96±14	
SB	47,6±51	98,0±11	64±53	153,0±5,3	6,0±4,3	3,1±0,6	44,8±21	8±1,1	
CTC	125,6±17	140,3±11	114±34	200,7±0,6	79,3±39	135,1±30	101,8±10	103,6±15	

Tabela 2.4 – Características químicas do horizonte A de solos Terra Preta de Índio e solos adjacentes localizados na Amazônia brasileira, estado do Amazonas

Ca, Mg, Al, potencial de acidez (H+Al), soma de bases (SB) e capacidade de troca catiônica (CTC) são representados em mmolc/dm⁻³; matéria orgânica (MO) em g/dm⁻³; o fósforo em mg/dm⁻³ e pH em CaCl2. Níveis significativos para o coeficiente de Spearman são indicados como: *P<0.05; **P<0.005; **P<0.005; **P<0.005. Valores nas colunas seguidos de diferentes letras são significativamente diferentes (ANOVA - teste de Tukey, $P \le 0.05$).

O P é um dos principais nutrientes para a produção de culturas. Grande parte dos solos naturais apresenta deficiência em P, tornando-se deficientes para o desenvolvimento de culturas agrícolas (LEHMANN et al., 2001). Os solos TPI contrastam com os solos locais (de origem não-antrópica) por apresentar elevados teores de P, sendo esta uma das principais razões da elevada produtividade atribuída a esses solos (LEHMANN et al., 2004). A origem do P nas TPIs é associada à cinza oriunda de queimas, presença de ossos de peixe e de outros animais. Os resultados apresentados na Tabela 2.4 confirmam os elevados teores de P nas TPIs, comprovando, assim achados de Liang et al. (2006) e Grossman et al. (2010). Tais valores detectados para P evidenciaram correlação com os teores de Ca, Mg e os valores de SB (Tabela 2.5).

Os resultados apontados na Tabela 2.4 indicaram altos teores de Ca, P e MG, e elevados valores de CTC, pH, SB em amostras de solo TPI do sítio Hatahara. No entanto, os valores de P e CTC são significamente maiores se comparados àqueles detectados a partir de amostras de solo TPI dos demais sítios de amostragem. Esses valores também são superiores aos encontrados nos solos adjacentes apresentados nesse estudo. O sítio Hatahara é um dos mais antigos e extensivamente caracterizado em sítios TPIs da região da Amazônia Central.

Amostras de Terra Preta dos sítios Balbina e Costa do Açutuba apresentaram valores superiores aos encontrados nos sítios Barro Branco e Hatahara, porém em teor muito reduzido quando comparados com o solo ADJ. Esses dois sítios também apresentaram menor teor de MO quando comparados com os demais sítios de TPI considerados neste estudo. As informações apresentadas na Tabela 2.5 indicam que o teor de Al está negativamente correlacionado com os teores de P, Ca e Mg e com os valores de pH.

	pН	МО	Р	Ca	Mg	Al	H+A1	SB	CTC
pН	-								
MO	-	-							
Р	0,904**	-	-						
Ca	0,976***	-	0,952***	-					
Mg	0,922**	-	0,802*	0,886**	-				
Al	-0,970***	-	-0,862*	-0,946***	-0,963***	-			
H+A1	-0,904**	-	-0,738*	-0,857*	-0,922**	0,970***	-		
SB	0,976***	-	0,952***	-	0,886**	-0,946***	-0,857*	-	
CTC	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 2.5 – Coeficientes de correlação de Spearman dos atributos dos solos com horizonte antrópico (Terra Preta de Índio) e solos adjacentes dos diferentes sítios arqueológicos

Ca, Mg, Al, potencial de acidez (H+Al), soma de bases (SB) e capacidade de troca catiônica (CTC) são representados em mmolc/dm⁻³; matéria orgânica (MO) em g/dm⁻³; o fósforo em mg/dm⁻³ e pH em CaCl2. Níveis significativos para o coeficiente de Spearman são indicados como: *P < 0.05; **P < 0.005; **P < 0.005.

2.2.2.2 PCR quantitativo em tempo real para o gene 16S rRNA de Bacteria

O objetivo desta análise foi quantificar o número de cópias do gene 16S rRNA de *Bacteria* em amostras de fragmentos de carvão, em TPI e solos ADJ, dos diferentes sítios estudados. Esse é o primeiro estudo que apresenta a quantificação do número de cópias do gene 16S rRNA de *Bacteria* em amostras de carvão provenientes da Terra Preta. Está técnica utiliza sonda fluorescente para detectar o produto amplificado a cada ciclo (SCHROEDER et al., 2006), permitindo a identificação do início da fase logarítmica da amplificação a fim de calcular a concentração inicial do DNA alvo (BATES et al., 2001).

Foi observado uma média de temperatura de *melting* pontual em 85° C, demonstrando, assim, a especificidade dos *primers* U968F e R1387 para a região amplificada do gene 16S rRNA de *Bacteria* e eficiência reação. A curva padrão mostrou que a eficiência da amplificação foi de 102% com valores de coeficientes de correlação da ordem de R²>0,993.

As amostras de TPI dos sítios Balbina, Barro Branco e Hatahara apresentaram maior número de cópias do gene 16S rRNA de *Bacteria* quando comparadas com as amostras de solo ADJ (Tabela 2.6).

Os dados não permitiram interpretar os resultados de qPCR obtidos para os fragmentos de carvão por grama de Terra Preta. Contudo, a quantificação do número de cópias do gene 16S rRNA de *Bacteria* presente em fragmentos de carvão foi expressa por grama de carvão presente em uma quantidade de TPI não mensurada.

A elevada abundância do gene 16S rRNA de *Bacteria* encontrada em fragmentos de carvão (Tabela 2.6) sustenta a hipótese de que estes podem servir como *habitat* para os micro-organismos do solo e protegê-los contra perturbações ecológicas (THIES; RILLIG, 2009). Dentre as características do *habitat* presente em fragmentos de carvão destaca-se a capacidade de retenção de água, especialmente em solos de textura arenosa, em função de sua estrutura altamente porosa. Cerca de 70 a 80% do volume do carvão é formado por poros (TEIXEIRA et al., 2009).

Tabela 2.6 – Abundância do número total de cópias do gene 16S rRNA de *Bacteria* analisados por qPCR a partir de amostras de Terra Preta de Índio, fragmentos de carvão e solo adjacente de quatro diferentes sítios arqueológicos

Sítios	Terra Preta	Carvão	Solo adjacente
Balbina	16,9E+09b	49,4E+09a	0,4E+09c
Barro Branco	23,1E+09b	30,3E+09a	0,6E+09c
Costa do Açutuba	1,3E+09b	67,7E+09a	5,6E+09b
Hatahara	25,7E+09b	59,1E+09a	1,5E+09c

Diferentes letras são significativamente diferentes (ANOVA - teste de Tukey, $P \le 0.05$). O desvio padrão das triplicatas de qPCR foram < 10% em todas as amostras.

As TPIs apresentam elevado grau de resiliência da fertilidade (GLASER et al., 2001), e esse fenômeno pode estar diretamente relacionado à presença de uma maior diversidade de comunidades bacterianas (KIM et al., 2007). Neste aspecto deve-se considerar também a funcionalidade desses organismos no solo, tal como a participação dos micro-organismos na ciclagem de nutrientes (ANDERSON et al., 2011). No que tange aos solos adjacentes tem sido mostrado menor diversidade bacteriana quando comparado com a TPI (KIM et al., 2007). As propriedades químicas dos solos adjacentes caracterizam-se por altos teores de acidez, baixa CTC e, consequentemente, baixa fertilidade, potencial produtivo e baixo grau de fertilidade (LEHMANN et al., 2003). Tal caracterização dos fatores abióticos do solo adjacente pode cooperar para o entendimento da menor tamanho da comunidade nele revelada por este estudo.

No presente estudo a abundância do gene 16S rRNA *Bacteria* foi menor em TPI do sítio Costa do Açutuba (1.3E+09) quando comparado com amostras de TPI dos sítios Balbina (16.9E+09); Barro Branco (23.1E+09) e Hatahara (25.7E+09). Atualmente as áreas de TPI do sítio Costa do Açutuba encontram-se com intensa atividade agrícola. De acordo com Lauber et al. (2008), os índices de abundância do gene 16S rRNA *Bacteria* foram maiores em solos florestais do que em solos agrícolas ou sob pastagens. Isto parece estar relacionado com diferenças na concentração de nutrientes e qualidade do solo resultante da decomposição da serrapilheira em área sob floresta, agricultura e pastagem.

2.2.2.3 Análise da estrutura da comunidade bacteriana por T-RFLP

Com base na discriminação automatizada dos T-RFs (*Terminal Restriction Fragments*) foram feitas análises de agrupamento usando a análise de MDS. A análise de MDS é uma técnica de ordenação utilizada em análises ecológicas que tem por objetivo descrever a estrutura de uma matriz complexa, reduzindo a dimensionalidade da matriz de dados e ordenando os objetos num gráfico. Essa técnica procura garantir que as distâncias entre os objetos no espaço plotado seja proporcional às distâncias entre os objetos no espaço plotado seja proporcional às distâncias entre os objetos no espaço plotado seja proporcional às distâncias entre os objetos no espaço multidimensional original, dessa forma, pontos que foram plotados próximos apresentam maior similaridade entre si. Uma descrição comparativa dos resultados obtidos por este estudo utilizando a técnica de T-RFLP é mostrada a seguir. Considerando as diferenças nas estruturas de comunidades bacterianas, amostras de solo adjacente diferiram daquelas de Terra Preta de Índio e fragmentos de carvão, nos diferentes sítios de amostragem.

Terra Preta de Índio vs. Solo Adjacente

Inicialmente foram comparadas as estruturas das comunidades bacterianas em amostras de Terra Preta *vs.* solo adjacente. A análise de MDS dos perfís de T-RFs foi feita separadamente para cada sítio arqueológico conforme apresentado na Figura 2.6. Os resultados mostraram que a estrutura da comunidade de *Bacteria* em Terra Preta de Índio diferiu daquela presente em solo adjacente. A representação bidimensional da análise de MDS foi validada por níveis de *Stress* variando de 0 a 0,04 (Figura 2.6). A Figura 2.6 mostra agrupamentos ao nível de similaridade de 40 a 70% entre as amostras de TPI e ADJ, revelando um mesmo padrão de ordenação para os diferentes sítios. Os resultados revelam ainda alta similaridade entre as réplicas das amostras analisadas. Vale destacar que Grossman et al. (2010) encontraram grandes diferenças na diversidade de comunidade microbiana entre solos TPI e solo ADJ de um mesmo sítio.



Figura 2.6 – Análise em escala multidimensional (MDS) baseada nos T-RFs discriminados para o gene 16S rRNA de *Bacteria*. Sítios arqueológicos: (A) Balbina; (B) Barro Branco; (C) Costa do Açutuba e (D) Hatahara, localizados na Amazônia (AM)

Para testar a diferença na composição das comunidades bacterianas, a análise de similaridade ANOSIM e a porcentagem de dissimilaridade SIMPER (ambos os testes calculados com base no coeficiente de similaridade de Bray-Curtis) foram realizadas utilizando o programa Primer 6 (Playmouth Marine Laboratory, Primer E, Reino Unido). ANOSIM é um teste estatístico baseado em permutação, análogo ao teste ANOVA, o qual avalia a diferença entre grupos de amostras de diferentes locais e tratamentos experimentais (YANNARELL; TRIPLETT, 2004; DANOVARO et al., 2006). O teste de SIMPER é um teste estatístico que avalia a diferença entre grupos expressando os resultados em valores percentuais de dissimilaridade. Os resultados apresentados na Tabela 2.7 garantem a interpretação baseada na análise de MDS, garantindo que as amostras TPI são estatisticamente diferentes da ADJ, onde todas as análises apresentaram

valores de R global acima de 0,90. Essa diferença estrutural de comunidades bacterianas pode estar relacionada com o histórico do uso da terra (GROSSMAN et al., 2010), assim como os atributos químicos do solo (NAVARRETE et al., 2010).

Tabela 2.7 – Índices de similaridade ANOSIM e dissimilaridade SIMPER obtidos pela técnica de T-RFLP considerando o Domínio *Bacteria* em Terra Preta de Índio (TPI) e solos adjacentes (ADJ)

Terra Preta vs. Adjacente	ANOSIM	SIMPER
Balbina	1	39,12
Barro Branco	1	79,45
Costa do Açutuba	0,926	62,85
Hatahara	1	87,59

Valores de "r" são expressos, todos com p<0,001. Valores > 0,75 são estatisticamente diferentes; >0,5 possuem sobreposição, mas ainda são claramente diferentes; e <0,5 não apresentam diferença estatística.

A análise de dissimilaridade de percentagens (SIMPER) foi utilizada para avaliar a diferença existente entre as estruturas das comunidades bacterianas de TPI e ADJ do mesmo sítio. Observou-se na Tabela 2.7 que o sítio Balbina apresentou menor diferença entre as comunidades bacteriana de TPI e ADJ. Por outro lado, o sítio Hatahara foi o sítio que apresentou maior diferença entre as comunidades de TPI e ADJ (Tabela 2.7). Os sítios Barro Branco e Costa do Açutuba apresentaram diferenças acima de 60% na estrutura das comunidades bacterianas entre TPI e ADJ.

Assim como no presente estudo, as estruturas e diversidades bacterianas em Terra Preta de Índio têm sido relatadas em outros estudos, bem como sua comparação com seus respectivos solos adjacente (KIM et al., 2007; TSAI et al., 2009; GROSSMAN et al., 2010). No entanto, maior parte destes estudos avaliou as estruturas e diversidades bacterianas sem levar em conta a correlação entre os atributos químicos dos solos. A utilização combinada de vários parâmetros biológicos é mais adequada para avaliar alterações ambientais do que aqueles que seriam obtidos por meio da análise individual. Dentro desse contexto, os métodos de estatística multivariada, que permitem considerar as propriedades do solo e os padrões biológicos conjuntamente, permitem extrair informações complementares, que a análise univariada não consegue evidenciar (McGARIGAL; CUSHMAN; STAFFORD, 2000). Para melhor entender as diferenças das comunidades bacterianas encontradas nas amostras de Terra Preta e solo adjacente, foi realizada a análise de Bio-Env para determinar quais propriedades do solo que melhor explicam os padrões biológicos observados na análise de T-RFLP. As variáveis ambientais utilizadas no teste foram pH, Ca, Mg, MO, P, SB, CTC, Al e H+Al. A maior correlação (Rho = 0,924) consiste em duas variáveis, Ca e Al (Tabela 2.8) do sítio Barro Branco. Teores de Ca se correlacionaram negativamente com os teores de Al (Tabela 2.5). Estudos realizados em solos da Amazônia mostraram que na maioria dos solos sem ação antropogênica os teores de Ca são baixos, devido ao intenso intemperismo e lixiviação ocorrentes na região (VIEIRA; SANTOS, 1987). Por outro lado, na maior parte das amostras de solos antropogênicos os teores de Ca são mais elevados. Esse comportamento pode ser atribuído ao descarte de materiais pelos povos pré-colombianos, tais como ossos, que são ricos em Ca e também devido à maior afinidade do Ca com as superfícies de troca, o que desfavorece a lixiviação.

Tabela 2.8 – Resultados da análise Bio-Env para amostras de Terra Preta de Índio e solo adjacente

Terra Preta vs. Adjacente	N° de variáveis	Rho	Melhores combinações de variação
Balbina	2	0,606	P; Ca
Barro Branco	2	0,924	Ca; Al
Costa do Açutuba	1	0,557	Р
Hatahara	5	0,927	P; Mg; H+Al; SB

Variáveis ambientais selecionadas: pH, Ca, Mg, MO, P, SB, CTC, Al e H+Al.

No horizonte antrópico das TPI pode-se encontrar elevados teores de Ca, os quais contribuem para os altos valores de CTC e SB nesses ambientes (FALCÃO; MOREIRA; COMENFORD, 2009). Especificamente no sítio Barro Branco os teores de Ca nas TPIs apresentaram 98% a mais quando comparados aos solos ADJ (Tabela 2.4). Os sítios Balbina, Costa do Açutuba e Hatahara apresentaram correlação entre o P e as comunidades bacterianas (Tabela 2.6). Kuramae et al. (2011) mostrou que o P foi o principal atributo que explicou as diferenças nas comunidades bacterianas do solo e essas comunidades não se relacionaram ao uso da terra, mas sim aos fatores de solo. Navarrete et al., 2009, indicaram diferenças nas estruturas das comunidades bacterianas correlacionadas com os teores de P e matéria orgânica de TPI.

Os elevados teores de Mg e SB em Terra Preta apresentaram correlação positiva com a comunidade bacteriana no sítio Hatahara (Tabela 2.5). A menor correlação entre as variáveis ambientais e as comunidades bacterianas foi encontrada no sítio Costa do Açutuba (Rho = 0,325).

O teor de Al demonstrou ser um atributo de elevada correlação com a variabilidade dos solos ADJ. Em estudo realizado em solos da Amazônia Ocidental, a diversidade de comunidades bacterianas apresentou correlação com a acidez do solo, atributos como pH, Al e saturação de bases (JESUS et al., 2009). O Al é considerado tóxico para as plantas e micro-organismos (WOOD, 1995; JONER et al., 2005), e pode ser um fator limitante para algumas espécies bacterianas e principalmente para a agricultura.

A carência de P disponível nos solos da região amazônica para as plantas tem sido atribuída como a principal dificuldade para os cultivos agrícolas (LEHMANN et al., 2001). Provavelmente em função disso, os altos teores de P nas TPIs consistem na principal razão do elevado potencial produtivo desses solos antrópicos (LEHMANN et al., 2004). De maneira geral, os teores de P apresentaram correlação com a comunidade bacteriana nos sítios Balbina, Costa do Açutuba e Hatahara.

A MO carbonizada altera indiretamente os ciclos biogeoquímicos e os processos microbianos dos solos pelo mecanismo do aumento da CTC (LIANG et al., 2008; WARNOCK et al., 2007). As tendências edáficas das TPIs com altos teores de P, pH, Ca e concentrações de carvão sugerem que o histórico do uso da terra altera as propriedades do solo e, consequentemente, determinam as comunidades microbianas observadas atualmente (GROSSMAN et al., 2010).

Carvão vs. Solo Adjacente

O carvão vegetal, embora seja um material relativamente inerte no solo, e de alta estabilidade, tem a capacidade de contribuir para a melhora das propriedades físicas, químicas e, consequentemente, biológicas do solo. A composição e a estrutura química do carvão conferem a ele uma grande persistência no solo. Além disso, o carvão apresenta uma estrutura de 70 a 80% formada por poros. Em virtude dessa conformação porosa,

alguns trabalhos têm demonstrado a utilização de fragmentos de carvão no solo como micro-habitat para organismos do solo (PIETIKAINEM; KIIKKILA; FRITZE, 2000).

Com base nos resultados dos perfis de T-RFs do gene 16S rRNA de *Bacteria*, foi feita análise de MDS da estrutura de comunidade bacteriana de carvão e solo adjacente, comparativamente (Figura 2.7). A análise de MDS para *Bacteria* demonstrou haver uma nítida separação entre as amostras de carvão e os solos adjacentes dos quatro sítios estudados, além de apresentar similaridade entre as réplicas das amostras.



Figura 2.7 – Análise em escala multidimensional (MDS) baseada nos T-RFs discriminados para o gene 16S rRNA de *Bacteria*. Sítios arqueológicos: (A) Balbina; (B) Barro Branco; (C) Costa do Açutuba e (D) Hatahara, localizados na Amazônia (AM)

Complementando a representação gráfica obtida pela MDS, uma análise de ANOSIM foi aplicada com o objetivo de discriminar as amostras de carvão *vs.* solo adjacente. Para a estrutura da comunidade bacteriana, a análise de ANOSIM revelou diferenças estatísticas (R global = 1; P < 0,001) entre as amostras dos quatro sítios arqueológicos estudados (Tabela 2.9). A análise de SIMPER foi realizada para avaliar a

difereça existente entre as estruturas das comunidades bacterianas de carvão e solo ADJ de cada sítio individualmente. Os valores obtidos na Tabela 2.9 indicam diferenças acima de 80% na estrutura da comunidade bacteriana entre o carvão e o solo ADJ.

Por uma limitação metodológica não foi possível realizar a análise de Bio-Env entre as amostras de carvão e solo adjacente, para determinar quais propriedades químicas melhor explicam os padrões biológicos observados pela análise de T-RFLP.

Tabela 2.9 – Índices de similaridade ANOSIM e dissimilaridade SIMPER obtidos usando a técnica de T-RFLP considerando o Domínio *Bacteria* em fragmentos de carvão (CAR) e solos adjacentes (ADJ)

Carvão vs. Adjacente	ANOSIM	SIMPER
Balbina	1	85,51
Barro Branco	1	82,93
Costa do Açutuba	1	80,82
Hatahara	1	93,31

Valores de "r" são expressos com P < 0,001. Valores > 0,75 são estatisticamente diferentes; > 0,5 possuem sobreposição, mas ainda são claramente diferentes; e < 0,5 não apresentam diferença estatística.

Em estudo recente desenvolvido por Anderson e colaboradores (2011) utilizando a técnica de T-RFLP, avaliou a influência da aplicação do carvão em solos agrícolas na estrutura da comunidade bacteriana. Os resultados indicaram que o carvão promoveu a solubilização de fosfato de bactérias, alterou a estrutura da comunidade microbiana do solo, além de diminuir bactérias patogênicas de plantas. Até o presente momento, estudos relacionados com a aplicação do carvão em solos têm utilizado carvão proveniente de amostras de biomassa vegetal, como por exemplo, *Pinus radiata* (ANDERSON et al., 2011) e árvores cítricas (KOLTON et al., 2011), além disso, esses carvões foram produzidos em diferentes temperaturas. No entanto, o carvão da Terra Preta pode ser proveniente da queima de diversos materiais vegetais, humanos e animais e sua aplicação nos solos da região amazônica se dá por centenas de anos, o que principalmente difere dos trabalhos realizados recentemente.

Steiner et al. (2004) estudaram o efeito do carvão em Latossolos altamente intemperizados da região Amazônica, sobre o crescimento de plantas de sorgo. Os autores observaram que as parcelas que receberam carvão mostraram aumento de 40% no

crescimento das plantas e aumento de 50% no rendimento, quando comparado com a parcela que recebeu apenas fertilizantes químicos. Estes resultados evidenciam o papel do

carvão na retenção de nutrientes e/ou sua capacidade de sorção e seu efeito positivo na produtividade das culturas. Os autores observaram ainda que o uso do carvão aumentou a atividade microbiana e diminuiu as perdas de nutrientes por lixiviação.

Os resíduos de carvão e biomassa carbonizada deixados nos locais das queimadas podem servir para melhorar a fertilidade de solos tropicais por contribuir com a retenção de nutrientes (GLASER et al., 2002). Tem sido reportado também que a adição de carvão ao solo tem efeitos positivos sobre suas propriedades aumentando a fertilidade e a produtividade do mesmo (KETTERINGS; BIGHAM; LAPERCHE, 2000; GLASER et al., 2002).

2.2.2.4 Composição da comunidade bacteriana

O sequenciamento em larga escala (pirosequenciamento) de amostras de DNA foi realizado em sequenciador automático *Genome Sequencer FLX System* (454 Life Sciences) com a plataforma *GS FLX Titanium* (Macrogen Inc. Company, Coréia do Sul). O mesmo foi realizado considerando três réplicas de DNA para cada amostra de Terra Preta de Índio (TPI), solo adjacente (ADJ) e fragmentos de carvão (CAR) coletada nos quatro sítios arqueológicos considerados neste estudo: Balbina, Barro Branco, Costa do Açutuba e Hatahara.

O número total de sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas a partir de um total de 36 amostras foi de 355,252. As sequências foram agrupadas de acordo com a sequência do código de barras associado aos primers *forward* e *reverse*. Padrão de qualidade de sequências, foi considerado tendo como base comprimento entre 200 e 350 pb com qualidade acima de 20. O número total de sequências válidas a partir do total de 36 amostras foi de 226,473 (98% do total das sequências) para o Domínio *Bacteria*. Segundo (FIERER et al., 2008; JONES et al., 2009; LAUBER et al., 2009), somente a este nível de cobertura de sequências pode-se inferir com precisão os valores de abundância relativa da diversidade bacteriana.

As sequências válidas foram agrupadas em UTOs usando o UCLUST versão 1.2.21 (EDGAR, 2010), considerando, para tanto, uma distância evolutiva de 0.03 (*cutoff* de 97%). A taxonomia das sequências foi atribuída com base no *Ribosomal Database Project* (RDP) II, utilizando a ferramenta *Classifier*. A abundância relativa dos filos bacterianos foi estimada comparando o número de sequências classificadas de cada filo com o número total de sequências obtido por amostra. Dessa maneira, os dados apresentados na Tabela 2.10 indicam a abundância relativa de cada filo encontrado nas amostras de Terra Preta de Índio, solo adjacente e fragmentos de carvão.

Do total de sequências analisadas no RDP, o percentual atribuído a bactérias não identificadas variou de 16 a 39%. O resultado de abundância relativa da classificação das sequências apresenta-se na Tabela 2.10. Um total de 12 filos bacterianos foi identificado a partir da classificação das sequências do gene 16S rRNA recuperadas das amostras de Terra Preta, solo adjacente e carvão. Dentre estes, o filo Proteobacteria foi dominante em todas as amostras analisadas, seguido pelos filos Acidobacteria, Actinobacteria e Firmicutes. A elevada abundância revelada para estes filos bacterianos sugere seu presumível papel funcional nos solos estudados. O filo Verrucomicrobia também apresentou dominância e diferenças estatísticas entre as amostras de carvão dos sítios Balbina, Barro Branco e Hatahara e os respectivos solos adjacentes. Os filos Bacteroidetes, Chlamydiae, Chloroflexi, Gemmatimonadetes, Nitrospira, Planctomycetes e WS3 também foram afiliados a partir das sequências de DNA recuperadas das amostras analisadas. Contudo, tais filos bacterianos apresentaram níveis de abundância menores do que os revelados para os grupos dominantes. Estes resultados, embora assegurados por um maior número de sequências, corroboram os achados de estudos que empregaram bibliotecas de clones para estudar a comunidade bacteriana em solos com horizonte A antrópico (TPI) (KIM et al., 2007; TSAI et al., 2009).

Diferenças na abundância relativa dos filos *Acidobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi, Nitrospira, Verrucomicrobia* e *WS3* entre as amostras de TPI, ADJ e fragmentos de carvão estão apresentados na Tabela 2.10. O filo *Acidobacteria* foi abundante em solos adjacentes dos sítios Balbina, Barro Branco e Hatahara, com diferenças estatísticas, quando comparado com as amostras de TPI e carvão. Por outro lado, o sítio Costa do Açutuba não apresentou diferença estatística entre as amostras de TPI e solo ADJ. A predominância do filo *Actinobacteria* ocorreu em amostras de carvão e

solo ADJ dos sítios Barro Branco e Hatahara. O sítio Balbina apresentou abundância deste filo nas amostras de carvão com diferenças estatísticas entre a Terra Preta e o solo adjacente.

O filo *Bacteroidetes* apresentou maior abundância relativa em TPI, com diferenças estatísticas significativas quando comparada com os valores obtidos para as amostras de carvão e solo adjacente, nos sítios Balbina e Barro Branco. No sítio Costa do Açutuba, a presença deste filo não apresentou diferenças estatísticas entre as amostras de Terra Preta, carvão e solo adjacente, enquanto que no sítio Hatahara a presença deste filo foi maior em amostras de carvão quando comparados com Terra Preta e solo adjacente (Tabela 2.10).

O filo Chloroflexi indicou maior abundância relativa em TPI e fragmentos de carvão em relação aos solos adjacentes, nos sítios Balbina, Barro Branco e Hatahara. As amostras estudadas do sítio Costa do Açutuba não apresentaram diferenças para esse filo. O filo Nitrospira apresentou diferenças e elevada abundância relativa em Terra Preta quando comparado com o carvão e solo adjacente (Tabela 2.10). Segundo Acosta-Martínez et al. (2010), bactérias pertencentes aos filos Chloroflexi e Nitrospira foram encontradas em solos com elevados teores de umidade. Tais resultados corroboram os resultados encontrados no presente estudo. Vale ressaltar que em horizontes antrópicos de TPI foram detectados teores de umidade mais elevados em relação aos solos adjacentes (NEVES JUNIOR, 2008). De acordo com Acosta-Martínez et al., 2010, a correlação positiva entre o filo Nitrospira e a biomassa microbiana do N indica a importância ecológica do ciclo do N em solos. Micro-organismos deste gênero são responsáveis por transformar a amônia (NH₃) em nitrito (NO₂) e posteriormente em nitrato (NO₃), que é a forma utilizada por outros organismos para assimilar o N. O gênero Nitrospira ocorreu em maior abundância em amostras de TPI e em fragmentos de carvão e a sua frequência diminuiu nos solos adjacentes dos sítios Balbina, Barro Branco, Costa do Açutuba e Hatahara (Tabela 2.15).

Terra Preta de Índio						Car	vão		Solo Adjacente			
Filos	Balbina	Barro	Costa	Hatahara	Balbina	Barro	Costa	Hatahara	Balbina	Barro	Costa	Hatahara
		Branco	Açutuba			Branco	Açutuba			Branco	Açutuba	
Acidobacteria	9,9±0b	11,5±0,3b	11,0±1,5a	11,6±1,5b	6,2±0,4c	8,5±1,3c	6,8±0,3b	7,4±0,4c	34,4±1,9a	16,5±1,3a	12,3±0,2a	18,0±1,1a
Actinobacteria	9,1±0,5b	8,6±0,8b	8,8±2,9a	7,7±2,9b	17,0±3,8a	17,5±0,5a	8,8±0,9a	14,8±1,1a	4,5±0,4b	18,2±1,3a	11,2±0,7a	13,5±1,1a
Bacteroidetes	4,2±0,6a	4,1±0,4a	3,4±0,2a	1,6±0,3b	2,5±0,08b	2,2±0,7b	4,2±0,5a	5,0±0,6a	1,1±0,2c	0,7±0,09c	4,3±0,4a	1,1±0,5b
Chlamydiae	0,1±0,1a	0,1±0,1a	0,1±0a	0,1±0,1a	0,1±0,1a	0,1±0,04a	0,1±0,1a	0,1±0,1a	0,2±0,1a	-	0,1±0,1a	0,1±0 a
Chloroflexi	0,2±0,1a	0,2±0a	0,4±0,3a	0,6±0,3 a	0,1±0,1a	0,2±0,1a	0,1±0 a	0,2±0,1 a	-	-	0,1±0,1a	-
Firmicutes	4,8±0,7b	6,5±0,1 a	5,3±0,8a	5,9±1,6 a	16,2±4,2a	3,1±0,3b	0,8±0,1c	4,1±0,1a	4,5±0,5b	2,1±0,1c	3,2±0,4b	4,6±0,5a
Gemmatimonadetes	0,7±0,1 a	0,7±0,1 a	2,5±1,0a	0,8±0,00 a	0,4±0,1b	0,3±0,3 a	1,0±0,07a	0,7±0,1a	0,2±0 b	0,6±0,07 a	2,7±0,9a	0,4±0,1b
Nitrospira	2,4±0,1a	1,4±0,1a	1,1±0,1 a	1,3±0,3 a	0,9±0,5b	0,3±0,1b	0,3±0,1 b	0,7±0,1 a	0,1±0b	-	0,4±0 b	-
Planctomycetes	2,5±0,3a	2,5±0,3 a	2,0±0,7 a	3,7±0,9 a	1,5±0,2b	2,0±0,4a	1,2±0,2a	1,5±0,03b	1,8±0,3a	2,7±0,7 a	2,1±0,6a	2,0±0,5 b
Proteobacteria	30,4±1,7ab	21,2±0,5b	27,1±1,5b	20,66±1,2b	27,1±1,2a	29,2±2,9a	48,5±2,5a	31,9±1,4 a	31,9±1,5b	19,1±0,6b	32,0±3,2b	22,5±0,8b
Verrucomicrobia	0,17±0,02c	0,28±0,0b	5,3±1,7 a	5,4±0,4a	7,1±0,7a	7,2±0,08a	4,7±0,3a	6,1±0,1a	4,0±0,09b	0,3±0,1b	5,9±1,3a	2,5±0,3b
WS3	0,1±0a	0,1±0,1a	0,4±0,3 a	0,9±0,2 a	-	-	-	-	-	-	0,2±0,1a	-
Outros	28,6±1,0a	34,9±0,6 a	31,6±1,7a	39,1±0,6a	20,3±0,4b	28,7±2,7b	22,6±2,3b	26,9±1,0c	16,7±1,0c	39,0±0,6a	24,7±3,1b	34,8±0,4 b

Tabela 2.10 Abundância relativa dos filos bacterianos classificados no Classifier (RDP II)

Análises estatísticas foram realizadas separadamente para cada sítio. Valores nas colunas seguidos de diferentes letras são significativamente diferentes entre as amostras de cada sítio (ANOVA seguido de teste de Tukey, $P \le 0.05$).

O filo *Verrucomicrobia* é dividido em sete subdivisões com base nas sequências do gene 16S rRNA (DUNFIELD et al., 2007; POL et al., 2007). Micro-organismos deste filo são amplamente distribuídos em diferentes ambientes (HUDSON et al., 1989; MUMMEY; STAHL, 2003), incluindo ocorrências, por exemplo, como simbiontes (ZHOU et al., 2003). Bactérias deste filo representam em média 7% da comunidade bacteriana do solo (JANSSEN, 2006). O filo *Verrucomicrobia* foi encontrado com maior frequência nas amostras de carvão dos sítios Balbina e Barro Branco quando comparados com Terra Preta e solo adjacente (Tabela 2.10). Segundo Acosta-Martínez et al. (2010), a classe *Verrucomicrobiae* se correlacionou positivamente com os teores de N e C total, indicando sua importância nos ciclos de N e C. As concentrações de C e N total na TPI são, em geral, mais altas que nos solos adjacentes (LEHMANN et al., 2003; GLASER et al., 2001). O gênero *Xiphinematobacteriaceae*, pertencente a este filo, apresentou maior número de sequências em todas as amostras estudadas (Tabela 2.15). O filo *WS3* foi detectado nas amostras de TPI dos quatro sítios arqueológicos, porém foi encontrado apenas em amostras do solo adjacente do sítio Costa do Açutuba (Tabela 2.10).

O filo Proteobacteria foi o mais dominante em todas as amostras estudadas, independente do sítio de origem (Tabela 2.10). Quantificações da abundância relativa foram feitas ao nível taxonômico de classe para as principais classes deste filo: Alpha, Beta, Delta e Gammaproteobacteria (Tabela 2.11). O filo Proteobacteria é um dos mais bem estudados e apresenta o maior número de representantes capazes de fixar nitrogênio atmosférico. A classe Alphaproteobacteria foi a mais abundante em todas as amostras, representando aproximadamente 45 a 76% do total de sequências afiliadas ao filo Proteobacteria (Tabela 2.11). Bactérias desta classe apresentaram maior abundância relativa nas amostras de carvão dos sítios Barro Branco, Costa do Acutuba e Hatahara quando comparados com TPI e solo adjacente. Kim et al., (2007) observaram que a maioria das sequências do gene 16S rRNA afiliaram-se a bactérias do filo Proteobacteria, classe recuperadas de TPI Alphaproteobacteria. A classe Betaproteobacteria foi mais abundante em amostras de TPI e fragmentos de carvão quando comparadas com amostras do solo adjacente nos sítios Balbina, Barro Branco e Hatahara. Nesses mesmos sítios, observou-se a predominância da classe Deltaproteobacteria nas amostras de TPI quando comparadas com as amostras de carvão e solo adjacente. De forma similar, Navarrete et al. (2010) estudando a diversidade bacteriana em TPI e fragmentos de carvão por meio de sequenciamento em larga escala baseado em

pirosequenciamento, também detectaram que a maioria das sequências analisadas afiliaramse ao filo *Proteobacteria*. A classe *Gammaproteobacteria* apresentou maior abundância relativa nas amostras de Terra Preta dos sítios Balbina e Barro Branco e nas amostras de carvão dos sítios Costa do Açutuba e Hatahara.

O gênero Bradyrhizobium foi detectado nas amostras de TPI, solo adjacente e fragmentos de carvão, pertencente à família Bradyrhizobiaceae. O gênero simbiótico Bradyrhizobium tem sido isolado de nódulos de plantas leguminosas altamente divergentes, tanto de espécies herbáceas quanto madeireiras, de origem tropical e temperada (SPRENT, 2001). Essas são bactérias fixadores de N₂ e desnitrificantes, pois apresentam a enzima nosZ responsável pela desnitrificação da redução N₂O para N₂ (ANDERSON et al., 2011). O gênero Hyphomicrobium foi encontrado em TPI e fragmentos de carvão (Tabela 2.15), e *Hyphomicrobiaceae*. famílias pertencem à família As Bradvrhizobiaceae e Hyphomicrobiaceae estão diretamente envolvidas no ciclo do N e C (ANDERSON et al. 2011). Segundo Anderson et al. (2011), a adição de carvão em solo proporcionou o aumento na abundância dessas famílias. Isso provavelmente explicaria o maior número de sequências deste gênero em amostras de TPI e fragmentos de carvão quando comparadas ao solo ADJ.

Terra Preta de Índio					Carv	Solo Adjacente						
Classe	Balbina	Barro	Costa	Hatahara	Balbina	Barro	Costa	Hatahara	Balbina	Barro	Costa	Hatahaı
		Branco	Açutuba			Branco	Açutuba			Branco	Açutuba	
Alpha	57,4±1,2b	48,2±1,4c	54,5±2,0b	51,6±5,8b	66,5±0,8a	69,5±3,3b	75,1±1,7a	65,3±0,9a	45,2±5,3c	76,7±0,6a	54,5±3,1b	54,5±1,2
Beta	15,9±0,6a	21,3±1,0b	23,7±1,9a	16,8±2,6a	15,9±0,9a	13,3±4,0a	9,1±1,3b	15,5±0,5a	7,6±2,8b	6,2±1,0c	26,1±1,2a	7,3±1,7
Delta	14,7±1,0a	13,0±1,6a	10,1±2,2a	12,1±2,3a	6,2±0,7b	4,4±0,9b	3,2±0,4b	3,9±0,3b	8,7±0,7c	5,6±0,3b	10,6±1,8a	6,9±0,7
Gamma	8,8±1,1a	10,8±1,1a	3,1±0,7 b	4,8±1,9 b	5,7±0,7b	8,4±0,3b	11,2±0,9a	13,0±1,1a	2,7±0,7c	2,2±0,9c	3,5±0,4b	11,5±4,1
Outros	3,0±0,4a	6,4±0,3b	8,5±0,7a	14,5±1,9a	5,5±0,4a	4,2±0,2c	1,1±0,1c	2,1±0,7b	35,5±2,9b	9,0±0,5a	5,0±1,6b	19,6±3

Tabela 2.11 Abundância relativa das Classes do filo Proteobacteria classificadas no Classifier (RDP II)

Análises estatísticas foram realizadas separadamente para cada sítio. Valores nas colunas seguidos de diferentes letras são significativamente diferentes entre as amostras de cada sítio (ANOVA seguido de teste de Tukey, $P \le 0.05$).

Além dos gêneros citados anteriormente, os gêneros *Rhizobium* e *Mesorhizobium*, ambos pertencentes à ordem *Rhizobiales*, apresentaram maior número de sequências em amostras de carvão (Tabela 2.15). As *Rhizobiales* incluem membros com uma grande variedade de características morfológicas, fisiológicas e biológicas (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004), dentre elas bactérias do gênero *Rhizobium* que participam do ciclo do N (PRESCOTT; HARLEY; KLEIN, 2005). Além disso, Kuramae et al. (2011) observaram que *Rhizobiales* apresentou maior associação com solos de campina da Holanda. O gênero *Rhizobium* apresentou maior número de sequências em carvão do sítio Balbina (22 sequências) e Hatahara (21 sequências), ambos em pousio por mais de 10 anos.

Outro gênero identificado em maior quantidade em amostras de carvão foi o *Sphingobium*, pertencentes à ordem *Sphingomonadales* e família *Sphingomonadaceae*. Resultado similar foi encontrado em estudo com aplicação de carvão no solo (ANDERSON et al., 2011). KURAMAE et al., 2011 também identificaram a presença do gênero *Sphingobium* em solos agrícolas da Holanda. Os dados apresentados na Tabela 2.15 mostram maior número de sequência do gênero *Sphingobium* em amostra de carvão do sítio Costa do Açutuba (45 sequências). Este sítio apresentou no ato da coleta intensa atividade agrícola, quando comparado com amostras de carvão dos sítios Balbina (18 sequências), Barro Branco (5 sequências) e Hatahara (34 sequências).

Sequências pertencentes à classe *Betaproteobacteria* foram detectadas nas amostras de TPI, solo adjacente e carvão. Nessas amostras, o gênero *Burkholderia*, representante da ordem *Burkholderiaceae* foi o mais abundante dentro dessa classe (Tabela 2.15), porém com maior número de sequências recuperadas a partir de amostras de solos adjacentes. Bactérias pertencentes a esta ordem são importantes para a solubilização do fosfato (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999; MALBOOBI et al., 2009), sendo encontradas em solos agricultáveis (KURAMAE et al., 2011). Anderson et al., 2011 verificaram elevada abundância do gênero *Burkholderia* em solos com aplicação de carvão. O gênero *Duganella*, por sua vez, foi encontrado apenas em amostras de TPI e fragmentos de carvão.

As classes *Deltaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria* foram menos frequentes nas amostras estudadas (Tabela 2.15). O gênero *Polyangiaceae*, representante da classe

Deltaproteobacteria, foi o que apresentou maior número de sequências nas amostras de TPI, solo adjacente e carvão. O número de sequências do gênero *Myxococcaceae* foram maiores nas amostras de TPI e carvão do que nas amostras de solo adjacente.

Bactérias do filo *Acidobacteria* podem representar aproximadamente 20% das comunidades bacterianas dos solos, sendo a amplitude desta cobertura entre 5 e 46% (JANSSEN, 2006). Neste estudo, bactérias pertencentes ao filo *Acidobacteria* foram dominantes e sua abundância relativa foi estatisticamente diferente entre os solos adjacentes (22%), TPI (11%) e fragmentos de carvão (7%) nos sítios Balbina, Barro Branco e Hatahara (Tabela 2.10). Este filo foi analisado ao nível taxonômico de subdivisões e os valores de abundância relativa estão apresentados na Tabela 2.12 para as amostras de TPI, solo adjacente e carvão. Foram identificados 14 diferentes subgrupos do filo *Acidobacteria*, sendo os subgrupos 1, 2 e 13 os mais abundantes nas amostras analisadas. Os subgrupos 4, 6, 7, 16 e 17 foram mais abundantes e diferentes estatisticamente em amostras de TPI e fragmentos de carvão dos sítios Balbina, Barro Branco e Hatahara, quando comparadas com amostras dos respectivos solos adjacentes. Representantes do subgrupo 5 foram somente encontrados em amostras de TPI do sítio Hatahara. O subgrupo 11 foi encontrado em amostras de TPI dos sítios Balbina e Barro Branco.

O filo *Actinobacteria* é um dos principais filos dentro do Domínio *Bacteria*, composto por uma única classe subdividida em três subclasses comuns nos solos: *Actinobacteridae, Acidimicrobidae* e *Rubrobacteridae* (JANSSEN, 2006). Membros pertencentes a este filo apresentam capacidade de produção de antibióticos (SILVEIRA et al., 2006), além de apresentar importante papel na decomposição da MO e formação de húmus (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983). No presente estudo, este filo foi o segundo mais abundante nas amostras de carvão (Tabela 2.10). Ao comparar o efeito do carvão sobre a diversidade bacteriana em solos da Flórida, Khodadad et al. (2011) encontraram um aumento na abundância relativa do filo *Actinobacteria* em solos tratados com carvão. Os autores mostraram que esses resultados revelam um nítido impacto do carvão sobre a comunidade bacteriana do solo. Assim, o carvão vegetal, embora seja um material relativamente inerte no solo, e de alta estabilidade, dependendo das condições da sua formação e das transformações por que passa no solo, tem a capacidade de contribuir para a melhora das propriedades fisicas (TEIXEIRA; MARTINS, 2003), químicas

(LEHMANN et al., 2003) e, consequentemente, biológicas do solo (THIES; RILLIG, 2009).

		Terra Preta	a de Índio		Carvão				Solo Adjacente			
	Balbina	Barro	Costa	Hatahara	Balbina	Barro	Costa	Hatahara	Balbina	Barro	Costa	Hatahara
		Branco	Açutuba			Branco	Açutuba			Branco	Açutuba	
01	10,3±2,6b	4,9±1,1b	21,3±2,9a	3,8±0,5b	22,0±8,4b	3,0±0,9b	18,4±5,0a	5,0±1,2b	61,7±0,6a	57,0±2,1a	27,5±5,8a	58,6±3,2a
02	8,3±1,2b	1,4±0,1b	7,2±2,8a	0,5±0,4b	8,7±1,8b	1,8±0,9b	3,0±1,6a	1,3±1,0b	20,9±1,2a	10,8±0,4a	8,3±4,7a	6,7±1,6a
03	11,1±1,4b	8,2±1,7b	16,5±2,8a	3,4±2,2b	16,0±2,5a	3,0±2,6b	17,9±4,7a	3,4±2,0b	12,1±0,9ab	31,0±1,9a	15,9±3,3a	28,1±3,6a
04	24,5±0,4a	26,1±1,4a	14,0±4,3a	15,2±2,8a	12,3±5,6b	22,4±6,1a	24,7±2,4a	13,9±2,9a	-	-	19,5±8,1a	0,3±0,4b
05	-	-	-	0,5±0,7	-	-	-	-	-	-	-	-
06	20,0±2,8a	30,0±1,9a	8,7±3,3a	30,2±1,9a	10,7±2,1b	9,7±1,4b	8,0±1,6a	14,0±4,4b	0,1±0,2c	-	5,9±3,7a	0,2±0,2c
07	8, 8±1,9a	5,8±0,7b	18,1±2,0a	7,9±0,7b	10,6±0,3a	13,1±3,8a	9,2±3,2b	16,3±2,4a	1,1±0,1b	0,1±0c	11,5±1,9b	0,9±0,2c
10	0,7±0,4a	0,3±0,2a	-	-	4,1±3,4a	0,2±0,3a	0,9±0,2a	1,1±0,5a	0,01±0,01a	-	1,2±1,2a	-
11	0,3±0,05	0,5±0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	2,1±0,6a	-	1,4±1,0b	-	-	-	3,7±0,003a	0,9±0,3	1,0±0,7a	4,7±1,0
16	8,5±2,0a	8,7±1,6b	6,1±3,0b	14,9±2,0a	6,5±2,4a	27,3±3,9a	15,0±2,2a	29,6±0,3	0,04±0,04b	-	6,1±1,4b	-
17	1,4±0,3b	4,3±0,5b	3,2±0,6a	11,4±3,2a	2,0±0,1a	10,9±5,6a	1,4±0,2a	3,5±1,0b	0,03±0,06c	-	1,9±1,4a	-
22	0,4±0,4	2,0±1,0	0,3±0,1a	2,0±1,4a	-	-	0,07±0,1b	0,8±0,1a	-	-	-	-
25	1,6±0,9a	5,2±1,3a	1,4±0,8a	7,2±0,8a	2,0±0,4a	7,4±3,1a	0,9±0,3a	10,6±2,8a	-	-	0,3±0,3a	-
Outros	2,9±0,9a	1,4±0,4a	0,2±0,2a	1,1±1,1a	2,6±0,2a	0,1±0,2b	-	-	-	-	0,4±0,7a	-

Tabela 2.12 Abundância relativa dos subgrupos de Acidobacteria classificados no Classifier (RDP II)

Análises estatísticas foram realizadas separadamente para cada sítio. Valores nas colunas seguidos de diferentes letras são significativamente diferentes entre as amostras de cada sítio (ANOVA seguido de teste de Tukey, $P \le 0.05$).
2.2.2.5 Influência dos atributos do solo sob a comunidade bacteriana

Recentes estudos têm explorado de diferentes maneiras a diversidade microbiana dos solos, incluindo a estimativa de riqueza de espécies em amostras individuais (ROESCH et al., 2007; FIERER et al., 2007), a avaliação de variáveis abióticas que controlam a diversidade e composição das comunidades (FIERER; JACKSON, 2006; LAUBER et al., 2009) e a avaliação de como os fatores abióticos específicos influenciam a composição de comunidades bacterianas (JONES et al., 2009).

As alterações das comunidades bacterianas do solo podem estar correlacionadas diretamente com os diferentes atributos químicos do solo (LAUBER et al., 2008). A Tabela 2.13 apresenta a correlação entre os atributos dos solos e as classes de *Proteobacteria*.

As *Alphaproteobacteria* estão positivamente correlacionadas com o H+Al. Bactérias desta classe (ordem *Bradyrhizobiales* e *Rhizobiales*), podem ser possíveis indicadores de solos que apresentam elevados C/N e baixos valores de pH (KURAMAE et al., 2011). A análise de correlação entre os membros da classe *Betaproteobacteria* e os atributos do solo das amostras estudadas mostrou que o Mg correlacionou positivamente, e o Al negativamente com esta classe. Segundo Fierer et al. (2007), a abundância de bactérias pertencentes a *Bacteroidetes, Betaproteobacteria* e *Acidobacteria* foram altamente relacionadas com a disponibilidade de C e com o pH do solo. Na classe *Deltaproteobacteria*, a correlação que melhor explicou a distribuição dos microorganismos positivamente foram os valores de pH, Ca, Mg e SB e negativamente com o teor de Al (Tabela 2.13).

Tabela 2.13 – Coeficientes de correlação de Spearman entre os atributos químicos dos solos e principais classes de *Proteobacteria*

Classe	pН	M.O.	Р	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC
α-Proteobacteria							0,738		
β -Proteobacteria					0,778	-0,778	-0,762		
δ -Proteobacteria	0,786			0,762	0,731	-0,731		0,762	

Correlações significativas P < 0.05.

A análise de correlação entre os atributos químicos e os subgrupos de *Acidobacteria* encontra-se na Tabela 2.14. O resultado referente ao subgrupo 1 indicou correlações negativas com pH, MO, P, Ca, Mg, SB e CTC, e somente correlação positiva com o Al. O subgrupo 2 apresentou correlações negativas com P, Ca e SB, e o subgrupo 3 correlações negativas com pH, Ca, Mg e SB, e correlações positivas com o Al e H+Al. A abundância relativa dos subgrupos 1, 2 e 3 diminuiu com o aumento do pH do solo, em contraste, a abundância relativa dos subgrupos 6 e 7 aumentaram com o pH do solo. Os subgrupos 6 e 16 apresentaram correlações positivas com pH, P, Ca, Mg e SB, e correlações negativas com Al e H+Al. Outros estudos também indicaram que o subgrupo 6 se correlações negativas com al e H+Al. Outros estudos também indicaram que o subgrupo 6 subgrupos mais raros 17, 22 e 25 também apresentaram as mesmas correlações do subgrupo 6, como descrito acima.

Subgrupo	pН	M.O.	Р	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC
Gp01	-0,881	-0,738	-0,905	-0,905	-0,826	0,826		-0,905	-0,810
Gp02			-0,786	-0,810				-0,810	
Gp03	-0,833			-0,762	-0,802	0,778	0,738	-0,762	
Gp04		0,762		0,714				0,714	
Gp06	0,952		0,905	0,976	0,862	-0,898	-0,786	0,976	
Gp13		-0,854							-0,805
Gp16	0,929	0,738	0,786	0,905	0,922	-0,898	-0,810	0,905	
Gp17	0,976		0,881	0,952	0,970	-0,994	-0,952	0,952	
Gp22	0,913		0,862	0,913	0,766	-0,817	-0,710	0,913	0,786
Gp25	0,952	0,708	0,903	0,952	0,884	-0,896	-0,781	0,952	0,708
Outros	0,778			0,743	0,735	-0,723		0,743	

Tabela 2.14 – Coeficientes de correlação de Spearman entre os atributos químicos dos solos e principais Subgrupos de *Acidobacteria*

Correlações significativas P < 0.05.

Jesus et al. (2009) indicaram que o sistema de uso da terra é o principal fator responsável pelas mudanças nos atributos dos solos, inclusive do pH, ao estudar a comunidade bacteriana em solos da Amazônia. Porém, os autores não fizeram uma análise detalhada de como os atributos do solo podem se correlacionar com os componentes da comunidade bacteriana. Brady (1989) explica que ao ocorrer a redução de saturação por base, mediante perdas por drenagem do calcário e de outros componentes metálicos, o pH também diminui numa proporção mais ou menos definida. Isto se ajusta ao consenso geral de que a lixiviação tende a aumentar a acidez dos solos de regiões úmidas.

		Terra Preta de Índio			Carvão pirogênico				Solo Adjacente				
Filo	Gênero	BA	BB	CA	HA	BA	BB	CA	HA	BA	BB	CA	HA
Actinobacteria	Corynebacterineae	17	10	7	5	11	5	4	13	17	26	45	23
	Frankineae	11	7	2	1	15	1	33	21	1	39	15	5
	Micrococcineae	3	5	7	6	164	36	34	62	8	53	51	75
	Micromonosporineae	124	20	20	33	76	28	9	57	7	8	71	26
	Propionibacterineae	25	27	8	9	23	23	24	31	0	1	28	2
	Pseudonocardineae	33	10	3	0	27	8	11	11	0	19	17	23
	Streptomycineae	22	20	19	15	650	52	49	79	27	16	59	17
	Streptosporangineae	68	18	26	13	57	10	7	15	48	193	44	108
	Rubrobacterineae	123	158	132	146	134	326	229	361	63	554	263	450
Bacteroidetes	Chryseobacterium	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Flavobacterium	8	21	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Chitinophaga	7	10	4	1	2	2	3	6	0	1	1	2
	Terrimonas	26	11	3	0	11	2	0	0	0	0	0	0
	Adhaeribacter	2	14	0	0	4	3	0	0	0	0	0	0
	Niastella	15	15	4	2	32	24	21	29	3	9	44	16
	Lewinella	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Pedobacter	0	0	0	2	7	2	0	0	0	2	3	6
	Sphingobacterium	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chlamydiae	Neochlamydia	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	5	0
	Rhabdochlamydia	0	0	0	0	7	0	1	0	0	1	3	0
	Rhabdochlamydia	0	0	0	0	7	0	1	0	0	1	3	0
	Parachlamydia	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Tabela 2.15 – Número de sequências de gêneros classificados no *Classifier* (RDP) das amostras de Terra Preta de Índio, fragmentos de carvão e solo adjacente. Sítios: Balbina (BA), Barro Branco (BB), Costa Açutuba (CA) e Hatahara (HA)

	2 // · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	X	Terra P	, reta de Ín	dio	Carvão pirogênico				Solo Adjacente			
Filo	Gênero	BA	BB	CA	HA	BA	BB	CA	HA	BA	BB	CA	НÁ
Chloroflexi	Caldilineacea	1	1	0	3	1	3	0	0	0	0	0	0
	Oscillochloris	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Firmicutes	Paenibacillaceae 2	8	11	2	11	11	7	1	7	2	3	5	0
	Alicyclobacillus	0	0	0	0	0	0	1	0	0	6	12	5
	Paenibacillaceae 1	11	10	15	6	42	22	5	19	8	9	7	1
	Bacillaceae 1	13	19	17	11	74	7	5	10	0	15	10	21
	Peptostreptococcaceae Incertae Sedis	0	0	0	0	0	0	0	0	16	3	0	0
	Clostridiaceae 1	0	0	1	2	0	0	0	1	25	3	4	1
Gemmatimonadetes	Gemmatimonas	49	42	95	37	31	26	66	47	11	54	180	29
Nitrospira	Nitrospira	164	87	46	59	66	19	22	52	7	3	15	0
Planctomycetes	Blastopirellula	6	9	1	5	2	3	0	4	0	0	0	0
	Gemmata	33	37	35	32	39	29	19	16	39	89	54	57
	Isosphaera	1	0	1	0	0	1	4	1	16	34	8	19
	Pirellula	14	9	2	15	5	2	3	12	1	0	2	0
	Planctomyces	6	3	1	1	2	1	4	4	0	0	0	0
Alphaproteobacteria	Asticcacaulis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1
	Brevundimonas	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
	Caulobacter	8	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
	Phenylobacterium	6	4	5	2	46	7	14	17	20	16	25	6
	Beijerinckia	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 2.15 – Número de sequências de gêneros classificados no Classifier (RDP) das amostras de Terra Preta de Índio, fragmentos de carvão e soloadjacente. Sítios: Balbina (BA), Barro Branco (BB), Costa Açutuba (CA) e Hatahara (HA)(continuação)

			Ferra Pr	eta de Íı	ndio		Carvão	pirogên	ico	Solo Adjacente			
Filo	Gênero	BA	BB	CA	HA	BA	BB	CA	HA	BA	BB	CA	HA
Alphaproteobacteria	Chelatococcus	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Bosea	0	0	0	0	7	3	1	1	0	0	0	0
	Bradyrhizobium	108	35	26	11	43	28	20	36	23	25	57	79
	Devosia	10	0	0	0	26	4	0	0	0	0	0	0
	Hyphomicrobium	5	1	9	10	6	11	14	41	0	0	0	0
	Pedomicrobium	0	0	0	4	48	74	0	0	13	6	54	5
	Rhodomicrobium	0	0	3	1	0	0	0	0	6	5	4	8
	Labrys	1	2	0	0	3	1	4	5	0	0	6	2
	Methylobacterium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	2
	Microvirga	20	19	9	5	0	0	0	0	0	0	5	0
	Mesorhizobium	0	0	6	2	31	13	11	13	0	0	0	0
	Rhizobium	14	3	1	0	22	11	7	21	0	0	0	7
	Rhodopila	0	0	0	0	0	0	0	0	1	9	3	8
	Blastomonas	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Sinorhizobium	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Porphyrobacter	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Novosphingobium	5	0	0	0	13	1	0	0	0	0	0	0
	Sphingobium	7	1	0	2	18	5	43	34	0	0	0	0
	Sphingomonas	4	2	3	3	27	4	3	1	1	7	5	8
	Sphingosinicella	0	0	0	0	0	0	0	0	5	51	211	0
Betaproteobacteria	Burkholderia	19	3	15	19	66	16	27	35	54	21	49	54
	Cupriavidus	0	0	6	2	35	16	0	0	0	0	0	0
	Ralstonia	0	0	0	0	7	2	0	0	3	0	5	4

 Tabela 2.15 – Número de sequências de gêneros classificados no Classifier (RDP) das amostras de Terra Preta de Índio, fragmentos de carvão e solo adjacente. Sítios: Balbina (BA), Barro Branco (BB), Costa Açutuba (CA) e Hatahara (HA)

0 5010	augueente. Stabs. Butoniu (Bri)	, Barro Branco (BB), Costa do Fiçatado							(••••••••••••••••••••••••••••••••••••••				
			Terra Pr	eta de Ír	ndio		Carvão	pirogên	ico		Solo A	Adjacent	e
Filo	Gênero	BA	BB	CA	HA	BA	BB	CA	HA	BA	BB	CA	HA
Betaproteobacteria	Duganella	2	1	0	0	4	18	3	99	0	0	0	0
	Massilia	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Nitrosospira	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Azoarcus	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0
Deltaproteobacteria	Peredibacter	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	Cystobacteraceae	6	1	23	4	3	1	5	1	10	12	43	22
	Myxococcaceae	16	6	18	18	19	10	3	15	0	0	3	0
	Haliangiaceae	0	0	1	3	0	0	3	1	0	0	0	0
	Polyangiaceae	50	28	25	18	23	21	27	25	50	43	55	38
Gammaproteobacteria	Aquicella	4	2	5	1	5	6	20	15	3	3	8	8
	Coxiella	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0
	Fluoribacter	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0
	Pseudomonas	4	4	0	0	15	2	3	12	0	0	0	0
	Dokdonella	4	2	0	0	1	4	0	0	0	0	2	7
	Acinetobacter	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0
	Dyella	8	1	1	5	0	0	2	31	13	7	4	0
	Lysobacter	0	0	6	4	5	7	8	73	0	0	0	0
	Nevskia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	Rhodanobacter	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
	Stenotrophomonas	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
	Xanthomonas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3

 Tabela 2.15 – Número de sequências de gêneros classificados no Classifier (RDP) das amostras de Terra Preta de Índio, fragmentos de carvão e solo adjacente. Sítios: Balbina (BA), Barro Branco (BB), Costa do Açutuba (CA) e Hatahara (HA) (continuação)

		Terra Preta de Índio			Carvão				Solo Adjacente				
Filo	Gênero	BA	BB	CA	HA	BA	BB	CA	HA	BA	BB	CA	HA
Verrucomicrobia	Opitutus	9	5	2	3	5	1	6	2	0	2	3	2
	Verrucomicrobiaceae genera incertae sedis	1	0	48	49	0	0	30	11	94	7	67	22
	Xiphinematobacteriaceae genera incertae sedis	289	336	194	164	521	364	285	399	154	20	443	141

 Tabela 2.15 – Número de sequências de gêneros classificados no Classifier (RDP) das amostras de Terra Preta de Índio, fragmentos de carvão e solo adjacente. Sítios: Balbina (BA), Barro Branco (BB), Costa do Açutuba (CA) e Hatahara (HA) (continuação)

2.3 Conclusões

Recentes estudos têm relatado a distribuição e diversidade das comunidades bacterianas em solos com a aplicação de carvão (Biochar), mas pouco se sabe sobre os micro-organismos que estão presentes nesse material. A partir da hipótese de que o carvão pode servir como micro-habitat para os micro-organismos, os resultados obtidos pela técnica de T-RFLP utilizando o gene 16S rRNA de Bacteria revelaram que as estruturas das comunidades bacterianas em fragmentos de carvão apresentaram diferenças significativas quando comparado com os solos adjacentes. Portanto, a ação antropogênica tem efeito sobre as comunidades bacterianas alterando suas estruturas. No entanto, técnicas mais refinadas são necessárias para mostrar se a presenca de carvão em solos é benéfica para os micro-organismos nesse ambiente. Para isso, utilizou a técnica de pirosequenciamento com o intuito de aprofundar as investigações das diferenças observadas a partir da técnica de T-RFLP. Certamente, os resultados de pirosequenciamento foram essenciais para examinar a predominância de algumas bactérias nos fragmentos de carvão, como por exemplo, bactérias pertencentes aos filos Proteobacteria e Actinobacteria. Observou-se também que os fragmentos de carvão apresentaram bactérias que podem estar diretamente relacionadas com os ciclos do N e C. Além disso, a presenca desses micro-organismos nos fragmentos de carvão pode favorecer a microbiota do solo e, consequentemente, sua qualidade. Neste sentido, o carvão pode servir como elemento de recuperação em ambientes degradados, agindo como condicionador do solo sendo esta uma alternativa promissora no manejo de solos agrícolas.

Referências

ACOSTA-MARTINEZ, V.; DOWD, S.E.; SUN, Y.; WESTER, D.; ALLEN, V.G. Pyrosequencing analysis for characterization of soil bacterial populations as affected by an integrated livestock-cotton production system. **Applied Soil Ecology**. Amsterdam, v. 45, p. 13-25, 2010.

ANDERSON, C.R.; CONDRON, T.M.; CLOUGH, T.J.; FRIERS, M.; STEWART, A.; HILL, R.A.; SHERLOCK, R.R. Biochar induced soil microbial community change: implications for biogeochemical cycling of carbon, nitrogen and phosphorus. **Pedobiologia**, Jena, v. 54, p. 309–320, 2011.

BATES, J. A.; TAYLOR, E. J. A.; KENYON, D. M.; THOMAS, J. E. The application of real-time PCR to the identification, detection and quantification of *Pyrenophora* species in barley seeds. **Molecular Plant Pathology**, New York, v. 2, p. 49-57, 2001.

BRADY, N.C. Natureza e propriedades dos solos. 7. ed. Trad. Antônio B. Neiva Figueiredo Filho. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1989. 583 p.

BAYER, C.; MIELNICZUK, J. Dinâmica e função da matéria orgânica. In: SANTOS, G.A.; CAMARGO, F.A.O. (Ed.). Fundamentos da matéria orgânica do solo ecossistemas tropicais & subtropicais. Porto Alegre: Gênesis, 1999. p. 9-26.

CLARKE, K.R. Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. **Australian Journal of Ecology**, Canberra, v. 18, p. 117-143, 1993.

CLARKE, K.R.; WARWICK, R.M. Change in marine communities: An approach to statistical analysis and interpretation. Plymouth: Plymouth Marine Laboratory, 1994. 144 p.

CLARKE, K.R.; WARWICK, R.M. Change in marine communities: An approach to statistical analysis and interpretation. 2. Ed. Plymouth: Plymouth Marine Laboratory, 2001.

CULMAN, S.W.; GAUCH, H.G.; BLACKWOOD, C.B.; THIES, J.E. Analysis of T-RFLP data using analysis of variance and ordination methods: A comparative study. **Journal of Microbiological Methods**, Amesterdan, v. 75, n. 1, p. 55-63, 2008.

DANOVARO, R.; LUNA, G.M.; DELL'ANNO, A.; PIETRANGELI, B. Comparison of two fingerprintings techniques, terminal restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis, for determination of bacterial diversity in aquatic environments. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 72, p. 5982-5989, 2006.

DUNFIELD, P.F.; YURYEV, A.; SENIN, P.; SMIRNOVA, A.V.; STOTT, M.B.; HOU, S.; LY, B.; SAW, J.H.; ZHOU, Z.; REN, Y.; WANG, J.; MOUNTAIN, B.W.; CROWE, M.A.; WEATHERBY, T.M.; BODELIER, P.L.; LIESACK, W.; FENG, L.; WANG, L.; ALAM, M. Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum Verrucomicrobia. **Nature**, London, v. 450, p. 879–882, 2007.

EDGAR, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, p. 2460-2461, 2010.

EDGAR, R.C.; HAAS, B.J.; CLEMENTE, J.C.; QUINCE, C.; KNIGHT, R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, Oxford, v. 27, p. 1-7, 2011.

EGERT, M.; FRIEDRICH, M.W. Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 2555–2562, 2003.

EDWARDS, U.; ROGALL, T.; BLOCKER, H.; EMDE, M.; BOTTGER, E.C. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 17, p. 7843-7853, 1989.

FALCÃO, N.P.S.; BORGES, L.F. Efeito da fertilidade de terra preta de índio da Amazônia Central no estado nutricional e na produtividade do mamão hawaí (Carica papaya L.). Acta Amazônica, Manaus, v. 36, n. 3, p. 401-406, 2006.

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.

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

FIERER, N.; BREITBART, M.; NULTON, J.; SALAMON, P.; LOZUPONE, C.; JONES, R.; ROBESON, M.; EDWARDS, R.A.; FELTS, B.; RAYHAWK, S.; KNIGHT, R.; ROHWER, F.; JACKSON, R.B. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. Applied and Environmental Microbiology, Baltimore, v. 73, p. 7059–7066, 2007.

FIERER, N.; HAMADY, M.; LAUBER, C.L.; KNIGHT, R. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. **Proceedings of National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 105, p. 17994–17999, 2008.

FILIP, Z. International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. Agriculture Ecosystems and Environment, Amsterdam, v. 88, p. 169–174, 2002.

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.; GUGGENBERGER, G.; HAUMAIER, L.; ZECH, W. Persistence of soil organic matter in archaeological soils (Terra Preta) of the Brazilian Amazon region. In: REES, R.; AL, E. (Ed.). Sustainable management of soil organic matter. Wallingford: CAB International, 2000. p. 190-194.

GLASER, B.; HAUMAIER, L.; GUGGENBERGER, G.; ZECH, W. The "Terra Preta" phenomenon: a model for sustainable agriculture in the 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.

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

GOECKS, J.; NEKRUTENKO, A.; TAYLOR, J. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. **Genome Biology**, London, v. 11, n. 8, R86, 2010.

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

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 gelelectrophoresis separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 3233–3241, 1997.

HUDSON, J.A.; SCHOFIELD, K.M.; MORGAN, H.W.; DANIEL, R. M. *Thermonema lapsum* gen. nov., sp. nov., a thermophilic gliding bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, DC, v. 39, p. 485–487, 1989.

JANSSEN, P.H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 72, p. 1719-1728, 2006.

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

JONER, E.J.; ELDHUSET, T.D.; LANGE, H.; FROSTEGARD, A. Changes in the microbial community in a forest soil amended with aluminum in situ. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 275, p. 295–304, 2005.

JONES, R.T.; ROBESON, M.S.; LAUBER, C.L.; HAMADY, M.; KNIGHT, R.; FIERER, N. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. **The ISME Journal**, New York, v. 3, p. 442–453, 2009.

KETTERINGS, Q.M.; BIGHAM, J.M.; LAPERCHE, V. Changes in soil mineralogy and texture caused by slash-and-burn fires in Sumatra, Indonesia. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 64, p. 1108-1117, 2000.

KHODADAD, C.L.M.; ZIMMERMAN, A.R.; GREEN, S.J.; UTHANDI, S.; FOSTER, J.S. Taxa-specific changes in soil microbial community composition induced by pyrogenic carbon amendments. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 43, p. 385-392, 2011.

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

KOLTON, M.; HAREL, Y.M.; PASTERNAK, Z.; GRABER, E.R.; ELAD, Y.; CYTRYN, E. Impact of biochar application to soil on the root-associated bacterial community structure of fully developed greenhouse pepper plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 77, p. 4924–4930, 2011.

KURAMAE, E.E.; YERGEAU, E.; WONG, L.C.; PIJL, A.S.; VEEN, J.A.V.; KOWALCHUK, G.A. Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, p. 1–13, 2011. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2011.01192.x.

LAUBER, C.L.; STRICKLAND, M.S.; BRADFORD, M.A.; FIERER, N. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 2407–2415, 2008.

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

LEHMANN, J.; CRAVO, M.S.; MACEDO, J.L.V.; MOREIRA, A.; SCHROTH, G. Phosphorus management for perennial crops in central Amazonian upland soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 237, p. 309–319, 2001.

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.

LEHMANN, J.; CAMPOS, C.V.; MACEDO, J.L.V.; GERMAN, L. Sequential fractionation and sources of P in Amazonian Dark Earths. In: GLASER, B.; WOODS, W.I. (Ed.). Amazonian Dark Earths: explorations in time and space. Berlin: Springer, 2004. p. 113-123.

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.; SOLOMON, D.; SOHI, S.; THIES, J.E.; SKJEMSTAD, J.O.; LUIZÃO, F.J.; ENGELHARD, M.H.; NEVES, E.G.; WIRICK, S. Stability of biomass-derived black carbon in soils. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, New York, v. 72, p. 6069–6078, 2008.

LIMA, H.N.; SCHAEFER, C.E.R.; MELLO, J.W.V.; GILKES, R.J.; KER, J.C. Pedogenesis and pre-colombian land use of "Terra Preta Anthrosols" ("Indian black earth") of Western Amazonia. **Geoderma**, Amsterdam, v. 110, p. 1–17, 2002.

MALBOOBI, M.A.; OWLIA, P.; BEHBAHANI, M.; SAROKHANI, E.; MORADI, S.; YAKHCHALI, B.; DELJOU, A.; HERAVI, K.M. Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly efficient soil bacterial isolates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 25, p. 1471–1477, 2009.

McGARIGAL, K.; CUSHMAN, S.; STAFFORD, S. Multivariate statistics for wildlife and ecology research. New York: Springer, 2000. 283 p.

MUMMEY, D.L.; STAHL, P.D. Candidate division BD: phylogeny, distribution and abundance in soil ecosystems. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 26, p. 228–235, 2003.

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.

NEVES JUNIOR, A.F. **Qualidade física de solos com horizonte antrópico (Terra Preta de Índio) na Amazônia Central**. 2008. 93 f. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

O'NEILL, B.; GROSSMAN, J.M.; TSAI, M.T.; GOMES, J.E.; LEHMANN, J.; PETERSON, J.; NEVES, E.; THIES, J.E. Bacterial community composition in Brazilian anthrosols and adjacent soils characterized using culturing and molecular identification. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, p. 23–35, 2009.

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

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.

POL, A.; HEIJMANS, K.; HARHANGI, H.R.; TEDESCO, D.; JETTEN, M.S.M.; OP DEN CAMP, H.J.M. Methanotrophy below pH1 by a new Verrucomicrobia species. **Nature**, London, v. 450, p. 874–878, 2007.

PRESCOTT, L.M.; HARLEY, J.P.; KLEIN, D.A. Microbiology. 6. ed. New York: McGraw-Hill, 2005.

REEDER, J.; KNIGHT ROB. Rapidly denoising pyrosequencing amplicon reads by exploiting rank-abundance distributions. **Nature Methods**, New York, v. 7, p. 668-669, 2010.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 17, p. 319–339, 1999.

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**, New York, v. 1, p. 283–290, 2007.

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

SCHROEDER, K.L.; OKUBARA, P.A.; TAMBONG, J.T.; LÉVESQUE, C.A.; PAULITZ, T.C. Identification and quantification of pathogenic *Pythium* spp. from soils in eastern Washington using real-time polymerase chain reaction. **Phytopathology**, St Paul, v. 96, p. 637-647, 2006.

SILVEIRA, E.L.; PEREIRA, R.M.; SCAQUITTO, D.C.; PEDRINHO, E.A.; VAL-MORAES, S.P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES; LEMOS, E.G.M. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. **Pesquisa** Agropecuária Brasileira, Brasília, DF, v. 41, p. 1507-1516, 2006.

SPRENT, J.L. Nodulation in legumes. Kew: Royal Botanic Gardens, 2001. 146 p.

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.

TEIXEIRA, W.G.; MARTINS, G.C. Soil physical characterization. In: LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GLASER, B.; WOODS, W.I. (Ed.). Amazonian dark earths: Origin, properties, management. Dordrecht: Kluwer, 2003. p. 271-286.

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.

THIES, J.E.; RILLIG, M.C. Characteristics of biochar: biological properties. In: LEHMANN, J.; JOSEPH, S. (Ed.). **Biochar for environmental management**: Science and technology. Oxford: Taylor & Francis, 2009. Chap. 6.

TROTHA, R.; REICHL. U.; THIES, F.L.; SPERLING, D.; KÖNIG, W.; KÖNIG, B. Adaption of a fragment analysis technique to an automated high-throughput multicapillary electrophoresis device for the precise qualitative and quantitative characterization of microbial communities. **Electrophoresis**, Wheiwheim, v. 23, p. 1070-1079, 2002.

TSAI, S.M.; NEILL, B.; CANNAVAN, F.S.; SAITO, D.; FALCÃO, N.P.S.; KERN, D.; GROSSMAN, J.; THIES, J. The microbial world of Terra Preta. In: WOODS, W.I.; TEIXEIRA, W.G.; LEHMANN, J.; STEINER, C.; WINKLERPRINS, A.; REBELLATO, L. Amazonian Dark Earth: wim sombroek's vision. Berlin: Springer, 2009. p. 299-308.

VIEIRA, L.S.; SANTOS, P.C.T.C. **Amazônia**: seus solos e outros recursos naturais. São Paulo: Agronômica Ceres, 1987. 416 p.

YANNARELL, A.C.; TRIPLETT, E.W. Within- and between-lake variability in the composition of bacterioplankton communities: investigations using multiple spatial scales. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 70, p. 214-223, 2004.

WARNOCK, D.D.; LEHMANN, J.; KUYPER, T.W.; RILLIG, M.C. Mycorrhizal responses to biochar in soil—concepts and mechanisms. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 300, p. 9–20, 2007.

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. **Proceedings of National** Academy of Science of the USA, Washington, DC, v. 87, p. 4576-4579, 1990.

WOOD, M. Mechanism of aluminum toxicity to soil bacteria and possible ecological applications. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 171, p. 63–69, 1995.

ZHOU, J.; XIA, B.; HUANG, H.; TREVES, D.S.; HAUSER, L.J.; MURAL, R.J., PALUMBO, A.V.; TIEDJE, J.M. Bacterial phylogenetic diversity and a novel candidate division of two humid region, sandy surface soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 915–924, 2003.

3 POTENCIAL DO CARVÃO PIROGÊNICO EM HOSPEDAR NOVOS FILOS DE *ARCHAEA*

RESUMO

Micro-organismos pertencentes ao Domínio Archaea apresentam importante papel no ciclo do N e C. Os estudos de Archaea em solos são relativamente recentes, sua estrutura e diversidade assim como os fatores que regulam essa diversidade são ainda pouco compreendidas. As áreas de Terra Preta de Índio (TPI) apresentam elevados teores de P, Ca, pH e baixa saturação por Al. A estabilidade da matéria orgânica nessas áreas são superiores em até três vezes em relação aos solos adjacentes. Isso se deve provavelmente às características mineralógicas desses solos orgânicos, ou devido à presença de maior quantidade de carvão que pode chegar até 70 vezes mais em relação aos solos de origem. Além disso, o carvão pirogênico pode servir como micro-habitat para a sobrevivência microbiana e proteção contra estresses abióticos. O objetivo deste estudo foi avaliar as comunidades de Archaea presentes em fragmentos de carvão pirogênico segregados de TPI, em TPI e solos adjacentes (ADJ). Para isso, foram coletadas amostras de solos de quatro diferentes sítios arqueológicos de TPI localizados na Amazônia Central. O acesso dessas comunidades foi baseado a partir de três metodologias que avaliam o gene 16S rRNA de Archaea: fingerprinting baseado na análise de T-RFLP e DGGE, com o propósito de avaliar o perfil da estrutura das comunidades de Archaea; e sequenciamento em larga escala (pirosequenciamento) visando estimar a abundância e acessar a composição das comunidades de Archaea. A partir dessas técnicas, foi possível observar diferenças na estrutura das comunidades de Archaea em fragmentos de carvão pirogênico quando comparado com os solos ADJ. Os filos Crenarchaeota e Euryarchaeota foram detectados nas amostras TPI, fragmentos de carvão pirogênico e solo ADJ, indicando dominância do filo Crenarchaeota. A classe Thermoprotei foi a única classe encontrada no presente estudo. Este foi o primeiro trabalho que estudou a diversidade da comunidade de Archaea presente em fragmentos de carvão pirogênico provenientes da TPI, utilizando a técnica de pirosequenciamento. No entanto, os resultados sugerem que é necessário um esforço maior, principalmente de isolamento / cultivo de Archaea, para melhor compreensão do papel ecológico e funcional desses micro-organismos com importante enfoque nos ciclos biogeoquímicos.

Palavras-chave: Carvão pirogênico, Terra Preta de Índio, Archaea, T-RFLP, DGGE, Pirosequenciamento

3 POTENTIAL OF PYROGENIC CHARCOAL IN HOSTING NEW ARCHAEAL PHYLA

ABSTRACT

Microorganisms belonging to the domain Archaea have an important role in the N and C cycles. The study of soil archaea is relatively recent, its structure and diversity as well as the factors that control this diversity are still not well understood. The areas of Amazonian Dark Earth (ADE) present high levels of P, Ca, pH and low Al saturation. The stability of organic matter in these areas is three times higher in relation to the adjacent soils. This is probably due to the mineralogical characteristics of these organic soils, or due to the higher amount of charcoal which may reach 70 times more than their soil of origin. Charcoal may serve as habitat to the survival of microorganisms and protection against abiotic stresses. The objective of this study was to evaluate archaeal communities present in charcoal fragments from ADE, in ADE samples and soil adjacent soil samples. Therefore, soil samples were collected from four different ADE archaeological sites in the Central Amazon. The assessments of these communities were based on three different methodologies which evaluated the archaeal 16S rRNA gene: fingerprinting based on T-RFLP and DGGE analyses with the aim of evaluating the structure of archaeal communities; and high-throughput sequencing (pyrosequencing) aiming to estimate the abundance and assess the archaeal community composition. From the results obtained by the molecular techniques T-RFLP and DGGE of the 16S rRNA gene, it was possible to observe differences in the archaeal community structure in charcoal fragments when compared to the adjacent soils. The phyla Crenarchaeota and Eurvarchaeota were detected in ADE samples, charcoal fragments and adjacent soil. The class *Thermoprotei* was the only one found in this study. This was the first study to investigate archaeal community diversity present in charcoal fragments from ADE using the pyrosequencing technology. However, the present results suggest the need of a deeper assessment, especially of isolation / cultivation of archaea, for a better understanding of the ecological and function role of these microorganisms with important focus on the biogeochemical cycles.

Key-words: Pyrogenic charcoal, Amazonian Dark Earth, Archaea, T-RFLP, DGGE, Pyrosequencing

3.1 INTRODUÇÃO

Estudos em ecologia microbiana têm focado na identificação e diversidade do domínio *Bacteria* (WOESE; KNDLER; WHEELIS, 1990). Recentemente atenção vem sendo dada à significância ecológica de membros do domínio *Archaea* (WOESE; KNDLER; WHEELIS, 1990). Isto, em parte, deve-se ao fato de poucos membros desse domínio terem sido isolados. Além disso, sua estrutura e diversidade em solos, assim como os fatores que regulam essa diversidade, são pouco compreendidas (BATES et al., 2011). Com o grande avanço das técnicas moleculares, representantes dessas comunidades têm sido encontrados em diversos ambientes como, por exemplo, fontes hidrotermais (EHRHARDT et al., 2007), águas marinhas (DeLONG, 1992), sedimentos hiper-salinos (DEMERGASSO et al., 2004) e em solos (OLINE; SCHMIDT; GRANT 2006). Como grande parte desses micro-organismos ainda não foi cultivado, pouco se pode inferir do papel e da importância dessas comunidades em ambientes do solo.

O Domínio *Archaea* é composto pelos filos: *Crenarchaeota, Euryarchaeota, Korarchaeota, Nanoarchaeota* e *Thaumarchaeota*. Membros do filo *Crenarchaeota* constituem uma grande porção dos organismos mesofilicos em ambientes terrestres (NICOL; SCHLEPER, 2006; AUGUET; BARBERAN; CASAMAYOR, 2009), sedimentos de água doce (RASTOGI et al., 2009) e em pântanos salgados (NELSON; MOIN; BERNHARD, 2009). Membros desse grupo foram identificados como portadores de genes codificando para amônia monoxigenase (TREUSCH et al., 2005), revelando que esse grupo tem uma grande importância no ciclo do N. Recentes estudos indicaram também que a estrutura das comunidades de *Archaea* podem ser influenciadas pelo pH do solo (NICOL et al., 2008) ou pela cobertura vegetal (ANGEL et al., 2009). Além disso, *Crenarchaeota* pode ter um importante papel no ciclo do C. Em estudo realizado com amostras de água do Mar do Norte, o metabolismo autotrófico dessas comunidades foi observado a partir da técnica de lipídeos biomarcadores com base no marcador ¹³C-bicarbonato (WUCHTER et al., 2003).

A aplicação do carvão em solos abandonados ou de uso agrícola vem sendo promovido como uma das opções para mitigação de sequestro de C (LEHMANN, 2007). A *International Biochar Initiative* estima que o carvão tem o potencial de fornecer 1 Gt de C por ano até o ano de 2040, ou de 3.67 Gt de CO₂ por ano com o uso de resíduos de

biomassa vegetal (INTERNATIONAL BIOCHAR INICIATIVE, 2008). O carvão pode servir como micro-habitat para a sobrevivência microbiana e proteção contra estresses abióticos (PIETIKAINEN, KIIKKILA; FRITZE, 2000). Baseado em sua composição química e estrutura física, o carvão possui propriedades biológicas favoráveis à diversidade das comunidades microbianas do solo (THIES; RILLING 2009). As áreas de Terra Preta de Índio (TPI) apresentam elevados teores de P, Ca, pH e baixa saturação por Al (LEHMANN et al., 2003). A estabilidade da matéria orgânica nessas áreas são superiores em até três vezes em relação aos solos adjacentes. Isso se deve provavelmente às características mineralógicas desses solos orgânicos, ou devido à presença de maior quantidade de carvão que pode chegar a 70 vezes mais em relação aos solos de origem, onde é rápida a decomposição da matéria orgânica devido às altas temperaturas, precipitações elevadas e deficiência de minerais estáveis em solos da região Amazônica (GLASER, 2007).

Dentre os filos de *Archaea* já encontrados em amostras de Terra Preta e em sedimentos de várzea da Amazônia, destacou-se a predominância do filo *Crenarchaeota* com representação de 65% e *Euryarchaeota* representando 35% (PAZINATO et al., 2010). Em estudos acessando os efeitos da aplicação de carvão em solos nas comunidades microbianas, Anderson et al., 2011 e Khodadad et al., 2011 observaram alterações na abundância relativa nessas comunidades, mostrando que a presença do carvão pode servir como um condicionador do solo agrícola, além de diminuir bactérias patogênicas às plantas.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar as comunidades de *Archaea* presentes em fragmentos de carvão segregados de TPI, em amostras TPI e amostras de solos adjacentes. Para isso, foram coletadas amostras de quatro diferentes sítios arqueológicos de TPI localizados na Amazônia Central. O acesso dessas comunidades foi baseada em três diferentes metodologias que avaliam o gene 16S rRNA de *Archaea*: *fingerprinting* baseado na análise de T-RFLP e DGGE, com o propósito de avaliar o perfil da estrutura das comunidades de *Archaea*; e sequenciamento em larga escala (pirosequenciamento) visando estimar a abundância e acessar a composição das comunidades de *Archaea*.

3.2 Desenvolvimento

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. As reações de amplificações para o pirosequenciamento foram realizadas no *Netherlands Institute of Ecology* (NIOO-KNAW), Wageningen/Holanda.

3.2.1.1 Áreas de estudo

As amostras analisadas neste estudo foram as mesmas utilizadas no Capítulo 2, como descrito anteriormente no item 2.2.1.1, coletadas em quatro sítios distintos na região central da Amazônia Central, situados próximos de Manaus-AM, sendo eles: Balbina, Barro Branco, Costa do Açutuba e Hatahara.

3.2.1.2 Amostragem dos solos

As amostras foram coletadas em pontos demarcados nos quatro sítios de Terra Preta de Índio, durante o período de 2008/2010, como 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.

3.2.1.3 Extração de DNA genômico dos solos e fragmentos de carvão pirogênico

A separação dos fragmentos de carvão para extração de DNA foi descrita anteriormente no item 2.2.1.3. O DNA genômico dos solos amostrados e dos fragmentos de carvão foram extraídos em triplicatas utilizando-se o *Kit Power Soil DNA ExtractionTM* (MoBio, Carlsbad, CA), como descrito no item 2.2.1.4. A verificação da qualidade do material extraído foi feita em gel de agarose a 1%.

3.2.1.4 Análise por T-RFLP do gene 16S rRNA de Archaea

• Amplificação do gene 16S rRNA de Archaea

A reação de amplificação do gene 16S rRNA de *Archaea* foi feita utilizando o seguinte conjunto de *primers*: 21F e 958R (Tabela 3.1). Para posterior detecção dos amplicons pela análise de T-RFLP em sequenciador automático, o *primer* 21F foi marcado com 6-carboxyfluorescein (6-FAM) na extremidade 5'. A amplificação foi feita em solução contendo: 10-20 ng/µl de DNA genômico do solo, 1 x tampão de PCR, 200 µM dNTPs, 2,0 mM de uma solução de 25 mM MgCl₂, 400 µg/ml BSA, 1,25 U de *Taq* polimerase, 100 ng de cada *primer* e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para um volume final de 25 µL. Empregou-se como controle positivo DNA de clone de biblioteca de *Archaea* (PAZINATO, 2007) e como controle negativo DNA de *E.coli* (ATCC 25922). A reação foi feita em termociclador nas seguintes condições: 5 min a 95°C para desnaturação inicial, seguida por 30 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 seg, anelamento a 55°C por 30 seg, extensão a 72°C por 1 min e extensão final por 10 min a 72°C. O produto amplificado foi verificado em gel de agarose 1%.

Tabela 3.1 Primers da região 16S rRNA de Archaea utilizados nas reações de PCR/T-RFLP

Primers	Sequências (5' - 3')	Fragmento (pb)	Referência
21F	TTCCGGTTGATCCYGCCGGA	~950	D. L. O. Y. L. 1000
958R	YCCGGCGTTGANTCCAATT	200	DeLONG et al., 1992

• Purificação das amostras amplificadas

Após a obtenção do produto da PCR foi feita a purificação dos fragmentos amplificados utilizando o *Kit QIAquick PCR Purification* (Qiagen), e seguiu-se o protocolo de acordo com as instruções do fabricante. Uma alíquota do material purificado foi quantificado em gel de agarose 1%. O produto purificado foi armazenado a -20°C até posterior utilização.

Digestão com enzimas de restrição

Os produtos de PCR purificados foram digeridos com a enzima de restrição *Hha*I. A mistura para digestão foi preparada para um volume final de 15 μ L contendo 40-60 ng do produto da PCR, 1X do tampão de reação da enzima (*Buffer* C (Promega) para *Hha*I), 5 U da enzima de restrição, e 0,01 μ g/ μ l de BSA (*Bovine Serum Albumine*). A digestão foi feita em termociclador (GeneAMP PCR *System* 9700 – *Applied Biosystems*) nas seguintes condições: 37°C por 3 horas e a 65°C por 10 min. para inativação da enzima.

Precipitação do produto digerido

O produto de PCR digerido foi precipitado em acetato de sódio/EDTA e etanol. Adicionou-se 2 μ L de solução acetato de sódio/EDTA e 60 μ L de etanol absoluto. O material foi agitado em vortex e centrifugado a 14.000 rpm, por 25 mimutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 150 μ L de etanol 70%. O material foi centrifugado a 14.000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 150 μ L de etanol min.

• Determinação dos fragmentos terminais de restrição

A determinação do comprimento dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFs) foi realizada no sequenciador capilar automático modelo ABI PRISM 3100 *Genetic Analyzer – Applied Biosystems*/HITACHI. Para a análise de fragmentos no sequenciador, o produto de digestão precipitado foi ressuspendido em Formamida *Hi-Di* e padrão de comprimento *GeneScan* 500 ROXTM (*Applied Biosystems*). As amostras ressuspendidas foram desnaturadas a 94°C por 5 min. e imediatamente incubadas no gelo por 3 min.

Análise dos dados de T-RFLP

Os arquivos gerados pelo programa *Data Collection* software do sequenciador, foram analisados no programa *Peak Scanner* 1.0 (*Applied Biosystems*) para determinação do comprimento dos fragmentos terminais de restrição através de comparação com os fragmentos do padrão de comprimento (TROTHA et al., 2002). Após a verificação da qualidade da corrida e dos comprimentos dos T-RFs, os dados foram então exportados para uma planilha eletrônica Excel (Microsoft) sendo convertidos em uma matriz onde

cada coluna representa uma amostra e cada linha representa um tamanho de T-RF específico, essa matriz foi utilizada para posterior análise multivariada. Para as amostras de *Archaea*, T-RFs menores que 25 pb e maiores que 800 pb foram eliminados de todos os dados. Os pseudos-T-RFs (falsos T-RFs) foram excluídos das análises (EGERT; FRIEDRICH, 2003). O processo de análise multivaridada foi o mesmo descrito no item 2.2.1.6.

3.2.1.5 Análise por DGGE do gene 16S rRNA de Archaea

• Amplificação do gene 16S rRNA de Archaea

Para a amplificação do gene 16S rRNA para o domínio *Archaea* em TPI, solos ADJ e em fragmentos de carvão, utilizou-se o seguinte conjunto de *primers*: 21F e 958R (Tabela 3.2). A amplificação foi feita em solução contendo: 10 ng de DNA; 5 pmol de cada *primer*; tampão para a reação PCR 1X; 0,2 mM de cada dNTP; 1,5 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen); 1,5 mM de MgCL₂ e água ultra pura estéril (Milli-Q) para volume final de 25 μL. Os ciclos utilizados foram: um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 5 min; 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s.; anelamento dos *primers* a 53°C por 30 s, e extensão a 72°C por 1 min; um ciclo de extensão final a 72°C por 10 min e manutenção a 4°C. O resultado das amplificações foi verificado em gel de agarose a 1%.

Os *amplicons* resultantes dessa amplificação foram utilizados como molde para uma nova amplificação realizada com o conjunto de *primers*: 340F-GC e 519R *Archaea* (Tabela 3.2). A amplificação foi feita em solução contendo: 10 ng do produto amplificado; 5 pmol de cada *primer*; tampão para a reação PCR 1X; 0,2 mM de cada dNTP; 1,5 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen); 1,5 mM de MgCL₂ e água ultra pura estéril (Milli-Q) para volume final de 25 μ L. A reação ocorreu no mesmo termociclador usado anteriormente, nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 min; 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s; anelamento dos *primers* a 56°C por 30 s, e extensão a 72°C por 1 min; um ciclo de extensão final a 72°C por 10 min e manutenção a 4°C. O resultado das amplificações foi verificado em gel de agarose a 1%.

Primers	Sequências (5' - 3')	Referência
21F	TTCCGGTTGATCCYGCCGGA	D. L. O.M.G. (1. 1000
958R	YCCGGCGTTGA(I/C)TCCAATT	DeLONG et al., 1992
340F-GC	gcCCCTACGGGG(C/T)GCA(G/C)CAG	°
519R	TTACCGCGGC(G/T)GCTG	ØVREAS et al., 1997

Tabela 3.2 Primers da região 16S rRNA de Archaea utilizados nas reações de PCR/DGGE

• Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE)

Os produtos amplificados foram separados por DGGE utilizando o sistema *Ingeny phor* U2 (Ingeny, Leiden, Holanda). Utilizou-se solução tampão 0,5 X de TAE (10 mM de Tris-acetato e 0,5 mM de EDTA, pH 8,0), solução desnaturante 80% (7 M de uréia e 40% de formamida) e solução 0% sem uréia e formamida. Os géis 8% foram preparados com gradiente desnaturante variando de 35% a 55% (ØVREÅS et al., 1997), a eletroforese foi feita a 60°C e 175 V constantes por 5 horas. Após a eletroforese, o gel foi corado com nitrato de prata (0,2%) e fotodocumentado em *ImageScanner* Modelo-PowerLook 1120 USG (Amersham Biosciences).

• Análise de DGGE

O *software* do *BioNumerics* versão 5.1 (Applied Maths NV, Bélgica) foi utilizado para analisar os perfis de DGGE. A ordenação baseada na similaridade entre as amostras de TPI, carvão e solo ADJ foi obtida pela análise em escala multidimensional *(multidimensional scaling, MDS)*. A análise foi realizada utilizando o coeficiente de similaridade de Bray-Curtis no programa PRIMER 6 (Playmouth Marine Laboratory, Primer E, Reino Unido). Posteriormente, uma análise de similaridade (ANOSIM) foi realizada para determinar diferenças entre as amostras estudadas utilizando o mesmo programa.

3.2.1.6 Pirosequenciamento

O processo de amplificação por PCR e purificação foi o mesmo descrito no Capítulo 2, no 2.2.1.7. As sequências foram extraídas do arquivo *Standard Flowgram Format* (SFF) usando o conversor de SFF na interface *Galaxy* (GOECKS; NEKRUTENKO; TAYLOR, 2010). As análises das sequências também foram realizadas com descrito no 2.2.1.7.

3.2.2 Resultados e Discussão

3.2.2.1 Propriedades químicas dos solos

A análise das propriedades químicas dos solos foram realizadas em áreas que apresentam horizonte A antrópico (TPI) e de seus respectivos solos adjacentes coletados em quatro sítios arqueológicos situados na Amazônia Central (Balbina, Barro Branco, Costa do Açutuba e Hatahara). Os diferentes sítios apresentam distintos sistemas de uso da terra, sendo caracterizados principalmente por agricultura de subsistência e cobertura vegetal em estágio de regeneração. Os resultados da análise das propriedades químicas das TPIs e dos solos ADJ encontram-se na Tabela 2.4. Os resultados e discussão das propriedades químicas dos solos estudados foram descritos no item 2.2.2.1.

3.2.2.2 Análise da estrutura da comunidade de Archaea por T-RFLP

Com base nos resultados de T-RFLP, análises de MDS foram feitas utilizando dados da estrutura das comunidades de *Archaea* para cada amostra estudada, tais como, TPI, fragmentos de carvão e solo ADJ dos diferentes sítios arqueológicos Balbina, Barro Branco, Costa do Açutuba e Hatahara. Os resultados obtidos a partir da técnica de T-RFLP, estão apresentados de forma comparativa considerando as diferenças encontradas nas estruturas de comunidades de *Archaea* presentes em solo ADJ em relação àquelas de TPI e fragmentos de carvão, separadamente.

Terra Preta de Índio vs. Solo Adjacente

Os perfis de T-RFLP foram comparados utilizando a abundância relativa dos fragmentos terminais de restrição (T-RFs) para as amostras de Terra Preta e solo adjacente dos sítios Balbina, Barro Branco, Costa do Açutuba e Hatahara. As análises de T-RFLP podem dar uma visão semi-quantitativa da comunidade por meio da abundância

97

relativa dos picos, os quais representam os membros de uma comunidade em reação de PCR (BRAKER et al., 2001; SESSITSCH et al., 2001).

Considerava-se que o Domínio *Archaea* era composto por micro-organismos que habitavam somente ambientes extremos (e.g. fontes termais). No entanto, desde que *Archaea* foi reconhecido como Domínio (WOESE; KNDLER; WHEELIS, 1990), estudos de diversidade desses micro-organismos vem crescendo e representantes dessa comunidade tem sido encontrados em vários ambientes como fontes hidrotermais (EHRHARDT et al., 2007), águas marinhas (DeLONG, 1992), sedimentos hiper-salinos (DEMERGASSO et al., 2004) e em solos (OLINE; SCHMIDT; GRANT, 2006), devido ao grande avanço das técnicas moleculares. No entanto, pouco se é conhecido sobre a diversidade destes micro-organismos em áreas de Terra Preta e em fragmentos de carvão.

A análise de agrupamento e ordenação MDS dos perfis de T-RFLP, mostrou que as comunidades de *Archaea* de Terra Preta e solo adjacente diferem em sua estrutura nos sítios Balbina, Barro Branco e Hatahara (Figura 3.1). Por outro lado, as amostras de Terra Preta não se diferenciaram das amostras dos solos adjacentes presentes no sítio Costa do Açutuba. A representação bidimensional da análise de MDS foi confirmada pelos níveis de *Stress* variando de 0 a 0,01 indicando uma boa validação dos resultados (Figura 3.1). Grossman et al. (2010) realizaram estudos de diversidade de comunidades de *Archaea* em TPI, utilizando a técnica de DGGE, e observaram diferenças nas comunidades de *Archaea* em menor número de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) do Domínio *Archaea* quando comparado com *Bacteria*. Borneman e Triplett (1997) realizaram estudos com amostras de solos de floresta e pastagem na região da Amazônia e observaram o predomínio *Bacteria* em 98% em relação a 2% do Domínio *Archaea*.



Figura 3.1 – Análise em escala multidimensional (MDS) baseada nos T-RFs discriminados para o gene 16S rRNA de *Archaea*. Sítios arqueológicos: (A) Balbina; (B) Barro Branco;
(C) Costa do Açutuba e (D) Hatahara, localizados na Amazônia (AM)

Complementando a representação gráfica obtida pela MDS, uma análise de similaridade (ANOSIM) foi realizada para determinar diferenças estatísticas entre as amostras estudadas (Tabela 3.3). Para *Archaea*, a análise de ANOSIM revelou diferenças significativas entre as amostras de Terra Preta e solos adjacentes dos sítios Balbina, Barro Branco e Hatahara confirmando resultados obtidos por Grossmann et al. (2010). No sítio Costa do Açutuba essa análise não mostrou nenhuma diferença significativa entre a Terra Preta e solo adjacente.

A análise de dissimilaridade de percentagens (SIMPER) foi utilizada para avaliar a diferença existente entre as estruturas das comunidades de *Archaea* em TPI e ADJ. A partir dos resultados apresentados na Tabela 3.3, o sítio Costa do Açutuba apresentou menor diferença entre as comunidades de *Archaea* em TPI quando comparado ao solo ADJ. Por outro lado, o sítio Barro Branco apresentou maior diferença entre as comunidades de *Archaea* entre TPI e ADJ (Tabela 3.3). Os sítios Balbina e Hatahara apresentaram diferenças acima de 64% na estrutura das comunidades de *Archaea* entre TPI e ADJ.

Tabela 3.3 – Índices de similaridade ANOSIM e dissimilaridade SIMPER obtidos pela técnica de T-RFLP considerando o Domínio *Archaea* em Terra Preta de Índio (TPI) e solos adjacentes (ADJ)

TPI vs. ADJ	ANOSIM	SIMPER
Balbina	1	64,77
Barro Branco	1	82,00
Costa do Açutuba	-0,037	37,02
Hatahara	1	79,64

ANOSIM testa a diferença entre amostras. Valores de "r" são expressos com P < 0,001. Valores > 0,75 são estatisticamente diferentes; > 0,5 possuem sobreposição, mas ainda são claramente diferentes; e < 0,5 não apresentam diferença estatística.

Carvão vs. Solo Adjacente

Baseado nos conjuntos de dados de carvão vs. solo adjacente dos sítios Balbina, Barro Branco, Costa do Açutuba e Hatahara foram feitas três análises, sendo elas: análise MDS dos perfis de T-RFLP; análise ANOSIM e análise SIMPER. Na análise MDS observou-se de uma maneira geral que a estrutura das comunidades de *Archaea* nos quatro sítios estudados foram distintas (Figura 3.2). Os níveis de *Stress* observados para cada sítio avaliados pela MDS foi 0 (Figura 3.2), indicando uma ótima representação bidimensional.



Figura 3.2 – Análise multivariada em escala multidimensional (MDS) dos perfís de T-RFLP do gene 16S rRNA de Archaea das amostras de fragmentos de carvão e solos adjacentes dos sítios: (A) Balbina; (B) Barro Branco; (C) Costa do Açutuba e (D) Hatahara, localizados na Amazônia (AM)

A análise ANOSIM revelou diferenças significativas entre as amostras de carvão *vs.* solos ADJ dos sítios Balbina, Barro Branco, Costa do Açutuba e Hatahara (Tabela 3.4). A análise SIMPER mostrou que o sítio Costa do Açutuba teve menor diferença entre as comunidades de *Archaea* de carvão e solo ADJ (Tabela 3.4). Por outro lado, o sítio Hatahara foi o que apresentou maior diferença entre as comunidades de *Archaea* em carvão e solo ADJ (Tabela 3.4). Os sítios Balbina e Barro Branco apresentaram diferenças acima de 74% na estrutura das comunidades de *Archaea* entre carvão e solo ADJ.

Carvão vs. solo adjacente	ANOSIM	SIMPER
Balbina	1	75,26
Barro Branco	1	74,82
Costa do Açutuba	1	23,67
Hatahara	1	88,47

Tabela 3.4 – Índices de similaridade ANOSIM e dissimilaridade SIMPER obtidos pela técnica de T-RFLP considerando o Domínio *Archaea* em carvão (CAR) e solos adjacentes (ADJ)

ANOSIM testa a diferença entre amostras. Valores de "r" são expressos com P < 0,001. Valores > 0,75 são estatisticamente diferentes; > 0,5 possuem sobreposição, mas ainda são claramente diferentes; e < 0,5 não apresentam diferença estatística.

3.2.2.3 Análise da estrutura da comunidade de Archaea por DGGE

Com base nos resultados de DGGE, análises de MDS foram realizadas com base na estrutura das comunidades de *Archaea* para as amostras TPI, fragmentos de carvão e solo ADJ dos diferentes sítios arqueológicos Balbina, Barro Branco, Costa do Açutuba e Hatahara.

Para as amostras avaliadas, a separação dos amplicons do gene 16S rRNA de *Archaea* obtidos por DGGE, revelou complexo padrão específico de bandeamento, indicando diferentes estruturas de comunidades de *Archaea* em cada sítio (Figura 3.3) confirmando os resultados apresentados anteriormente com a técnica de T-RFLP (Figura 3.3). A MDS baseia-se na representação gráfica das amostras comparando as distâncias entre elas com as suas respectivas dissimilaridade, e avaliando a relação entre essas medidas por meio da regressão linear. A confiabilidade da regressão é dada pelo seu nível de *stress*. A Figura 3.3 mostrou claramente a separação entre as amostras de TPI, carvão e solo ADJ para todos os sítios, apresentando níveis de stress de indicando ótima representação bidimensional.



Figura 3.3 – Análise de MDS dos perfis de DGGE discriminados para o gene 16S rRNA de Archaea. Sítios arqueológicos: (A) Balbina; (B) Barro Branco; (C) Costa do Açutuba e (D) Hatahara, localizados na Amazônia (AM)

Complementando a representação gráfica obtida pela MDS, análise de ANOSIM foi também utilizada com o objetivo de discriminar as amostras estudadas. Para *Archaea*, a ANOSIM revelou diferenças significativas entre Terra Preta, carvão e solo adjacente nos quatro sítios estudados, apresentado R global = 1.

A partir desses resultados, observou-se similaridade entre os resultados obtidos pelas técnicas de T-RFLP e DGGE confirmando diferenças na estrutura da comunidade de *Archaea* nas amostras de TPI, carvão e solo ADJ dos sítios Balbina, Barro Branco e Hatahara. Por outro lado, os resultados obtidos por T-RFLP e DGGE não foram similares entre a estrutura da comunidade de *Archaea* entre as amostras de TPI e solo ADJ do sítio Costa do Açutuba. Uma das possíveis justificativas para esse resultado seria a sensibilidade da técnica de T-RFLP em detectar maior número de UTOs (MOESENEDER et al., 1999) quando comparado com a técnica de DGGE.

Os resultados obtidos tanto pelas técnicas de T-RFLP quanto de DGGE mostraram que o carvão apresentou diferenças na estrutura das comunidades de *Archaea* quando comparado com os solos ADJ. Esses resultados foram similares aos apresentados para as comunidades de *Bacteria* (Figura 2.7). Yrjala et al. (2004) também observaram mudanças nas comunidades de *Archaea* em experimento de microcosmo com aplicação de cinzas em solos.

Ainda que alguns estudos tenham sido realizados a fim de compreender as diferenças nas comunidades microbianas em Terra Preta, que apresenta elevada quantidade de fragmentos de carvão, e em solos com aplicação de carvão (KIM et al., 2007; GROSSMAN et al., 2010; TAKETANI; TSAI, 2010; KHODADAD et al., 2011), este foi o primeiro estudo que acessou a comunidade de *Archaea* em fragmentos de carvão indicando a importância do carvão como habitat para micro-organismos (THIES; RILLIG, 2009).

3.2.2.4 Composição da comunidade de Archaea

O pirosequenciamento foi realizado em sequenciador automático *Genome* Sequencer FLX System (454 Life Sciences) com a plataforma GS FLX Titanium (Macrogen Inc. Company, Coréia do Sul) em triplicata para cada amostra estudada (TPI, ADJ e CAR) em quatro sítios arqueológicos (Balbina, Barro Branco, Costa do Açutuba e Hatahara), totalizando 36 amostras.

O número total de sequências obtidas da região V4 do gene 16S rRNA de *Archaea* das 36 amostras estudadas foi de 355,252. Essas sequências, posteriormente, foram filtradas utilizando-se como parâmetros a presença dos *primers forward* e *reverse* e dos *barcodes* usados em cada amostra, sendo o comprimento das sequências entre 200 e 350 pb.

O número total de sequências válidas das 36 amostras para o Domínio Archaea foi de 5837 (2,5% do total das sequências). Essas sequências foram agrupadas em UTO, considerando-se uma distância evolutiva de 0,03 (*cutoff* de 97%). A taxonomia das sequências foi atribuída com outras previamente depositadas no banco de dados de sequências do gene 16S rRNA do *Ribosomal Database Project* (RDP) II, utilizando a

ferramenta *Classifier*. Posteriormente, estimou-se a abundância relativa dos filos de *Archaea*, comparando o número de sequências classificadas de cada filo com o número total de sequências por amostra. Dessa maneira, os dados apresentados na Tabela 3.5 indicam a abundância relativa de cada filo encontrado nas amostras de TPI, fragmentos de carvão e solo ADJ.

Do total das sequências analisadas no RDP, *Archaea* não identificadas representaram de 8,4 a 93% das amostras analisadas. O resultado de abundância relativa da classificação das sequências encontra-se na Tabela 3.5. Estatisticamente as amostras de carvão dos sítios Balbina, Costa do Açutuba e Hatahara apresentaram elevados números de *Archaea* não identificadas, quando comparadas com as amostras de TPI e solo ADJ do mesmo sítio. A classificação das sequências das amostras de TPI, carvão e solo ADJ apresentaram um total de dois filos para o Domínio *Archaea*. É interessante observar a elevada abundância de *Archaea* não conhecidadas em CAR quando comparadas às TPIs e solos ADJ, independente do sítio estudado. Esse resultado indica a possível importância ecológica e funcional de *Archaea* no carvão que devem ser mais explorados em futuros estudos.

O Domínio Archaea é atualmente composto por cinco filos: Crenarchaeota, Euryarchaeota, Korarchaeota, Nanoarchaeota e Thaumarchaeota. Estes três últimos ainda não são bem definidos, enquanto a maioria das espécies descritas se enquadra nos dois primeiros filos. O filo Euryarchaeota é considerado o mais diverso fisiologicamente e inclui organismos metanogênicos, halofílicos, e termófilos. O filo Crenarchaeota é mais restrito, incluindo organismos termófilos extremos que metabolizam o enxofre liberado por fontes hidrotermais (SEKIGUCHI, 2006).

Dos quatro filos de *Archaea* já caracterizados, apenas dois, *Crenarchaeota* e *Euryarchaeota* foram detectados nas amostras de TPI, fragmentos de carvão e solo ADJ (Tabela 3.5). Amostras de solos ADJ dos sítios Balbina e Costa do Açutuba apresentaram maior dominância do filo *Crenarchaeota*, quando comparadas com amostras de TPI e carvão. Por outro lado, amostra de TPI do sítio Hatahara apresentou maior abundância relativa deste filo quando comparada com amostras de carvão e solo ADJ. Amostras de TPI, carvão e solo ADJ do sítio Barro Branco não apresentaram diferenças estatísticas.

Terra Preta de Índio						Car	rvão		Solo Adjacente					
Filos	Balbina	Barro	Costa	Hatahara	Balbina	Barro	Costa	Hatahara	Balbina	Barro	Costa	Hatahara		
		Branco	Açutuba			Branco	Açutuba			Branco	Açutuba			
Crenarchaeota	29,2±24b	6,6±2,4	86,3±7,9a	88,8±6,5a	23,6±7,1b	10,9±8,5	30,5±7,5b	6,5±1,3b	86,7±7,6a	44,0±25	69,8±15,4a	22,7±17,7		
Euryarchaeota	0,4±0,3	0,2±0,1	2,6±23	2,7±3,0	$0,8{\pm}0,8$	-	3,7±3,9	-	1,0±1,0	3,5±3,2	12,2±5,8	0,6±1,0		
Outros	70,4±24a	93,2±2,5	10,9±5,8b	8,4±3,5b	75,4±6,4a	89,0±8,5	65,7±3,6a	93,3±1,2a	12,2±6,7b	52,4±27	17,8±11,7b	76.6±17,4		

Tabela 3.5 – Média da abundância relativa dos Filos de Archaea classificados no Classifier (RDP)

Análises estatísticas foram realizadas separadamente para cada sítio. Valores nas colunas seguidos de diferentes letras são significativamente diferentes entre as amostras de cada sítio (ANOVA seguido de teste de Tukey, $P \le 0.05$).

Tabela 3.6 - Média da abundância relativa das Classes de Archaea classificadas no Classifier (RDP)

	Terra Preta de Índio				Carvão				Solo Adjacente			
Classes	Balbina	Barro	Costa	Hatahara	Balbina	Barro	Costa	Hatahara	Balbina	Barro	Costa	Hatahara
		Branco	Açutuba			Branco	Açutuba			Branco	Açutuba	
Thermoprotei	60,3±70	23,6±7,0	53,3±30	188,3±153	33±14	22,3±13	25,3±7,5	19,6±4,5	43,3±33,7	21±11,5	62±68	5,6±2,5

Análises estatísticas foram realizadas separadamente para cada sítio. Valores nas colunas seguidos de diferentes letras são significativamente diferentes entre as amostras de cada sítio (ANOVA seguido de teste de Tukey, $P \le 0.05$).

O filo *Crenarchaeota* foi o mais abundante nas amostras de TPI, carvão e solo ADJ. Bates et al. (2011), estudando a diversidade de *Archaea* em solos coletados em 146 diferentes locais, entre a América do Norte, América do Sul e Antártica também observaram a dominância do filo *Crenarchaeota* (90% do total das sequências). Pazinato et al. (2010) também encontraram dois filos de *Archaea* em amostras de TPI e sedimentos de várzea Amazônia, sendo eles *Crenarchaeota* e *Euryarchaeota*, representando 65% e 35% respectivamente confirmando os resultados encontrados nesse estudo. Além disso, a dominância do filo *Crenarchaeota* também foi detectada em outros ambientes terrestres, como em solos (AUGUET; BARBERAN; CASAMAYOR, 2009), sedimentos de água doce (RASTOGI et al., 2009), em pântanos salgados (NELSON; MOIN; BERNHARD, 2009) e em solos com aplicação de diferentes doses de cinzas (YRJALA et al., 2004).

É interessante mencionar que alguns micro-organismos pertencentes ao Domínio *Archaea* podem conter o gene que codifica para a subunidade da enzima monoxigenase de amônia (*amo*A). Recentes estudos têm revelado a existência da subunidade da enzima monoxigenase de amônia derivada de *Crenarchaeota* presentes em diferentes ambientes naturais (VENTER et al., 2004; CHEN, et al., 2008). A oxidação da amônia é o primeiro passo da nitrificação, um processo chave no ciclo global do nitrogênio que resulta na formação de nitrato através de atividade microbiana. Leininger et al. (2006) mostraram que as *Archaea* predominam entre os procariotos oxidadores de amônia em solos intemperizados e agrícolas. Recentemente, Taketani e Tsai (2010) estudaram a presença do gene *amo*A de comunidades de *Archaea* em diferentes sítios de TPI na Amazônia e seus respectivos solos ADJ. Os resultados indicaram uma alta similaridade entre as sequências *amo*A de TPI e dos solos ADJ.

Nas amostras TPI, carvão e solo ADJ, a classe *Thermoprotei*, pertencente ao filo *Crenarchaeota*, foi a única encontrada no presente estudo, não apresentando diferenças estatísticas entre as amostras (Tabela 3.6). Quase todos os micro-organismos isolados de *Crenarchaeota* são pertencentes à classe *Thermoprotei* que constituem organismos acidofílicos e termofílicos (REYSENBACH, 2001). Siboni et al. (2008) estudando *Archaea* em amostras marinhas, associadas à corais, encontraram uma grande quantidade de membros da classe *Thermoprotei*, constituindo a maioria dos clones de *Crenarchaeota*. Essa classe também foi encontrada em solos de várzea da Amazônia (PAZINATO et al., 2010).
O filo *Euryarchaeota* compreende um grupo diversificado filogeneticamente e inclui os organismos halofíticos, termofílicos e metanogênicos (PESARO; WIDMER, 2002; HUANG et al., 2003). Um dos grupos mais estudados do filo *Euryarchaeota* são os metanogênicos. Esses microrganismos são fundamentais na degradação anaeróbica de restos orgânicos com produção final de metano, um gás importante no aquecimento global, mas também com possível utilização como combustível não fóssil (LUTON et al., 2002). O filo *Euryarchaeota* foi pouco representativo nas amostras de TPI, fragmentos de carvão e nos solos ADJ, variando de 0,2 a 12% do total da abundância relativa da comunidade de *Archaea*. Segundo Bates et al. (2011), sequências do filo *Euryarchaeota* representaram apenas 1,5% de todas as sequências da comunidade de *Archaea* em solos de diferentes localidades. A grande diversidade e abundância desses grupos de *Archaea* podem estar presentes nas amostras de TPI, fragmentos de carvão e solo ADJ, mas estes não puderam ser detectados com os métodos empregados neste estudo.

O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para verificar as possíveis correlações entre as variáveis microbianas e químicas do solo, utilizando o programa Statistica. No entanto, os resultados deste estudo não apresentaram correlações com as propriedades químicas do solo (dados não apresentados). Recentes estudos indicaram que a estrutura das comunidades de *Archaea* podem ser influenciadas pelo pH do solo (NICOL et al., 2008) ou pela cobertura vegetal (ANGEL et al., 2009). Nielsen et al. (2010) e Bates et al. (2011), indicaram correlação altamente significativa entre as comunidades de *Archaea* e a relação C/N. Nas TPI, a matéria orgânica consiste de aproximadamente 35% de C orgânico quando comparado aos solos ADJ que apresenta cerca de 14% (GLASER et al., 2001). A adição de carvão em solos de floresta tem influenciado a transformação de nutrientes do solo como, por exemplo, o N (DeLUCA et al., 2006). Considerando-se que a relação C/N não foi avaliada no presente estudo, é possível que a comunidade de *Archaea* tenha uma importância ecológica e funcional nas TPIs ou em fragmentos de carvão, merecendo estudos futuros.

3.3 Conclusões

A partir dos resultados obtidos pelas técnicas moleculares de T-RFLP e DGGE do gene 16S rRNA, foi possível observar diferenças na estrutura das comunidades de

Archaea em fragmentos de carvão quando comparado com os solos adjacentes. Os filos *Crenarchaeota* e *Euryarchaeota* foram detectados nas amostras de Terra Preta, fragmentos de carvão e solo adjacente, indicando dominância do filo *Crenarchaeota*. A classe *Thermoprotei* foi a única classe encontrada no presente estudo. Este foi o primeiro trabalho que estudou a diversidade da comunidade de *Archaea* presente em fragmentos de carvão provenientes da Terra Preta de Índio, utilizando método de sequenciamento em larga escala - pirosequenciamento. No entanto, os resultados sugerem que é necessário um esforço maior, principalmente de isolamento/cultivo de *Archaea*, para melhor compreensão do papel ecológico e funcional desses micro-organismos com importante enfoque nos ciclos biogeoquímicos.

Referências

ANDERSON, C.R.; CONDRON, T.M.; CLOUGH, T.J.; FRIERS, M.; STEWART, A.; HILL, R.A.; SHERLOCK, R.R. Biochar induced soil microbial community change: implications for biogeochemical cycling of carbon, nitrogen and phosphorus. **Pedobiologia**, Jena, v. 54, p. 309–320, 2011.

ANGEL, R.; SOARES, M.I.M.; UNGAR, E.D.; GILLOR, O. Biogeography of soil archaea and bacteria along a steep precipitation gradient. **The ISME Journal**, New York, v. 4, p. 553–563, 2009.

AUGUET, J.C.; BARBERAN, A.; CASAMAYOR, E.O. Global ecological patterns in uncultured archaea. **The ISME Journal**, New York, v. 4, p. 182–190, 2009.

BATES, S.T.; BERG-LYONS, D.; CAPORASO, J.G.; WALTERS, W.A.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. **The ISME Journal**, New York, v. 5, p. 908–917, 2011.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E.W. Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 2647-2653, 1997.

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.

BRAKER, G.; AYALA-DEL-RIO, H.L.; DEVOL, A.H.; FESEFELDT, A.; TIEDJE, J.M. Community structure of denitrifiers, *Bacteria* and *Archaea* along redox gradients in Pacific Northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nirS*) and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, p. 1893-1901, 2001.

CHEN, X.P.; ZHU, Y.G.; XIA, Y.; SHEN, J.P.; HE, J.Z. Ammonia-oxidizing archaea: important players in paddy rhizosphere soil? **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 10, n. 8, p. 1978-1987, 2008.

DeLONG, E.F. Archaea in coastal marine environments. **Proceedings of the National** Academy of Science of the USA, Washington, DC, v. 89, p. 5685-5689, 1992.

DeLUCA, T.H.; SALA, A. Frequent fire alters nitrogen transformations in ponderosa pine stands of the inland northwest. **Ecology**, Brooklyn, v. 87, p. 2511–2522, 2006.

DEMERGASSO, C.; CASAMAYOR, E.O.; CHONG, G.; GALLEGUILLOS, P.; ESCUDERO, L.; PEDROS-ALIO, C. Distribution of prokaryotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, Northern Chile. **FEMS Microbiological Ecology**, Amsterdam, v. 48, p. 57–69, 2004.

EGERT, M.; FRIEDRICH, M.W. Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 2555–2562, 2003.

EHRHARDT, C.J.; HAYMON, R.M.; LAMONTAGNE, M.G.; HOLDEN, P.A. Evidence for hydrothermal archaea within the basaltic flanks of the East Pacific rise. Environ Microbiol 9: 900–912. DeLong EF. (1992). Archaea in coastal marine environments. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 89, p. 5685–5689, 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. Prehistorically modified soils of central Amazonia: a model for sustainable agriculture in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, London, v. 362, p. 187–196, 2007.

GOECKS, J.; NEKRUTENKO, A.; TAYLOR, J. (2010). Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. **Genome Biology**, London, v. 11, n. 8, R86, 2010.

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**, New York, v. 60, p. 192–205, 2010.

HUANG, L.N.; CHEN, Y.Q.; ZHOU, H.; LUO, S.; LAN, C.Y. Characterization of methanogenic Archaea in the leachate of a closed municipal solid waste landfill. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 46, p. 171-177, 2003.

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.

KHODADAD, C.L.M.; ZIMMERMAN, A.R.; GREEN, S.J.; UTHANDI, S.; FOSTER, J.S. Taxa-specific changes in soil microbial community composition induced by pyrogenic carbon amendments. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 43, p. 385-392, 2011.

INTERNATIONAL BIOCHAR INITIATIVE. **How much C can biochar systems offset-and when?** Westerville, OH: International Biochar Initiative, 2008. Disponível em: http://www.biochar-international.org/images/final-carbon.pdf.

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

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.

LEHMANN, J. Bio-energy in the black. Frontiers in Ecology and Environment, Washington, DC, v. 5, p. 381-387, 2007.

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

MOESENEDER, M.M.; ARRIETA, J.M.; MUYZER, G.; WINTER, C.; HERNDL, G.J. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 3518-3525, 1999.

NELSON, K.A.; MOIN, N.S.; BERNHARD, A.E. Archaeal diversity and the prevalence of Crenarchaeota in Salt Marsh Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 75, n. 12, p. 4211-4215, 2009.

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

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

NIELSEN, U.N.; OSLER, G.H.R.; CAMPBELL, C.D.; BURSLEM, D.F.R.P.; VAN DER WAL, R. The influence of vegetation type, soil properties and precipitation on the composition of soil mite and microbial communities at the landscape scale. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 37, p. 1317–1328, 2010.

OLINE, D.K.; SCHMIDT, S.K.; GRANT, M.C. Biogeography and landscape-scale diversity of the dominant Crenarchaeota of soil. **Microbial Ecology**, New York, v. 52, p. 480–490, 2006.

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

PAZINATO, J.M. Isolamento e identificação de microrganismos metanogênicos em solos de Terra Preta Antropogênica (TPA) e de várzea (Gleissolos) da Amazônia Oriental. 2007. 187 p. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) - Escola Superior de

Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

PAZINATO, J.M.; PAULO, E.N.; MENDES, L.W.; VAZOLLER, R.F.; TSAI, S.M. Molecular characterization of the archaeal community in an Amazonian wetland soil and culture-dependent isolation of methanogenic archaea. **Diversity**, Bethesda, v. 2, p. 1026-1047, 2010.

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

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.

RASTOGI, G.; SANI, R.K.; PEYTON, B.M.; MOBERLY, J.G.; GINN, T.R. Molecular studies on the microbial diversity associated with mining-impacted Coeur d'Alene river sediments. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, n. 1, p. 129-139, 2009.

REYSENBACH, A.L. Class I. Thermoprotei class. nov. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W.; GARRITY, G.M. Bergey's manual of systematic bacteriology. New York: Springer, 2001. p. 169-210.

SEKIGUCHI, H. Yet-to-be cultured microorganisms relevant to methne fermentation process. **Microbes and Environments**, Kyoto, v. 21, n. 1, p. 1-15, 2006.

SESSITSCH, A.; WEILHARTER, A.; GERZABEK, M.H.; KIRCHMANN, H.; KANDELER, E. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, p. 4215-4224, 2001.

SIBONI, N.; BEN-DOV, E.; SIVAN, A.; KUSHMARO, A. Global distribution and diversity of coral-associated *Archaea* and their possible role in the coral holobiont nitrogen cycle. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 10, p. 2979-2990, 2008.

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**, New York, v. 59, p. 734-743, 2010.

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

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

TROTHA, R.; REICHL. U.; THIES, F. L.; SPERLING, D.; KÖNIG, W.; KÖNIG, B. Adaption of a fragment analysis technique to an automated high-throughput multicapillary electrophoresis device for the precise qualitative and quantitative characterization of microbial communities. **Electrophoresis**, Wheiwheim, v. 23, p. 1070-1079, 2002.

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

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

WUCHTER, C.; SCHOUTEN, S.; BOSCHKER, H.T.S.; SINNINGHE-DAMSTÉ, J.S. Biocarbonete uptake by marine Crenarchaeota. **FEMS Microbiological Letters**, Amsterdam, v. 219, p. 203-207, 2003.

YRJALA, K.; KATAINEN, R.; JURGENS, G.; SAARELA, U.; SAANO, A.; ROMANTSCHUK, M.; FRITZE, H. Wood ash fertilization alters the forest humus Archaea community. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 199–201, 2004.

ANEXO



Article

A Molecular Survey of the Diversity of Microbial Communities in Different Amazonian Agricultural Model Systems

Acácio A. Navarrete[†], Fabiana S. Cannavan[†], Rodrigo G. Taketani and Siu M. Tsai *

Cell and Molecular Biology Laboratory, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Av. Centenário-303, CEP. 13.416-000, Piracicaba, SP, Brazil; E-Mails: navarrete@cena.usp.br (A.A.N.); cannavan@cena.usp.br (F.S.C.); rgtaketani@cena.usp.br (R.G.T.)

- [†] These authors share first authorship.
- * Author to whom correspondence should be addressed; E-mail: tsai@cena.usp.br; Tel.: +1-55-19-429-4600 Fax: +1-55-19-429-4610.

Received: 26 March 2010; in revised form: 11 May 2010 / Accepted: 12 May 2010 / Published: 19 May 2010

Abstract: The processes of land conversion and agricultural intensification are a significant cause of biodiversity loss, with consequent negative effects both on the environment and the sustainability of food production. The anthrosols associated with pre-Colombian settlements in the Amazonian region are examples of how anthropogenic activities may sustain the native populations against harsh tropical environments for human establishment, even without a previous intentionality of anthropic soil formation. In a case study (Model I---"Slash-and-Burn") the community structures detected by automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) revealed that soil archaeal, bacterial and fungal communities are heterogeneous and each capable of responding differently to environmental characteristics. ARISA data evidenced considerable difference in structure existing between microbial communities in forest and agricultural soils. In a second study (Model II-"Anthropogenic Soil"), the bacterial community structures revealed by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) differed among an Amazonian Dark Earth (ADE), black carbon (BC) and its adjacent non-anthropogenic oxisoil. The bacterial 16S rRNA gene (OTU) richness estimated by pyrosequencing was higher in ADE than BC. The most abundant bacterial phyla in ADE soils and BC were Proteobacteria-24% ADE, 15% BC; Acidobacteria—10% ADE, 21% BC; Actinobacteria—7% ADE, 12% BC; Verrucomicrobia, 8% ADE; 9% BC; Firmicutes-3% ADE, 8% BC. Overall, unclassified bacteria corresponded to 36% ADE, and 26% BC. Regardless of current land uses, our data suggest that soil microbial community structures may be strongly influenced by the historical soil management and that anthrosols in Amazonia, of anthropogenic origins, in addition to their capacity of enhancing crop yields, may also improve microbial diversity, with the support of the black carbon, which may sustain a particular and unique habitat for the microbes.

Keywords: microbial diversity; slash-and-burn agriculture; land use systems; Amazonian Dark Earth; Terra Preta de Índio; black carbon

1. Introduction

The Brazilian Amazon represents half of the world's rainforest and is home to one-third of the Earth's species, yet the Amazon has one of the highest rates of deforestation due to anthropogenic activities and dramatic changes in land use [1]. Agriculture is one of the largest and most dynamic parts of the Brazilian economy, and those working to preserve the Amazonia biome are unlikely to be able to slow or stop the expansion of this sector. In this post-genomic era, the application of advanced technologies to solve agricultural issues while maintaining environmental quality is of great importance, as the Brazilian economy relies, to a high degree, on crop and food production. Sustainability is one of the main issues that must be considered to develop adequate land use in order to achieve a more sustainable production scheme, particularly under tropical conditions, which are especially conducive to degradation.

Although slash-and-burn agriculture remains a dominant system of food production in the humid and subhumid tropics, it has also become a major cause of deforestation and land degradation [2-4]. Ideally, slash-and-burn agriculture is ecologically stable where there is a very low density of human population. However, such practice rarely exists today except in some remote regions of the Amazon and Congo basins. In a greater part of the humid and subhumid tropics, the fallow period has been reduced and areas cleared for cultivation have become larger. These modifications have led to an eventual breakdown of the slash-and-burn system in the long run because loss of mineral nutrients during the cultivation phase (*i.e.*, through runoff, erosion, leaching, and crop removal) can no longer be restored by short periods of bush fallow [5]. Mosaic landscapes from Western Amazon present systems based on slash-and-burn agriculture. In this region, agricultural systems of indigenous people based primarily on annual crops in shifting cultivation and long fallow, which involves the abandonment of areas coverage with annual cultivation allowing natural regeneration and fallow for approximately three years [6].

Amazonian Dark Earths (ADE) or *Terra Preta de Índio* of prehistoric origin are differentiated from surrounding soils by their darker color, higher organic matter content, higher pH, greater total phosphorus (P) content, greater exchangeable calcium (Ca) and magnesium (Mg), and increased minor element concentrations [7]. These soils are found in the Amazonian region and are considered as a model soil when compared with the surrounding and background soils. The importance of this soil for agricultural purposes has been discussed thoroughly by soil scientists, archaeologists, geographers, agronomists and anthropologists in 2006, and they all agree that ADE soils were built up by the river basin's original human residents and are much more numerous than formerly appreciated [8]. The

carbon content in ADE is elevated in comparison with plain soil from nearby locations [9]. The wisdom in building fertile soils under harsh tropical conditions, and maintaining its fertility over centuries, is now considered a wonder that was engineered by pre-Colombian cultures via the addition of pottery shreds, concentrated organic waste, charred biomass, fish bones, shells, various household waste and plant residues.

Molecular methods were used to study the microbial diversity of two agricultural model systems found in Amazonian soils: the slash-and-burn system and the anthrosols. We first characterized the operational taxonomic unit (OTU) richness and the structure of archaeal, bacterial and fungal communities in soils under primary forest, secondary forest, slash-and-burn agriculture and pasture. In the second study, bacterial community from the anthrosols and black carbon were characterized and compared to microbial groups from the neighboring non-anthropogenic soils. These studies used modern genomic approaches in order to assess soil microbial communities in Amazonian ecosystems.

2. Material and Methods

Soil was sampled in two Amazonian regions. In the Western Amazon (Model I), samples were taken from areas of undisturbed primary forest, subsistence farms, pastures and secondary forests where slash-and-burn is the main type of agriculture. In the Central Amazon (Model II), samples were taken of anthrosols, also known as *Terra Preta de Indio*, which are the result of pre-Columbian settlement and are used for sustainable agriculture.

2.1. Model I: The "Slash-and-Burn" System in Western Amazonia

2.1.1. Study sites and soil sampling

Soil samples were collected from areas located between the geographical coordinates 4°21' and 4°26' S and 69°36' and 70°1' W, in the Benjamin Constant municipality and along the Solimões River (Figure 1). The predominant soil class in the studied sites was Inceptisols, but Gleysols and Alisols were also found [10]. The rate of deforestation in this region is quite low, partially due to poor accessibility and the low population density of the region. The native communities use the land for slash-and-burn agriculture; however, some pasture areas are also present as a consequence of governmental polices implemented during the 1970s. Additives, fertilizers or pesticides have not been applied to any of the land-use systems in these studied soils [6].

Twelve soil samples with three replicates each were collected in March 2008 and January 2009, during periods of more intense precipitation than usual in areas of primary forest, local traditional crops, pasture and secondary forest (20–30 years old) using standardized procedures. All sites were originally highland forest. Traditional crops such as cassava, banana, maize, sugarcane and pineapple are grown for the subsistence of native populations. Each soil sample was collected at a depth of 0–20 cm under the litter layer, which was removed prior to sampling, and was submitted to chemical, physical and molecular microbial analyses.

2.1.2. DNA extraction and ARISA fingerprinting

Archaeal, bacterial and fungal communities in the different soils were analyzed using polymerase chain reaction (PCR) and automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA). DNA was extracted from 0.25 g (total humid weight) of soil using the Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The DNA extraction was performed in triplicate for each soil sample. The quality and relative quantity of the extracted DNA was determined using a Thermo Scientific NanoDrop 2000. Dilutions of the DNA samples were necessary to eliminate inhibition of PCR by humic acid, as previously described [11].

The archaeal, bacterial and fungal ribosomal intergenic regions (16S–23S for *Archaea* and *Bacteria* and 18S–28S for *Fungi*) were amplified with the primers 915f-FAM and 71r [12], 1490-72f-FAM and LSU21-38r [13] and 2234Cf-FAM and 3126Tr [14], respectively. The forward primer was labeled with 6-FAM (6-carboxifluorescein) at the 5' end. The PCR mixture (25 μ L) contained 10 ng of template DNA, 2.5 μ L 10× reaction buffer (Invitrogen, Carlsbad, Calif.), 3.0 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP (Eppendorf, Germany), 0.25 mM of each forward (f) and reverse (r) primer (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) and 1.0 U of Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Cycling was performed as described in the references for the primers using a GeneAmp PCR System 9700 Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Triplicate PCR products from the soil samples were analyzed using gel electrophoresis and purified using the Qiagen PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). The ARISA-PCR fragments were separated by capillary electrophoresis on ABI Prism 3100 Genetic Analyzer using the size standards GeneScan 120 LIZ (Applied Biosystems), GeneScan 500 ROX (Applied Biosystems) and MegaBACE ET900 (GE Healthcare) for *Archaea*, *Bacteria* and *Fungi*, respectively.

2.1.3. ARISA Data Analysis

The ARISA profiles were analyzed using the PeakScanner 1.0 software program (Applied Biosystems). To include the maximum number of peaks while excluding background fluorescence, a threshold of 50 fluorescent units was applied for the archaeal, bacterial and fungal data. The software converted the fluorescence data into electropherograms; the peaks represent fragments of different sizes, and the peak areas represent the relative proportion of these fragments. The number of peaks in each electropherogram was interpreted as the OTU richness in the community.

To investigate which soil attributes best explained the variability in ARISA profiles, a Non-metric multidimensional scaling (NMDS) was performed in Canoco 4.5 (Biometrics, Wageningen) with Hellinger transformed data [15]. This multivariate analysis was supplemented with environmental data. Five soil attributes were included in this analysis—pH, organic matter (OM), Fe, K, and P. Analysis of similarities (ANOSIM) was performed with the Primer5 5.2.6 (Plymouth Marine Laboratory, Primer-E) software program.

2.2. Model II: The Amazonian Dark Earth and Sustainable Agriculture in the Central Amazon

2.2.1. Soil sample collection

Soil samples were collected from the Hatahara site, a well-documented anthrosol characterized as Amazonian Dark Earth (ADE). Another set of non-anthropogenic soil samples were collected at vicinity (ADJ). Three different points (10 m apart) were sampled at each site. Samples were immediately frozen and kept at -20.0 °C until their use. Hatahara is located within the Amazon basin near Iranduba-Manaus, Brazil (ADE soil 03°16'28.45"S; 60°12'17.14"W and ADJ soil 03°16'24.43"S; 60°11'58.74"W), and the soil in this site has been dated to be between 300 B.C. (first human occupation) and 1200 A.C. This site includes one of the most archaeological sites studied by archaeologists and geologists to the characterization of ADE. Therefore, the sampling area has not been disturbed for more than 10 years.

The natural vegetation of these regions is described as tropical lowland rainforest. At Hatahara site, the samples were collected from soil under passion fruit cultivation; Lithic fragments and ceramic artifacts were present in soils, indicating pre-Columbian occupation. The soil characteristics that were consistently different between the adjacent and anthropic soils were the black carbon (BC) content, the dark color and the presence of ceramic fragments in the anthrosols. The influence of BC on the soil microbial community was also investigated. Soil samples were taken with a sterilized plastic tube 5 cm diameter and 10 cm length at a 0–20 cm depth discarding the overlaying litter.

2.2.2. DNA Extraction and PCR amplification to T-RFLP analysis

The same protocol used for DNA extraction from the Western Amazonian soils was followed for DNA extraction from the ADE and ADJ soils and the separated BC. The BC separation was carefully performed under sterile conditions at 4 °C, using a magnifier to facilitate screening of the black carbon from the soil. Whole community DNA was extracted from three replicate sub-samples. Total DNA was extracted from 0.25 g (fresh weight) of each sample using the Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories), according to the manufacturer's instructions. Reactions were performed in triplicate for each soil sample. The quality and relative quantity of the extracted DNA was determined by using a Thermo Scientific NanoDrop 2000.

For the Terminal Restriction Length Polymorphism (T-RFLP) analysis, the bacterial 16S rRNA gene was amplified with the primers 27F (5'end labeled with FAM fluorescent dye) and 1492R [16,17]. The PCR mixture (25 μ L) contained 10 ng of template DNA, 2.5 μ L 10× reaction buffer (Invitrogen, Carlsbad, Calif.), 3.0 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP (Eppendorf, Germany), 0.25 mM of each forward (f) and reverse (r) primer (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) and 1.0 U of Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Cycling was performed as follows: 3 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 59 °C for 45 s, 72 °C for 1 min, and a final extension step at 72 °C for 15 min, using a GeneAmp PCR System 9700 Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Triplicate PCR products for soil samples were analyzed by gel electrophoresis and purified with the Qiagen PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). PCR products (60 ng) were digested with the enzymes *MspI* and *HhaI* (Invitrogen, USA) in 20 µL separate reactions, at 37 °C for 3 h. The DNA

was precipitated using isopropanol [18]. The DNA pellets were resuspended in 9.8 μ L de deionized formamide and 0.2 μ L of GeneScan-500 ROX internal size standard (Applied Biosystems, USA) and denatured at 94 °C for 5 min and immediately transferred onto ice. Fragments were analyzed in an ABI 3100 automated sequencer (Applied Biosystems) following manufacturer's instructions.

The size and intensity of each T-RF (hereafter called phylotype) was estimated using Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems). The peaks represent fragments of different sizes, and the peak areas represent the relative proportion of these fragments. The number of peaks in each electropherogram was interpreted as the OTU richness in the community. A redundancy analysis (RDA) was performed with the package vegan BiodiversityR [19] for the program R [20] with Hellinger transformed data. RDA is an ordination technique that seeks the most prominent linear gradients in multivariate data sets, under the constraint that the gradients are linear combinations of a set of explanatory variables. Two soil attributes were included in this analysis after stepwise selection (inflation factor <10)—organic matter (OM) and P.

2.2.3. Pyrosequencing of the 16S rRNA gene isolated from ADE and black carbon

Sequencing of the ADE and BC from Hatahara was performed using the Genome Sequencer FLX System (454 Life Sciences, Bradford, CT, USA) at the Center for Microbial Ecology, Michigan State University. The primers that were used targeted the V4 region of the 16S rRNA gene (http://pyro.cme.msu.edu/). PCR reactions contained 0.015 U/ μ L Taq DNA polymerase, 1× reaction buffer, 1.8 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.2 μ M of each primer (Integrated DNA Technology), 1.5× BSA, 4 ng/ μ L of template and 1 unit of FastStart High Fidelity PCR System enzyme blend (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). The following cycle parameters were used: initial denaturation for 3 min at 95 °C; 30 cycles of 45 s at 95 °C, 45 s at 57 °C and 1 min at 72 °C; and final extension for 4 min at 72 °C. The PCR products were separated by gel electrophoresis, and fragments with size in the range of 270–300 bp were excised and extracted by using the Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA). Further purification was performed with the Qiagen PCR Purification Kit (Qiagen). Sequencing was performed by using a GS FLX sequencer (454 Life Sciences) at the Michigan State University Research Technology Support Facility. Sequences were analyzed using the RDP pipeline [21,22]. A rarefaction curve was generated by using MOTHUR [23] to estimate OTU richness (cut-off 0.03).

3. Results and Discussion

3.1. Model I of Amazonian Agricultural System: The "Slash-and-Burn" System in Western Amazonia

This survey was undertaken in a region of Western Amazonia in the basin of Alto Solimões. The territory is similar to the land of the indigenous people who established their subsistence agriculture. Soil samples were collected over a two-year sampling in areas characterized by tropical rainforest, semi-permanent manioc cultivation with slash-and-burn agricultural management, pasture and forested areas at advanced stages of regeneration. The archaeal, bacterial and fungal communities were analyzed by ARISA, and their OTU richness was represented graphically in Figure 1.

Diversity 2009, 2

Figure 1. Operational taxonomic unit richness based on intergenic spacer region length polymorphisms of the rRNA gene detected using automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA). The maps show the four sampling windows located in an Amazonian landscape (Benjamin Constant municipality, Amazonas State, Brazil, along the Solimões River). The colors represent different land use systems: primary forest (\blacksquare), secondary forest (\blacksquare), crops (\blacksquare), pasture (\blacksquare), water (\blacksquare) and exposed soil (\square). Soil samples were collected at different points (*), at a depth of 0–20 cm from sites representing primary tropical rain forest, traditional crops systems of the indigenous people, pasture and secondary forest over a two-year sampling (March 2008 and January 2009). The richness values were calculated based on triplicate PCR products from the soil samples.



Based on ARISA data, differences in archaeal, bacterial and fungal OTU richness were observed in the March 2008 and January 2009 samples. In 2008 sampling, the archaeal OTU richness was higher in pasture soil (8.0) followed by lower richness in secondary forest soil (7.22), crop soil (5.0) and primary forest soil (3.89). In 2009 sampling, lower archaeal richness was found in crop soil (15.89), in comparison with secondary forest (14.44), pasture (9.78) and primary forest (7.11) soils. In the two-years sampling less archaeal richness in primary forest soil was found. Although there are some reports addressing the archaeal diversity in tropical climatic zones [24-26], the understanding of these communities and their roles in ecosystems is incipient. Our study represents the initial effort to understand the archaeal communities present in tropical soils under different land use systems.

Soil bacterial OTU richness was higher in pasture in the two-years sampling (27.22 and 39.78, respectively) and less in primary forest soil (19.0 and 22.0, respectively). In crop, soil bacterial OTU richness was found similar to that of secondary forest. A previous study examining the same sampling areas from the Western Amazon [27] reported similarity between the primary and secondary forest bacterial communities, suggesting that the bacterial community structure recovered during forest regeneration.

Studies on fungal diversity in tropical soils have concluded that the cultivation soil can alter the abundance of some members of the soil fungal community [28-30]. However, soil fungal communities have recovered relatively quickly after fallow [31]. These investigations showed that the impact of deforestation and slash-and-burn in the soil fungal community is more quantitative than qualitative. In our study, the fungal OTU richness was higher in primary forest soil in two-years sampling in comparison with secondary forest, crops and pasture. In crops and pasture, the soil fungal communities presented a higher richness than secondary forest soil.

Although total richness levels are difficult to estimate with a high degree of confidence, the estimated fungal OTU number by ARISA technique appears to rival or exceed the number of archaeal and bacterial OTUs in each of the collected soils. A possible explanation for the fungal OTU number detected by ARISA technique is the higher variation in the 18S–28S rRNA intergenic spacer region in eukaryotes [32] which must have led to this apparent higher diversity of the fungi. Archaeal and bacterial OTU richness detected by ARISA were higher in soil samples collected in January 2009, whereas, for fungi, it was higher in the soil samples collected in March 2008.

No significant differences were noted between land use systems for soil attributes (p < 0.05) in the two-years sampling in the Benjamin Constant municipality (Table 1). The soil pH in the forests was lower than at sites under slash-and-burn agricultural management or pasture. The organic matter (OM) content in soil from the semi-permanent manioc cultivation sites and secondary forests was higher than in soil samples from primary forest or pasture sites. The soils presented 17–38% sand, 36–53% silt and 25–35% clay at all sites. The deforestation of tropical forests alters many soil properties. Previous studies have shown that conversion to pasture causes an increase in pH and soil bulk density as well as a decrease in soil porosity [33-35]. As seen in Table 1, the Amazonian soils also have undergone a similar transformation. In slash-and-burn agriculture, soil attributes change as a consequence of ash deposition from the burned vegetation and increased rates of organic matter decomposition [5]. Over time, however, nutrients are depleted, and these attributes tend to return to their previous state.

Soil phosphorous showed discrepant values in soil samples collected in March 2008 and January 2009. Agricultural management can affect soil organic matter chemistry and microbial community

structure, but the relationship between the two is not well understood [36]. The origin and mineralization processes of soil organic P are less well understood [37]. *Fungi* tend to contain a significant proportion of their total P content in inorganic forms, *i.e.*, as orthophosphate or as polyphosphates. However, based on the results by Makarov *et al.* [37], differences in the microbial community composition may also influence the chemical composition of organic P in soil.

	Land Use								
Attributes	Primary forest*		Secondary forest*		Crops*		Pasture*		
	2008	2009	2008	2009	2008	2009	2008	2009	
Chemical									
pH (CaCl ₂)	4.0 ± 0.4	4.1 ± 0.2	3.9 ± 0.05	4.0 ± 0.3	4.8 ± 0.8	4.4 ± 0.6	4.5 ± 0.6	3.88 ± 0.1	
$OM (g.dm^{-3})$	29.0 ± 14.7	32.3 ± 5.2	34.7 ± 20.3	26.3 ± 3.9	39.3 ± 15.5	25.7 ± 2.9	27.3 ± 9.2	31.3 ± 5.5	
Fe (mg.dm ⁻³)	159.7 ± 17.1	93 ± 8.2	109.3 ± 30.1	69.7 ± 18.6	55.0 ± 10.8	74.7 ± 13.7	66.3 ± 13.0	147.3 ± 21.2	
$P(mg.dm^{-3})$	9.7 ± 1.1	11.0 ± 2.0	8.0 ± 1.4	6.0 ± 1.0	1.9 ± 0.8	9.3 ± 1.1	6.0 ± 0.8	6.7 ± 0.7	
K (mmolc.dm ⁻³)	1.4 ± 0.5	1.3 ± 0.1	1.7 ± 0.5	1.2 ± 0.5	1.9 ± 0.9	2.1 ± 0.8	2.1 ± 0.3	1.6 ± 0.9	
Physical									
Clay (%)	31.0 ± 7.6	35.7 ± 6.1	35.5 ± 12.7	36.0 ± 12.3	25.8 ± 2.6	22.3 ± 7.5	25.4 ± 6.3	27.7 ± 9.4	
Silt (%)	51.7 ± 1.9	47.7 ± 3.4	45.8 ± 6.5	43.7 ± 3.2	53.6 ± 7.3	41.3 ± 2.5	36.6 ± 11.0	37.7 ± 1.8	
Sand (%)	17.3 ± 5.7	16.7 ± 4.9	18.7 ± 13.4	20.3 ± 9.5	20.6 ± 4.7	36.3 ± 3.1	38.0 ± 16.6	34.7 ± 2.2	

Table 1. Chemical and physical attributes of soil samples from different land use systems in Benjamin Constant municipality.

The values are average based on triplicate of sampling point in each land-use system. Standard deviations were shown in the table.

*No significant differences between land use systems for soil attributes (p < 0.05) in the two-years sampling.

Differences in archaeal, bacterial and fungal community structures were observed in the March 2008 and January 2009 samples. This observation was further supported by results from the multivariate analysis. NMDS analysis of our data sets supplemented with the soil attributes indicated that the first axis was highly correlated with the microbial community structure-soil attribute data (Figure 2; Table 2). Moreover, the second axis showed the same degree of correlation, suggesting that these data sets were governed by more than one gradient. Temporal variability in the composition of soil archaeal, bacterial and fungal communities may complicate the interpretation of spatial patterns of microbial community structure in relation to the soil properties associated with different land use systems. However, in general, archaeal, bacterial and fungal communities formed groups in function of the land use systems in the two-years sampling, except for the fungal communities based on March 2008 samples. Based on the pairwise R statistic from ANOSIM procedure, most of the interactions between the microbial community structures accessed by ARISA formed distinct groups (R > 0.50). The interactions between the fungal communities structure from March 2008 samples had lower R values (R < 0.03) (Table 2; Figure 2).

Figure 2. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis of sampling points based on the structure of soil archaeal, bacterial and fungal communities as determined by automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) and soil attributes. Samples were collected in March 2008 and January 2009. Each vector points to the direction of increase for a given variable and its length indicates the strength of the correlation between the variable and the ordination scores. The colors represent different land use systems: Primary Forest (PF, \blacksquare); Secondary Forest (SF, \bullet); Crops (CR, \diamond); Pasture (PA, \checkmark). Each point in the ordination is identified by the abbreviation of the correspondent land use system followed by the point sampling (1, 2 and 3) and replicate PCR product analyzed (A, B and C).



	NMDS								
	Stress ^a	Correlation ^b	Variability ^c	Stress ^a	Correlation ^b	Variability ^c	Interactions ^d	ANO	SIM
		(%)	(%)		(%)	(%)			
	2008				2009			2008	2009
							CR,PF	0.275	0.881
Archaea	0.021	62.8	43.0	0.031	61.1	63.5	PA,PF	0.725	0.616
							SF,PF	0.300	0.152
							CR,PF	0.448	0.642
Bacteria	0.028	83.7	75.5	0.022	58.5	58.5	PA,PF	0.985	0.701
							SF,PF	0.270	0.601
							CR,PF	0.221	0.762
Fungi	0.039	63.9	75.5	0.019	54.7	83.7	PA,PF	0.057	0.983
							SF PF	0.218	0.579

Table 2. Description of the non-metric multidimensional scaling (NMDS) and analysis of similarities (ANOSIM).

^a Indicates the fidelity of the regression used in the analysis (100 permutations).

^b Indicates the microbial community structure-soil attribute correlations for the first axis.

^c Percentage of variability in species data explained by the first axis.

^d PF, Primary Forest; CR, Crops; PA, Pasture; SF, Secondary Forest

By observing the organization of the microbial community in relation to soil attributes we can begin to generate and test hypotheses regarding the rules which govern the distribution of microorganisms in the different land use systems. In this case, the data obtained by ARISA technique when analyzed together with soil attributes show that soil archaeal, bacterial and fungal communities are heterogeneous entities with distinct components that are each capable of responding differently to environmental characteristics. Pasture microbial communities were clearly separated from others land use systems and are related to higher Fe concentrations detected in soil samples collected in January 2009, for example.

In the ordinations, a gradient can be noted in which microbial community structures from primary forest soil are distinct from those in soil under crops (circled groups on Figure 2). In this sense, our results are consistent with studies in nontropical areas, in which the structure of microbial communities in the soil over two years in a series of replicated plots was investigated. The studied area included cultivated fields, fields abandoned from cultivation and fields with no history of cultivation, in sites established in 1989 to study ecological processes in agro-ecosystems in the state of Michigan [38]. These authors showed that fields with no history of cultivation had ceased), only the field abandoned 45 years ago presented a microbial community structure comparable to those from fields with no history of cultivation. Anthropogenic activities, including agricultural land management practices, directly and indirectly affect soil environments and thus may also alter the activity and diversity of soil microbial communities [39-45].

Selection of primers used for amplification of the intergenic spacer region of the rRNA gene of *Archaea, Bacteria* and *Fungi* will affect the outcome of studies examining microbial community structure. In Model I of this study, we concentrated on analysis of the amplified intergenic spacer of the rRNA gene, as have other researchers [46-49], because of greater variability in amplified intergenic spacer than 16S rRNA. The relative conservation of the 16S rRNA may not identify all the variation in microbial community structure, such as certain species-level variation [46].

3.2. Model II of an Amazonian Agricultural System: Bacterial Community Structure in Amazonian Dark Earth (ADE) and Black Carbon (BC)

Significant differences were noted between ADE and ADJ soil for soil attributes (p < 0.05). The chemical analysis (Table 3) of soil samples ADE and ADJ Hatahara site revealed ADE soil pH higher than in ADJ soil. Similar results were obtained by Lima *et al.* (2002) [50] and Falcão and Borges (2006) [51]. In ADE, soil was noted high Ca and P content, high cation exchange capacity (CEC) and low Al saturation in comparison with ADJ soil. Lehmann *et al.* (2003) [52] observed high Ca and P content in ADE from other sites. The high CEC values are due to high organic matter content and density of charges per unit of carbon [53]. This property of organic carbon is specific to soils with high content of black carbon as ADE soil [54]. Altogether, these chemical properties are responsible for the quality and fertility of ADE soils [52].

The ADE has been conceived as a major example of sustainable agriculture because, since their initial description, these soils have been recognized as one of the most fertile soils known, even after extensive crop use [8]. Its potential surpasses the use for the sustainable growing of food and fuel and has implications even in carbon sequestration [8]. Therefore, comprehending how the microbial community is structured in such environments is key to a better management of this resource.

A ttailoutos	Hatahara				
Attributes	ADE	ADJ			
pH (CaCl ₂)	$5.2 \pm 0.2a$	$3.7 \pm 0.11b$			
$OM (g.dm^{-3})$	$53 \pm 2.64a$	$33.3 \pm 1.15b$			
$P(mg.dm^{-3})$	$508.7 \pm 45.5a$	$7.3 \pm 1.15b$			
$S (mg.dm^{-3})$	$4.3\pm0.57a$	$3.6\pm0.57b$			
K (mmolc.dm ⁻³)	$1.1 \pm 0.25a$	$0.6 \pm 0.05b$			
Ca (mmolc.dm ⁻³)	$138.3 \pm 7.63a$	$6.3 \pm 1.15b$			
Mg (mmolc.dm ⁻³)	$13.7 \pm 3.05a$	$1 \pm 0b$			
Al (mmolc.dm ⁻³)	$0 \pm 0a$	$14 \pm 1.73b$			
H+Al (mmolc.dm ⁻³)	$48.7\pm5.77a$	$95.7 \pm 14.6b$			
SB (mmolc.dm ⁻³)	153.7 ± 5.39a	$8 \pm 1.12b$			
CEC (mmolc.dm ⁻³)	$201.7 \pm 2.25a$	$103 \pm 615.7b$			
BS (%)	$76 \pm 2.64a$	$7.7 \pm 0.57b$			

Table 3. Chemical attributes of ADE and ADJ soil samples.

Average values based on triplicates of each soil. Standard deviations are shown in the table. Different letters indicates a significant differences (ANOVA followed by Tukey test $p \le 0.05$). SB = Sum of Base; CEC = Cation Exchange Capacity; BS = Base Saturation.

Bacterial fingerprints of the most dominant populations present in ADE and ADJ soil and BC were obtained by T-RFLP analysis. RDA of the T-RFLP profiles showed that some bacterial communities differed in structure and that these differences are related especially those linked to phosphorus (Figure 3). The difference revealed in the bacterial community structure in this study by T-RFLP were similar to those indicated by [55] and [56] despite their similar below-ground bacterial community.

In Redundancy Analysis (RDA) (Figure 3), specifically the ordination based on T-RFs profiles obtained with the enzyme *MspI*, the bacterial community structure formed separate groups from ADE

and ADJ soil and BC. On the other hand, the ordination based on bacterial community structures obtained with the enzyme *Hha*I did not separate ADE soil and BC, but it separated ADJ soil in this group. This analysis showed that differences in the soil bacterial community structure were related soil attributes, such as P and organic matter (enzyme *Hha*I data) and P (enzyme *Msp*I data).

Figure 3. Redundancy Analysis (RDA) of ADE (\blacksquare) and ADJ (\bullet) soil and BC (\bullet) based on the structure of soil bacterial community as determined by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and soil attributes. The ordinations were performed using data obtained with the enzymes *MspI* and *HhaI*.



The T-RF number and abundance were initially used to calculate diversity measures (Table 4). The diversity measures presented variation based on sample (ADE, ADJ and BC) and enzymes (*MspI* and *HhaI*). Considering the enzyme *MspI*, we observed higher diversity on ADE soil (H'= 4.15 ± 0.09) and the lower diversity was noted on ADJ (H' = 3.10 ± 0.52). In contrast, the enzyme *HhaI* data revealed higher diversity on ADJ soil (H' = 2.09 ± 0.31) and lower diversity on ADE soil (H' = 1.84 ± 0.64). Subtle differences were noted in the evenness of bacterial community.

Sample	T-RFs Richness		Ever	iness	H'(log _e)		
S	MspI	HhaI	MspI	HhaI	MspI	HhaI	
ADE	100 ± 15.7	10.3 ± 5	0.90 ± 0.01	0.80 ± 0.09	4.15 ± 0.09	1.84 ± 0.64	
ADJ	42.6 ± 20.5	11.6 ± 3	0.84 ± 0.02	0.85 ± 0.06	3.10 ± 0.52	2.09 ± 0.31	
BC	56.3 ± 9.8	20.3 ± 24	0.82 ± 0.08	0.81 ± 0.09	3.33 ± 0.39	1.99 ± 0.68	

Table 4. Diversity index and richness estimation of T-RFs for ADE and ADJ soil and BC based on enzymes *Msp*I and *Hha*I data.

It is considered that high levels of carbon (BC) enhance soil fertility by retaining nutrients and water and increasing the pH [54,57]. Additionally, the surface charge properties of BC are thought to increase the cation exchange capacity, thereby reducing nutrient leaching [53]. On the other hand, little is known about the contribution of BC as a habitat or as a platform for nutrient exchange for microorganisms. While BC has been appreciated for its chemical adsorption properties, Pietikainen *et al.* [58] reported that BC can support a habitat for the microbes. Furthermore, based on the chemical composition and physical structures that are prevalent in biochar particles, Thies and Rillig [59] have suggested that biochar has biological properties that are favorable to microbial communities. Residual hydrocarbons and materials adhering to the particle surface may directly support microbes. The idea that anthrosols may have distinct microbial populations is not new, but recently several facts have been demonstrated concerning the role of black carbon (BC) on the physical [60], chemical [61] and biological [58] processes in the anthrosols. The bacterial diversity of Amazonian Dark Earth is similar to pristine forest soil from the Western Amazon, but the richness in the ADE samples was increased by 25% [55].

When studying land conversion from tropical forest to agricultural use, several alterations may occur in the size, activity and composition of the microbial communities, as previously observed [27,62], and unusual microbial communities may prevail during shifts associated with deforestation [24,27]. These findings would be more relevant when studying ADE with high concentrations of BC, as these particles are the oldest form of carbon in the soil [63].

A recent study surveyed the bacterial community composition in ADE and adjacent soils using culturing and molecular identification [57]. While the composition of unculturable bacteria was not directly assessed, sequences from 16S rRNA genes and their phylogenetic relationships were determined. Anthrosols contained high numbers of culturable bacteria, which were over two orders of magnitude higher at the deepest sampling depths than in adjacent soils. Overall, larger bacterial populations and a greater diversity of isolates were found in all four of the anthrosols studied, to a depth of up of 1 m compared to adjacent soils located within 50–500 m of the associated anthrosols. These data were the first indication that diverse soil microbial populations have adapted to the unique biochemistry and physiological ecology of these anthrosols. On the other hand, the archaeal community observed in ADE sites presented lower richness and diversity than the adjacent soil [64].

With the idea that the addition of BC to soil was due to fire events, these anthropic activities are thought to be determinant to the biogeochemistry of ADE [65,66], and they may alter the soil microbiological community structure and composition of the microbial communities below ground. Due to the prevalence of BC in ADE and its unique physical and chemical characteristics, more detailed studies were carried out to better understand the role of BC on the microbial populations in ADE soils.

In the Amazonian region, rapid turnover of the soil organic matter (OM) occurs due to the high temperatures and humidity typical of the tropics. These environmental extremes lead to increased turnover rates, with concomitant rapid depletion of the fragile nutrients of the adjacent unmodified soils compared relative to ADE. Therefore, the buffering capacity offered by BC, persisting over millennia, should also focus on its role as habitats or niche of soil microbial communities when tracing soil additives such as BC [67].

3.2.1. The bacterial OTU richness of ADE and BC

The pyrosequencing data indicate that the BC can host species of *Bacteria* in numbers not much lower than the ADE; however, the latter had significantly greater OTU richness (Figure 4). On the other hand, as seen in Figure 4, of the total of OTU found in BC, 41% were not present in the ADE soil, suggesting that this environment may be the host of specific processes. These data bring new perspectives regarding the opportunity for reconstruction of tropical and degraded soils by contemporary human activities.

Figure 4. Venn diagram of the operational taxonomic units (OTUs) based on the 16S rRNA gene analyzed by pyrosequencing (454 Roche). The diagram shows OTUs found exclusively in ADE (512), in black carbon (BC, 342) and the OTUs in held in common (492).



The numbers of species detected in a sample, or of the numbers of organisms discerned at any given phylogenetic level, are strongly affected by the number of sequences analyzed [68]. Estimates of OTUs increase with number of sequences and a plot of OTUs *versus* the number of sequences yields a rarefaction curve that approaches a maximum (Figure 5). To estimate the true maximum value at any phylogenetic level it is necessary to model and extrapolate from the rarefaction curve, or to use nonparametric methods to estimate the true OTU richness by taking into account the population structure. Based on 10,857 sequences, the values of richness estimations and heterogeneity indicated higher operational taxonomic units (OTUs) richness and diversity in ADE soils (1939.43 OTUs, H' = 6.23), followed by lower OTUs richness and diversity in libraries from BC (1586.06 OTUs, H' = 5.93).

We recovered 10,857 partial sequences of the 16S rRNA genes from ADE soil and BC of an average of 207 nucleotides in length. With over 24% of the total bacterial sequences, the *Proteobacteria* represented the dominant phylum in ADE soil, including representatives of the classes α , β , γ and δ of *Proteobacteria* (Figure 6). In contrast, *Acidobacteria* were a prominent phylum in BC with 21% of the bacterial sequences. The second most abundant phyla in ADE and BC were *Acidobacteria* (10%) and *Proteobacteria* (15%), respectively. Other prominent phyla in ADE were the *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria* and the *Planctomycetes*, which represented 8%, 7% and 4% of total sequences. The sequences. Among the other phyla, *Verrucomicrobia* (9%) and *Firmicutes* (8%) were found in BC. Approximately 26%–36% of the sequences from each sample remained unclassified. Tsai *et al.* [69] found higher abundance of *Verrucomicrobia* in ADE soil from Balbina site, located in the Central

Amazon, than in ADJ of this same site. The distribution of verrucomicrobial rRNA in the soil reveals that *Verrucomicrobia* are significantly affected by environmental characteristics that change in relation to time, soil history, and soil depth, and reveals that a statistically significant amount of the variation in verrucomicrobial rRNA abundance can be explained by changes in soil moisture content [70].

Figure 5. Rarefaction curves of the Amazonian Dark Earth (ADE) and black carbon (BC). Sequences were obtained by pyrosequencing the bacterial 16S rRNA gene pool from the ADE site at Hatahara in the Central Amazon.



Phylogenetic analysis revealed differences in community composition linked to ADE soil and BC (Figure 6) and the clearest differences were found among the *Acidobacteria*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* and *Firmicutes*. Our results extend the understanding about the bacterial phyla present in ADE soil, such as those published by Kim *et al.* [55] and add information about the bacterial community composition in BC, unknown until now. Our results obtained by pyrosequencing show higher numbers of bacterial phyla in ADE soil and BC in comparison with results obtained by Jesus *et al.* [27] using a clone library for the same soils considered in Model I. The additional bacterial phyla found in anthrosols were *Chlamydiae*, *Nitrospira*, OD1, TM7, BRC1, *Planctomycetes* and *Verrucomicrobia*.

Figure 6. Relative abundance of phyla for ADE soil and BC pyrosequencing library, in which 16S rRNA gene sequences were classified according to the nearest neighbor in the Ribosomal Database Project (RDP-MSU, USA) pipeline.



4. Conclusions

The molecular methods used to study the microbial communities in two agricultural systems that are practiced in Amazonia (the "slash-and-burn" system and the man-made anthrosols), based also upon the soil attributes, have enabled us to view a better but quite complex picture of the conditions of soil management by stakeholders or end-users who are looking to develop agricultural sustainability in tropical rain forest ecosystems without serious disturbance to these ecosystems.

Based on Model I ("slash-and-burn" system), both the traditional subsistence crop cultivation by indigenous people and the pasture made by nonindigenous people alter the structure of archaeal, bacterial and fungal communities in sites originally constituted by highland forests in Western Amazon. ARISA data evidenced considerable differences in the structures between microbial communities present in forest and those in agricultural soils. In this model, the re-growth of a secondary forest followed by agricultural practices provides evidence of an improved level of restoration when considering the organization of the soil microbial community structures.

On the basis of Model II (anthrosols—Amazonian Dark Earth), data revealed a higher T-RF number in ADE soil and an elevated T-RFs richness in BC by T-RFLP when using enzyme *MspI*. Differences were noted in the bacterial community composition in ADE soil and BC, and a higher bacterial diversity present in anthrosols was revealed by pyrosequencing. In this model, the high fertility in the ADE associated with a higher soil bacterial diversity, even when under intensive cultivation by the native population, may contribute to the overall higher yields when compared to the lower crop productivities under the "slash-and-burn" agricultural system. The higher microbial diversity found in the Hatahara site, a well known anthrosol 1,500 years old [71], highlights the importance of anthrosols to the sustainability of the Amazonian soils for crop production.

Acknowledgements

The group would like to sincerely express their thanks and gratitude to CNPq—Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (project N° 474455/2007-6), FAPESP—Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (project N° 2006/06700-0) and GEF/UNEP—Global Environmental Facility/United Nations Environment Program (project CSM-BGBD/GF2715-02) for the financial support. We also would like to thank the fellowships given by FAPESP and CNPq. The group also is in debt to James Tiedje and Ederson C. Jesus (Center of Microbial Ecology—Michigan State University, MI, USA) for the DNA pyrosequencing support and to José E. Gomes and Fábio R.S. Duarte for their assistance on the molecular analyses.

References

- Fearnside, P.M. Uso da terra na Amazônia e as mudanças climáticas globais. *Braz. J. Ecol.* 2006, 7, 83-100.
- 2. Nye, P.H.; Greenland, D.J. The soils under shifting cultivation. Commonwealth Bureau Soils, Tech. Comm. Harpenden, UK, 1960, No. 51.
- 3. Sanchez, P.A; Buol, S.W. Soils in the tropics and world food crisis. *Science* 1975, 188, 598-603.
- 4. Barrow, C.J. Land Degradation; Cambridge University Press: Cambridge/London/New York, 1991.
- 5. Juo, A.S.; Manu, R.A. Chemical dynamics in slash-and-burn agriculture. *Agricult. Ecosys. Environ.* **1996**, *58*, 49-60.
- Fidalgo, E.C.C.; Coelho, M.R.; Araujo, F.O.; Moreira, F.M.S.; Santos, H.G.; Brefin, M.L.M.S.; Huising, J. Levantamento do uso e cobertura da terra de seis áreas amostrais relacionadas ao projeto BiosBrasil (Conservation and Sustainable Management of Below-Groud Biodiversity: Phase I), Município de Benjamin Constant (AM). Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2005. (Boletim De Pesquisa E Desenvolvimento/Embrapa Solos, ISSN 1678-0892; 71).
- Lehmann, J.; Kern, D.C.; German, L.; McCann, J.; Martins, G.C.; Moreira, A. Soil fertilityand production potential. In *Amazonian Dark Earths: Origin, Properties, Management*; Lehmann, J., Kern, D.C., Glaser, B., Woods, W.I., Eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 2003; pp. 105-124.
- 8. Marris, E. Putting the carbon back: Black is the new green. *Nature* 2006, 442, 624-626.
- Woods, W.I. Development of anthrosol research. In *Amazonian Dark Earths: Origin, Properties, and Management*; Lehmann, J., Kern, D.C., Glaser, B., Woods, W.I., Eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 2003; pp. 3-14.

- Coelho, M.R.; Fidalgo, E.C.C.; Araújo, F.O.; dos Santos, H.G.; Mendonça, S.M.L.; Pérez, D.V.; Moreira, F.M.S. 2005. Solos das áreas-piloto do Projeto BiosBrasil (Conservation and Sustainable Management of Below Ground Biodiversity: Phase I), Município de Benjamim Constant, Estado do Amazonas [recurso eletrônico] Rio de Janeiro: Embrapa Solos. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento/Embrapa Solos, ISSN 1678-0892; 67).
- 11. Bentivenga, S.P.; Morton, J.B. Stability and heritability of fatty acid methyl ester profiles of glomalean endomycorrhizal fungi. *Mycolog. Res.* **1994**, *98*, 1419-1426.
- 12. Garcia-Martínez, J.; Rodriguez-Valera, F. Microdiversity of uncultured marine prokaryotes: the SAR11 cluster and the marine Archaea of group I. *Molecular Ecol.* **2000**, *9*, 935-948.
- Casamayor, E.O.; Massana, R.; Benlloch, S.; Øvreas, L.; Díez, B.; Goddard, V.J.; Gasol, J.M.; Joint, G.I.; Rodríguez-Valera, F.; Pedrós-Alió, C. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Env. Microbiol.* 2002, *4*, 338-348.
- Sequerra, J.; Marmeisse, R.; Valla, G.; Normand, P.; Capellano, A.; Moiroud, A. Taxonomic position and intraspecific variability of the nodule forming *Penicillium nodositatum* inferred from RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer and random amplified polymorphic DNA. *Mycolog. Res.* 1997, 101, 465-472.
- 15. Peres-Neto, P.R.; Legendre, P.; Dray, S.; Borcard, D. Variation partitioning of species data matrices: estimation and comparison of fractions. *Ecology* **2006**, 87, 2614-2625.
- Edwards, U.; Rogall, T.; Blocker, H.; Emde, M.; Bottger, E.C. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 1989, 17, 7843-7853.
- 17. Woese, C.R.; Kandler, O.; Wheelis, L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 4576-4579.
- 18. Sambrook, J.; Russell, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, NY, USA, 2001.
- 19. Kindt, R.; Coe, R.; Tree Diversity Analysis. A Manual and Software for Common Statistical Methods and Biodiversity Studies. World Agroforestry Centre (ICRAF): Nairobi, Kenya, 2005.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2007. ISBN 3-900051-07-0. Available online: http://www.R-project.org (accessed May 2010).
- 21. Wang, Q. Artificial neural networks as cost engineering methods in a collaborative manufacturing environment. *Int. J. Prod. Econ.* **2007**, *109*, 53-64.
- Cole, J.R.; Wang, Q.; Cardenas, E.; Fish, J.; Chai, B.; Farris, R.J.; Kulam-Syed-Mohideen, A.S.; McGarrell, D.M.; Marsh, T.; Garrity, G.M.; Tiedje, J.M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 2009, *37*, 141-145.
- 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, communitysupported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, 75, 7537-7541.

- 24. Borneman, J.; Triplett, E.W. Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 2647-2653.
- 25. Donovan, S.E.; Purdy, K.J.; Kane, M.D.; Eggleton, P. Comparison of *Euryarchaea* strains in the guts and food-soil of the soil-feeding termite *Cubitermes fungifaber* across different soil types. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 3884-3892.
- Winter, C.; Smit, A.; Herndl, G.J.; Weinbauer, M.G. Impact of virioplankton on archaeal and bacterial community richness as assessed in seawater batch cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70, 804-813.
- 27. Jesus, E.C.; Marsh, T.L.; Tiedje, J.M.; Moreira, F.M.S. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. *ISME J.* **2009**, *3*, 1004-1011.
- Rambelli, A.; Persiani, A.M.; Maggi, O.; Lunghini, D.; Onofri, S.; Riess, S.; Dowgiallo, G.; Puppi, G. Comparative studies on microfungi in tropical ecosystems. Mycological studies in South Western Ivory Coast forest. Report no. 1, MAB, UNESCO, 1983, p. 102.
- Rambelli, A.; Persiani, A.M.; Maggi, O.; Onofri, S.; Riess, S.; Dowgiallo, G.; Zucconi, L. Further mycological studies in south western Ivory Coast forest. Report no. 2, *Giornale Botanici Italica* 1984, 118, 201-243.
- Maggi, O.; Persiani, A.M.; Casado, M.A.; Pineda, F.D. Edaphic mycoflora recovery in tropical forests after shifting cultivation. *Acta Oecologica* 1990, 11, 337-350.
- 31. Persiani, A.M.; Maggi, O.; Casado, M.A.; Pineda, F.D. Diversity and variability in soil fungi from a disturbed tropical rain forest. *Mycologia* **1998**, *90*, 206-214.
- Antoniolli, Z.I.; Schachtman, D.P.; Ophel-Keller, K.; Smith, S.E. Variation in rDNA ITS sequences in *Glomus mosseae* and *Gigaspora margarita* spores from a permanent pasture. *Mycol. Res.* 2000, 104, 708-715.
- 33. Piccolo, M.C.; Neill, C.; Cerri, C.C. Natural abundance of 15N in soils along forest-to-pasture chronosequences in the western Brazilian Amazon Basin. *Oecologia* **1994**, *99*, 112-117.
- 34. Reiners, W.A.; Bouwman, A.F.; Parsons, W.F.J.; Keller, M. Tropical rain forest conversion to pasture: changes in vegetation and soil properties. *Ecol. Appl.* **1994**, *4*, 363-377.
- 35. Moraes, J.F.L.; Neill, C.; Volkoff, B.; Cerri, C.C.; Melillo, J.; Lima, V.C.; Steudler, P.A. Soil carbon and nitrogen stocks following forest conversion to pasture in the Western Brazilian Amazon Basin. *Acta Scientiarum* **2002**, *24*, 1369-1376.
- Bünemann, E.K.; Marschner, P.; Smernik, R.J.; Conyers, M.; McNeill, A.M. Soil organic phosphorus and microbial community composition as affected by 26 years of different management strategies. *Biol. Fertil. Soils* 2008, 44, 717-726.
- Makarov, M.I.; Haumaier, L.; Zech, W.; Marfenina, O.E.; Lysak, L.V. Can 31P NMR spectroscopy be used to indicate the origins of soil organic phosphates? *Soil Biol. Biochem.* 2005, 37, 15-25.
- 38. Buckley, D.H.; Schmidt, T.M. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environ. Microbiol.* **2003**, *5*, 441-452.
- Bending, G.D.; Turner, M.K.; Jones, J.E. Interactions between crop residue and soil organic matter quality and the functional diversity of soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* 2000, 34, 1073-1082.

- 40. Bossio, D.A.; Scow, K.M. Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. *Microb. Ecol.* **1998**, *35*, 265-278.
- Bulluck, L.R.; Ristaino, J.B. Effect of synthetic and organic soil fertility amendments on southern blight soil microbial communities and yield of processing tomatoes. *Phytopathology* 2002, *92*, 181-189.
- de Brito Alvarez, M.A.; Gagne, S.; Antoun, H. Effect of compost on rhizosphere microflora of the tomato and on the incidence of plant-growth promoting rhizobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, *61*, 194-199
- 43. Degens, B.P.; Schipper, L.A.; Sparling, G.P.; Duncan, L.C. Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance? *Soil Biol. Biochem.* **2001**, *33*, 1143-1153.
- 44. Lupwayi, N.Z.; Rice, W.A.; Clayton, G.W. Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation. *Soil Biol. Biochem.* **1998**, *30*, 1733-1741.
- 45. Steenwerth, K.L.; Jackson, L.E.; Calderón, F.J.; Stromberg, M.R.; Scow, K.M. Soil microbial community composition and land use history in cultivated and grassland ecosystems of coastal California. *Soil Biol. Biochem.* **2003**, *35*, 489-500.
- Fisher, M.M.; Triplett, E. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 4630-4636.
- Ranjard, L.; Poly, F.; Lata, J-C.; Mougel, C.; Thioulouse, J.; Nazaret, S. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67, 4479-4487.
- 48. Saison, C.; Degrange, V.; Oliver, R.; Millard, P; Commeaux, C.; Montange, D.; Roux, X.L. Alternation and resilience of the soil microbial community following compost amendment: effects of compost level and compost-borne microbial community. *Environ. Microbiol.* **2006**, *8*, 247-257.
- 49. Wu, T.; Chellemi, D.O.; Graham, J.H.; Martin, K.J.; Rosskopf, E.N. Comparison of soil bacterial communities under diverse agricultural land management and crop production practices. *Microb. Ecol.* **2008**, *55*, 293-310.
- Lima, H.N.; Schaefer, C.E.R.; Mello, J.W.V.; Gilkes, R.J.; Ker, J.C. Pedogenesis and pre-Columbian land use of "Terra Preta Anthrosols" ("Indian black earth") of Western Amazonia. *Geoderma* 2002, 110, 1-17.
- 51. Falcão, N.P.S.; Borges, L.F. Efeito da fertilidade de terra preta de índio da Amazônia Central no estado nutricional e na produtividade do mamão hawaí (Carica papaya L.). *Acta Amazônica* **2006**, *36*, 401-406.
- 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 Soil* 2003, *249*, 343-357.
- Liang, B.; Lehmann , J.; Solomon, D.; Kinyangi J.; Grossman, J.; O'Neill, B.; Skjemstad, O.; Thies, J.; Luizão, F.J.; Petersen, J.; Neves, E.G. 2006. Black carbon increases cation exchange capacity in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 2006, *70*, 1719-1730.

- 54. Glaser, B.; Lehmann, J.; Zech, W. Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal—a review. *Biol. Fertil. Soils* **2002**, *35*, 219-230.
- 55. 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 Bio. Biochem.* **2007**, *39*, 684-690.
- O'Neill, B.; Grossman, J.; Tsai, S.M.; Gomes, J.E.; Lehmann, J.; Peterson, J.; Neves, E.; Thies, J.E. Bacterial community composition in Brazilian anthrosols and adjacent soils characterized using culturing and molecular identification. *Microb. Ecol.* 2009, 58, 23-35.
- 57. Glaser, B. Prehistorically modified soils of central Amazonia: a model for sustainable agriculture in the twenty-first century. *Phil. Trans. R. Soc.* B **2007**, *362*, 187-196.
- 58. Pietikainen, J.; Kiikkila, O.; Fritze, H. Charcoal as a habitat for microbes and its effect on the microbial community of the underlying humus. *Oikos* **2000**, *89*, 231-242.
- Thies, J.E.; Rillig, M.C. Characteristics of biochar: Biological properties. In *Biochar for Environmental Management*; Lehmann, J., Joseph, S., Eds.; Earthscan, Dunstan House: London, UK, 2008.
- Warnock, D.D.; Lehmann, J.; Kuyper, T.W.; Rillig, M.C. Mycorrhizal responses to biochar in soil—concepts and mechanisms. *Plant Soil* 2007, 300, 9-20.
- Liang, B.; Lehmann, J.; Solomon, D.; Kinyangi, J.; Grossman, J.; O'Neill, B.; Skejmstad, J.O.; Thies, J.; Luizao, F.J.; Petersen, J.; Neves, E.G. Black Carbon increases cation exchange capacity in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 2006, *70*, 1719-1730.
- 62. Nusslein, K.; Tiedje, J.M. Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. *Appl. Environ. Microb.* **1999**, *65*, 3622-3626.
- 63. Pessenda, L.C.R.; Gouveia, S.E.M.; Aravena, R. Radiocarbon dating of total soil organic matter and humin fraction and its comparison with C-14 ages of fossil charcoal. *Radiocarbon* **2001**, *43*, 595-601.
- 64. 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. *Microb. Ecol.* **2010**, DOI: 10.1007/s00248-010-9638-1.
- Glaser, B.; Guggenberger, G.; Zech, W. Organic chemistry studies on Amazonian Dark Earths. In Amazonian Dark Earths: Origin, Properties, and Management; Lehmann, J., Kern, D., Glaser, B., Woods, W., Eds.; Kluwer: Dordrecht, The Netherlands, 2003; pp. 227-241.
- Glaser, B.; Guggenberger, G.; Zech, W.; Ruivo, M.L. Soil organic matter stability in Amazonian Dark Earths. In *Amazonian Dark Earths: Origin, Properties, and Management*; Lehmann J., Kern D., Glaser B., Woods W., Eds.; Kluwer: Dordrecht, The Netherlands, 2003; pp. 141-158.
- Lehmann, J.; Liang, B.; Solomon, D.; Lerotic, M.; Luizao, F.; Kinyangi, J.; Schafer, T.; Wirick, S.; Jacobsen, C. Near-edge X-ray absorptive fine structure (NEXAFS) spectroscopy for mapping nano-scale distributions of organic carbon forms in soil: application to .black carbon particles. Glob Biogeochem. *Cycles* 2005, 19, 1-12.
- 68. Schloss, P.D.; Handelsman, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 1501-1506.
- Tsai, S.M.; O'Neill, B.; Cannavan, F.S.; Saito, D.; Falcão, N.P.S.; Kern, D.; Grossman, J.; Thies, J. Microbial World of Terra Preta. In *Terra Preta Nova: A Tribute to Wim Sombroek*, 1st ed.; Woods, W.I., Ed.; Springer Verlag: New York, NY, USA, 2008; volume 1, pp. 299-308.

- 70. Buckley, D.H.; Schmidt, T.M. Environmental factors influencing the distribution of rRNA from Verrucomicrobia in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2001**, *35*, 105-112.
- Neves, E.G.; Petersen, J.B.; Bartone, R.N.; Silva, C.A. Historical and socio-cultural origins of Amazonian Dark Earths. In *Amazonian Dark Earths: Origin, Properties, and Management*; Lehmann, J., Kern, D., Glaser, B., Woods, W., Eds.; Kluwer: Dordrecht, The Netherlands, 2003; pp. 3-14.

© 2010 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an Open Access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).