

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

CAIO AUGUSTO YOSHIURA

**Influência dos sistemas agrícolas e reflorestamento na estrutura das
comunidades microbianas associadas ao ciclo do carbono do Alto Xingu**

**Piracicaba
2014**

CAIO AUGUSTO YOSHIURA

**Influência dos sistemas agrícolas e reflorestamento na estrutura das comunidades
microbianas associadas ao ciclo do carbono do Alto Xingu**

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

**Piracicaba
2014**

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

Yoshiura, Caio Augusto

Influência dos sistemas agrícolas e reflorestamento na estrutura das comunidades microbianas associadas ao ciclo do carbono do Alto Xingu/ Caio Augusto Yoshiura; orientador João Lúcio de Azevedo - - Piracicaba, 2014.

83 f.: il.

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

1. Biologia molecular 2. Ciclos biogeoquímicos 3. DNA 4. Ecologia microbiana
5. Metanogênicas 6. Metanotróficas 7. Microbiologia do solo I. Título

CDU 631.584 : (579.64 + 575.113)

Dedico...

*...a todos que fazem parte da minha vida, especialmente,
aos meus pais Washington e Clotilde, ao meu irmão Luiz,
a minha tia Florinda e minha "bachan" Hanako (in memoriam),
responsáveis pela formação do meu caráter, educação e personalidade.*

Agradeço...

...primeiramente a Deus, pelo dom da vida.

...à minha família pelo amor incondicional, apoio, paciência e motivação em todos os momentos da minha vida.

...à minha noiva, Karine, pelo amor, apoio e compreensão e todos os momentos que passamos e enfrentamos juntos.

Amo vocês! Espero não decepcioná-los!

...aos professores Dr. João Lúcio de Azevedo e Dra Siu Mui Tsai pela supervisão e orientação, que acreditaram no meu potencial, fornecendo todo suporte para a realização da minha pesquisa e por todo conhecimento transmitido.

...à Lud pelos bons momentos de descontração e alegria, muita disposição em ajudar.

...aos técnicos de laboratório Chiquinho (*in memoriam*), Elias (“*ex situ*”), Fábio e Wagner por todo apoio, auxílio nas coletas e laboratoriais.

Que eu possa de alguma forma retribuir!

...ao CNPq pela concessão da bolsa de Mestrado para a realização deste trabalho e a FAPESP pelo financiamento do projeto.

...ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura por todos esses anos desde a graduação e aos docentes e funcionários:

...Marília Henyei que auxiliou na formatação do trabalho conforme as normas.

...Alzira, Gilson, Sônia, Neuda, Fábio e Daiane com os prazos e processos administrativos...

Para enlouquecer-nos, mas sempre com bom humor!

Calma que tem jeito!

...aos que passaram pelo laboratório, mas deixaram lembranças: Ademir, Amanda, Bia Furlan, Bianca Galúcio, Camila, João, Lillian, Lina, Mari, Majú, Marquinhos, Marcon, Monita, Natália, Taketani.

...aos amigos e colegas Acácio, Andreza, Bia, Carol, Clóvis, Danielle, Dennis, Enéas, Fabi, Fernanda Cassieri, Gustavo, Janne, Joaquim, Lucas, Lucas Palma, Marina, Paulinha, Rosineide.

...em especial, as amizades de Andressa, Aline, Felipe, Fernanda (Miuky), Marcela, Marília e Naissa pelas tantas vezes que me ajudaram, aprontaram, piraram e sempre presentes...

Delicadeeeezas em pessoa!

...a todos que de alguma forma contribuíram, incentivaram, torceram, rezaram e fizeram parte da minha vida,

...o meu MUITO OBRIGADO!!!

“

Tudo aquilo que o homem ignora, não existe pra ele. Por isso o universo de cada um, se resume no tamanho de seu saber.

Albert Einstein | 1879 - 1955”

“

Quando o homem se põe como medida de todas as coisas, converte-se em escravo de sua própria finitude.

Papa João Paulo II | 1920 - 2005”

RESUMO

YOSHIURA, C. A. Influência dos sistemas agrícolas e reflorestamento na estrutura das comunidades microbianas associadas ao ciclo do carbono do Alto Xingu. 2014. 83 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

Os sistemas de cultivo agrícola são essenciais à sociedade. A questão atual é saber como mantê-los produtivos sem afetar drasticamente os diferentes ecossistemas e ciclos biogeoquímicos. Sabe-se que a atividade biológica dos solos é de crucial importância à saúde dos mesmos e à produtividade. Deste modo, a implantação de técnicas ambientalmente corretas com monitoramentos eficientes, baseados na qualidade do solo, é fundamental para valorizar a sua conservação. Esta tem sido o foco de pesquisas nas últimas décadas, sendo que refletem ação antrópica, principalmente pela emissão dos gases do efeito estufa (GEEs). O uso de sistemas conservacionistas destaca-se pela viabilidade econômica e ambientalmente benéfica em relação ao manejo convencional. O sistema integração lavoura-pecuária tem sido utilizado para minimizar os impactos ambientais da exploração agrícola, a fim de preservar as características físicas, químicas e biológicas do solo, estendendo sua resiliência e aumentando a produtividade. Os microrganismos são responsáveis por diversos processos biológicos essenciais ao ambiente e algumas espécies participam produzindo ou oxidando o metano (CH₄), um dos gases do efeito estufa. Estes são influenciados principalmente pelas mudanças de uso do solo, que quando relacionadas ao manejo inadequado podem alterar a qualidade do solo, a produtividade e a emissão de gases. Assim, a avaliação dos solos dos sistemas agrícolas, sob a interação rizosférica de diferentes culturas e a criação de um ambiente anóxico se faz necessário para entender o comportamento de tais comunidades. Os sistemas de integração lavoura-pecuária e a rotação de culturas foram investigados em relação a microbiota funcional do solo, em função de fatores como ao histórico da área e umidade. Foram avaliadas a abundância, por PCR em tempo real, e a estrutura das comunidades *Archaea* e *Bacteria* por TRFLP, e a potencialidade de atuação do solo como emissor e mitigador de CH₄ através da quantificação dos microrganismos metanogênicos e metanotróficos de áreas agrícolas e reflorestamento do Alto Xingu, no município de Querência. Com elas foi possível observar que os microrganismos são estruturados, primariamente, em função do tipo de solo e consecutivo efeito rizosférico dos vegetais, de forma que os sistemas de integração lavoura-pecuária (ILP) apresentaram sutilmente maior estabilidade em relação ao sistema rotacionado de soja/milheto, devido ao sistema radicular da pastagem fornecer maior proteção e liberação de exsudatos. Pelas semelhanças existentes com os sistemas ILP, a área de reflorestamento se encontra em recuperação transitória, em uma média da similaridade entre as enzimas de restrição *HhaI* e *MspI*, de 85%; e 65% em relação à floresta, que se estruturou de maneira diferenciada das demais áreas. Outro fator de diferenciação das áreas agrícolas foi a forte influência da calagem o que eleva o pH e concomitantemente apresentou teores elevados de Ca e Mg. Já as comunidades de metanotróficas não apresentaram variação em função das metanogênicas, em que a saturação hídrica promoveu seu crescimento somente nos solos de floresta, onde ocorre maior incorporação de matéria orgânica.

Palavras-chave: Ecologia microbiana, sistemas agrícolas, reflorestamento, metanogênicas, metanotróficas, PCR em tempo real, TRFLP

ABSTRACT

YOSHIURA, C. A. Influence of agricultural systems and reforestation in the structure of microbial communities related to the carbon cycle of the Upper Xingu. 2014. 83 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

Agricultural farming systems are essential to society. The current question is how to keep them productive without drastically affecting different ecosystems and biogeochemical cycles. It is known that the soil biological activity is crucial to the health and productivity. Thus, the implementation of environmentally correct techniques with efficient monitoring, based on soil quality is critical to enhance their conservation. This has been the focus of research in recent decades, and reflects human action, mainly by the emission of greenhouse gases (GHGs). The use of conservation tillage systems distinguished by economic viability and environmentally beneficial compared to conventional tillage systems. The crop-livestock system has been used to minimize the environmental impacts of farming, in order to preserve the physical, chemical and biological soil properties, extending its resilience and increasing productivity. Microorganisms are responsible for many essential biological processes to the environment and some species participate in production or oxidation of methane (CH₄), a greenhouse gas. These are mainly influenced by land use changes, that when related to inadequate management may alter soil quality, productivity and gases emissions. Thus, the evaluation of soils for agricultural systems under the rhizospheric interaction of different cultures and creating an anoxic environment is needed to understand the behavior of such communities. Crop-livestock systems and crop rotation were investigated in relation to functional soil microbiota, depending on factors such as the area history and moisture. Genes abundance were assessed by real-time PCR, while *Archaea* and *Bacteria* community structure by TRFLP, and the potential role of soil as releaser and mitigator of CH₄ through the quantification of methanogens and methanotrophs in agricultural areas and reforestation of the Upper Xingu, at Querência city. Through the techniques of qPCR and TRFLP was observed that microorganisms are structured primarily on the type of soil, followed by rhizosphere effect of plants. In this way, crop-livestock integration systems (CLI) are subtly stable then rotational system of soybean/millet due to pasture root system to provide greater protection and root exudation. Alike CLI systems, the reforestation area is in transient recovery on average between the restriction enzymes *HhaI* and *MspI*, 85%; and 65% in relation to forest, this structures itself in a differentiated manner from the other areas. The farming areas present strong influence of liming, which leads to grow pH and concomitantly high Ca and Mg contents. The methanotrophic community did not vary due to the methanogenic community, and the water saturation promotes the growth of methanogenic communities only in forest soils where occurs greater organic matter incorporation.

Keywords: Microbial ecology, farming systems, reforesting, methanogenics, methanotrophics, qPCR, TRFLP

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Revisão bibliográfica.....	16
1.1.1 Plantio direto (PD) e integração lavoura-pecuária (ILP).....	16
1.1.2 Microrganismos e a qualidade do solo	17
1.1.2.1 Metanogênicos.....	19
1.1.2.2 Metanotróficos.....	20
1.1.3 Técnicas moleculares.....	20
1.1.3.1 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	21
1.1.3.2 Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (TRFLP).....	22
REFERÊNCIAS	23
2 ESTRUTURA DAS COMUNIDADES MICROBIANAS E ABUNDÂNCIA DE METANOGÊNICOS E METANOTRÓFICOS EM DIFERENTES SISTEMAS AGRÍCOLAS CONSERVACIONISTAS E REFLORESTAMENTO DO MUNICÍPIO DE QUERÊNCIA-MT	30
Resumo	30
Abstract.....	31
2.1 Introdução.....	32
2.2 Objetivos.....	34
2.3 Material e métodos	34
2.3.1 Área de estudo	34
2.3.2 Amostragem	35
2.3.3 Extração do DNA total do solo	37
2.3.4 PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	38
2.3.5 PCR – T-RFLP	38
2.3.5.1 Amplificação dos genes 16S rRNA de Archaea e Bacteria.....	38
2.3.5.2 Purificação dos produtos de PCR-TRFLP.....	40
2.3.5.3 Reação de restrição dos produtos de PCR-TRFLP.....	40
2.3.5.4 Precipitação dos produtos da restrição	41
2.3.5.5 Análise do polimorfismo dos fragmentos terminais de restrição (TRFLP).....	41
2.3.6 Processamento de dados	42
2.3.7 Resultados e discussão	42

2.3.7.1 Análises físico-químicas	42
2.3.7.2 Extração do DNA total do solo	45
2.3.7.3 Análise de PCR quantitativa	45
2.3.7.4 Análise de PCR-TRFLP	47
2.4 Conclusão	58
REFERÊNCIAS	59

3 RESPOSTAS DA COMUNIDADE MICROBIANA SOB INTERAÇÃO RIZOSFÉRICA E SATURAÇÃO HÍDRICA EM SOLOS DE SISTEMAS AGRÍCOLAS E REFLORESTAMENTO SOB EXPERIMENTO CONTROLADO

Resumo	63
Abstract	64
3.1 Introdução	65
3.2 Objetivos	66
3.3 Material e métodos	66
3.3.1 Experimento de mesocosmos em casa de vegetação	66
3.3.2 Amostragem	67
3.3.3 Extração do DNA total do solo e análises de qPCR e TRFLP	68
3.3.4 Resultados e discussão	68
3.3.4.1 Extração do DNA total do solo	68
3.3.4.2 Análise de PCR quantitativa	68
3.3.4.3 Análise de PCR-TRFLP	70
3.4 Conclusão	79
REFERÊNCIAS	79
APÊNDICE A	82

1 INTRODUÇÃO

Os sistemas de cultivo agrícola e a agropecuária são atividades antrópicas essenciais para toda e qualquer sociedade, independente do nível de desenvolvimento (GUALBERTO et al., 2003). O crescimento populacional mundial aumentará a demanda por alimentos e energia em 60% para o ano de 2050 (FAO, 2012), em que a população total está prevista para mais de 9 bilhões de pessoas (FAO, 2009), isto requer um aumento da eficiência dos sistemas de produção.

A grande questão contemporânea é saber como mantê-los produtivos sem afetar drasticamente os diferentes ecossistemas e ciclos biogeoquímicos. Desta forma, a implantação de políticas limpas e técnicas ambientalmente corretas tornam-se fundamentais, e exigem programas de monitoramento, baseados na qualidade e sustentabilidade do solo, visando avaliar o sucesso de diferentes práticas de manejo.

Este cenário se desenvolve concomitantemente a valorização da conservação do ambiente, em que há maior preocupação com os efeitos da produção de bens de consumo, principalmente os relacionados às mudanças climáticas. Assim, faz-se necessário o uso de tecnologias para a sustentabilidade do fornecimento de bens de consumo que permitam a máxima produção, mas que, ao mesmo tempo, reduzam os impactos e custos de qualquer atividade industrial e agrícola.

As mudanças climáticas têm sido o foco das pesquisas e a preocupação da população mundial nas últimas décadas. Estas são provocadas pela elevação da temperatura global, decorrente do aumento na emissão dos gases (como o dióxido de carbono, metano e óxido nitroso), responsáveis pelo efeito estufa (THE WORLD BANK, 2014), que é um fenômeno natural necessário à manutenção da vida no planeta. Tal incremento de gases na atmosfera é associado principalmente a queima de combustíveis fósseis, ao desmatamento (BARRETO et al., 2009) e as mudanças no uso da terra (FOLEY et al., 2005)

Por essas razões, o surgimento de técnicas de sistemas conservacionistas para a produção de alimento mais especializadas tem ganhado destaque, mas ainda é necessário que estudos sejam realizados para avaliar a eficiência desses sistemas. Por oferecer elevados níveis de matéria orgânica e a melhoria da qualidade física do solo com a introdução das pastagens em áreas agrícolas, utilizando níveis adequados de fertilidade, os sistemas de integração lavoura-pecuária têm demonstrado potencial para reduzir o impacto ambiental das atividades produtivas, reduzindo as emissões de gases do efeito estufa, dando maior

estabilidade à produção das culturas anuais e melhorando o aproveitamento da água e nutrientes (FRANCHINI et al., 2010).

Nesse contexto, objetivou-se avaliar os efeitos dos sistemas de integração lavoura-pecuária e a rotação de culturas, atualmente empregados no Estado do Mato Grosso, por meio de ferramentas moleculares, através da análise da quantidade e estrutura das comunidades de microrganismos do solo de *Archaea* e *Bacteria*, associadas ao ciclo biogeoquímico do carbono.

Mais especificamente, no capítulo 2 foram abordados os efeitos dos manejos de acordo com seu histórico, já no capítulo 3 foram analisados os efeitos da mudança da cultura em diferentes sistemas de produção e a elevação do teor de umidade do solo.

1.1 Revisão bibliográfica

1.1.1 Plantio direto (PD) e integração lavoura-pecuária (ILP)

Os sistemas conservacionistas têm como objetivo melhorar e aperfeiçoar o uso dos recursos naturais; desde o manejo adequado do solo, uso racional da água e preservação da biodiversidade, bem como o uso de insumos externos; prevenindo a poluição e a degradação do ambiente produtivo (DENARDIN et al., 2009).

Vários são os benefícios obtidos na utilização de sistemas conservacionistas, com grande importância para o plantio direto, que permite a conservação de parâmetros físicos, químicos e biológicos de modo eficiente: retendo a fertilidade e a qualidade do solo através da acumulação e incorporação da matéria orgânica gerada pela biomassa proveniente das culturas antecessoras, eliminando a lavração e a gradagem para o preparo do solo, o que aumenta os estoques de carbono e nitrogênio, entre outros nutrientes; além de atuar como cobertura do solo contra erosão e redução do uso de maquinário (AMADO et al., 2001; ROSCOE et al., 2006; THANGARAJAN et al., 2013).

O plantio direto tem sido empregado com sucesso no Brasil e no mundo desde a metade do século (DERPSCH; FRIEDRICH, 2009) com cerca de 50% das áreas cultivadas na safra de 2011/2012 (FEBRAPDP, 2013; THE WORLD BANK, 2014). Já a integração lavoura-pecuária tem ganhado espaço nas últimas décadas pelo crescimento na demanda de produtos relacionados à pecuária, segundo dados da FAO (2006).

No Brasil, os sistemas ILP têm sido difundidos principalmente no estado do Mato Grosso (FRANCHINI et al., 2010). Dentre esses sistemas destacam-se o sistema Barreirão, o sistema Santa Fé e alguns sistemas mistos (GONÇALVES; FRANCHINI, 2007).

A esses sistemas estão agregadas muitas vantagens. Eles podem proporcionar, por exemplo, a diversificação da atividade do produtor em agricultura e pecuária; a disponibilidade de forrageiras ao gado nos períodos secos, promovendo ganhos expressivos no rebanho (aumento de peso, maior produção de leite, redução da mortalidade, aumento da natalidade); a redução de plantas daninhas e cupinzeiros (KLUTHCOUSKI et al. 1991; KLUTHCOUSKI et al., 2000). Além disso, permitem intensificar o uso do solo: aumentando a funcionalidade da mão-de-obra; maquinário e equipamentos; e também diminuindo o desmatamento de novas áreas, reduzindo as queimadas e erosão do solo (GONÇALVES; FRANCHINI, 2007).

A utilização de pastagens perenes na rotação de culturas condiciona melhorias na qualidade do solo e na produtividade de lavouras subsequentes (GARCÍA-PRÉCHAC et al., 2004). Isto deve ao fato de apresentarem elevada biomassa radicular, responsável por uma maior influência no nível de carbono orgânico do solo (SOC) do que a biomassa da planta (GALE et al., 2000; MILCHUMAS et al., 1985) e também por promoverem uma maior disponibilização de potássio (GARCIA et al., 2008) entre outros nutrientes extraído de maiores profundidades.

Adicionalmente, as gramíneas perenes estabelecidas com grande emaranhado radicular podem aliviar o espessamento e a compactação do solo provocado pelo pisoteio do gado, durante os períodos de chuva, evitando efeitos negativos sobre as produções subsequentes (TWERDOFF et al., 1999; RUSSELL et al., 1999). Entretanto, se houver a compactação, a adoção de práticas conservacionistas sem inversão profunda do solo pode reverter o problema (WILHELM et al., 2004)

1.1.2 Microrganismos e a qualidade do solo

A manutenção da qualidade do solo é a base para a sustentabilidade dos sistemas de produção, pois a estrutura da comunidade microbiana em ecossistemas manejados se mostra sensível, podendo apresentar perdas ou modificações, quando comparados aos sistemas naturais adjacentes (TORSVIK et al., 2002). Essa qualidade é definida de acordo com a

estabilidade do solo e sua resiliência ao estresse, atribuídas a uma alta diversidade biológica e ciclagem de nutrientes (BRUGGEN; SEMENOV, 2000).

Os microrganismos representam uma grande parte dessa diversidade do solo (TORSVIK; GOKSOYR; DAAE, 1990). Estima-se que o número total de células procarióticas no solo seja de $2,6 \times 10^{29}$ células (WHITMAN; COLEMAN. WIEBE, 1998), podendo alcançar cerca de 7 mil espécies por grama de solo e teoricamente 3 milhões de diferentes *taxa* em uma tonelada de solo (CURTIS; SLOAN; SCANNELL, 2002). Sua abundância é fruto da sua contribuição em diversas formas para o funcionamento sustentável dos ecossistemas terrestres, realizando múltiplas atividades metabólicas: atuando na decomposição da matéria orgânica; contribuindo na mineralização ou solubilização de compostos químicos e na transformação de energia do ambiente (OVREAS, 2000; SPOSITO; ZABEL, 2003; ROSCOE et al., 2006).

A biodiversidade da microbiota edáfica é fortemente influenciada pelo tipo de cobertura vegetal. Os exsudatos radiculares liberados no solo regem uma série de interações biológicas tanto entre planta e os microrganismos quanto entre microrganismos. Como exemplo, de tais interações podem-se citar a resistência da planta a patógenos e herbivoria, o estímulo das simbioses benéficas de fixação biológica do nitrogênio e outros microrganismos associativos, alterações das propriedades químicas e físicas do solo e a inibição do crescimento de espécies competidoras (RADMAN et al., 2003; BAIS et al., 2004). Isto torna as comunidades microbianas mais complexas e resilientes que as da superfície dos solos (GILLER et al., 1997).

A adição de nutrientes por fertilizantes juntamente com adubos orgânicos ou a utilização da matéria orgânica proveniente da palhada aumenta o fluxo de carbono e nitrogênio para os microrganismos (KUZYAKOV; BOL, 2006), principalmente bactérias e fungos saprófitos, basais na cadeia trófica do solo subsuperficial (KRAMER et al., 2012) e aciona uma maior atividade catabólica microbiana e a diversidade funcional em partículas e agregados do solo (LAGOMARSINO; GREGO; KANDELER, 2012).

Os processos naturais de produção de gases do efeito estufa (CO_2 , CH_4 e N_2O) podem responder ao aumento no fluxo de carbono e nitrogênio pela adição de insumos, conhecido como efeito *priming*, alterando a taxa líquida de emissão/consumo desses gases pela atividade microbiana através de metanogênese, nitrificação e desnitrificação (SHARMA et al., 2011; THANGARAJAN et al., 2013).

As emissões de gases podem ser efêmeras, restritas em curtos espaços de tempo, desde dias a algumas semanas, ou persistentes por longos períodos de acordo com a quantidade e frequência de material orgânico agregado (KUZUYAKOV; BOL, 2006; SHARMA et al., 2011).

Dentre os gases do efeito estufa, o metano (CH₄) tem sua importância por ser o hidrocarboneto mais abundante na atmosfera, 1,21 mg/m³ em média, e representa de 20 a 30 vezes em dióxido de carbono (CO₂) equivalente na absorvância do infravermelho (efeito negativo para o efeito estufa) (LE MER; ROGER, 2001; THANGARAJAN et al., 2013).

1.1.2.1 Metanogênicos

As arqueias metanogênicas são vitais para ciclagem do carbono, executando o papel de oxidantes terminais. A produção de metano ocorre via redução de CO₂ e H₂, pelas arqueias anaeróbicas estritas (THAUER et al., 2008). São distribuídas em ambientes anaeróbicos, como solos (LUEDERS; FRIEDRICH, 2003), tundra (PURDY; NEDWELL; EMBLEY, 2003), sedimentos marinhos (BANNING, et al., 2005), culturas irrigadas (CHIN, et al., 2004; GROßKOPF; STUBNER; LIESA, 1998), intestino e rúmen (SAENGER, et al., 2007; EDWARDS; McBRIDE, 1975), aterros sanitários (LUTON et al., 2002) e esgoto (RASKIN et al., 1994; ZHENG; RASKIN, 2000).

São filogeneticamente agrupadas em anaeróbicas estritas no Filo Euryarchaeota (*Archaea*), com metabolismo energético restrito na formação de metano a partir do dióxido de carbono (CO₂) e hidrogênio (H₂), formando metanol, acetato e/ou metilaminas (GARCIA et al., 2000).

Os metanogênicos necessitam da associação sintrófica com outros microrganismos (dentre estes, protozoários, fungos e bactérias) que hidrolisam a matéria orgânica, os quais atuam na quebra das cadeias carbônicas de biopolímeros em monômeros, e lipídios em glicerol e ácidos graxos de longa cadeia (McINERNEY et al., 2007).

O isolamento de metanogênicas é dificultoso devido às restrições quanto aos gases. Deste modo, utiliza-se de métodos independentes de cultivo (STEINBERG; REGAN, 2009). Estudos de archaeas metanogênicas têm sido reportados (LUEDERS et al., 2001; LUTON et al. 2002) através do gene *mcrA* que codifica para a redutase da metil-coenzima-M, a enzima

que catalisa a redução do grupo metil ligado à coenzima-M resultando na liberação de metano, e dada como única e ubíqua entre as metanogênicas (THAUER, 1998).

1.1.2.2 Metanotróficos

Os microrganismos metanotróficos constituem um grupo especializado de bactérias que utilizam o metano como fonte de energia, desempenhando um importante papel no seu ciclo (HANSON; HANSON, 1996). As bactérias metanotróficas foram encontradas em diferentes ambientes, com todas as espécies conhecidas pertencentes aos filos *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* (HANSON; HANSON, 1996; OP DEN CAMP et al., 2009, VOROBIEV et al., 2010).

Atribuídas à capacidade de oxidar o metano em metanol, com o uso da enzima metano mono-oxigenase (MMO) (HANSON; HANSON, 1996). Essa enzima é encontrada em uma forma particulada ligada à membrana (pMMO), presente em todas as bactérias metanotróficas com exceção do gênero *Methylocella*, e em uma forma solúvel citoplasmática (sMMO) (THEISEN et al., 2005; McDONALD et al., 2008). Com a enzima metanol desidrogenase (MDH), o metanol é transformado em formaldeído, que pode ser utilizado em diferentes rotas metabólicas (HANSON; HANSON, 1996).

O gene *pmoA*, que codifica a subunidade alfa da metano mono-oxigenase particulada (pMMO) é altamente conservado e, por isso, tem sido amplamente utilizado para a detecção desses organismos (McDONALD et al., 2008; LUESKEN et al., 2011).

1.1.3 Técnicas moleculares

As técnicas moleculares desempenham um papel fundamental para os estudos da ecologia de microrganismos, contribuindo para obter e comparar informações essenciais ao entendimento da composição, estrutura e função das comunidades microbianas no solo (ROSADO et al., 1997; TIEDJE et al., 1999; HANDELSMAN; SMALLA, 2003; KIRK et al., 2004; SCHÜTTE et al., 2008).

Por meio delas é possível acessar, em larga escala, microrganismos independentemente das técnicas de isolamento e cultivo (MALIK et al., 2008; SCHÜTTE et al., 2008), cujo limite de obtenção é de apenas 1% da diversidade microbiana existente

(CURTIS; SLOAN, 2004).

Grande parte dessas técnicas é associada à reação em cadeia da polimerase (PCR) que permite a obtenção por amplificação dos fragmentos-alvo a um número detectável de acordo com a sensibilidade do equipamento utilizado, como por exemplo, as análises de TRFLP e DGGE, as bibliotecas de genes, sequenciamento de DNA, PCR quantitativo em tempo real (qPCR), entre muitas outras técnicas.

1.1.3.1 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A quantificação das sequências de DNA permite averiguar a existência de genomas em determinadas amostras, assim como as sequências de RNA para o monitoramento da expressão gênica de resposta para vários estímulos (JOZEF CZUK; ADJAVE, 2011; MAURIN, 2012; WEBLING; PANSTRUGA, 2012).

Inicialmente o PCR era quantificado através de: (1) géis de agarose, (2) marcação por fluorescência de produtos de PCR com indução a laser usando eletroforese capilar (FASCO et al, 1995) ou géis de acrilamida, (3) captura em placas e hibridização por sondas (MULDER et al, 1994), os quais poderiam sofrer contaminações pós-PCR devido a sua manipulação (HEID et al., 1996).

Nesse sentido, a técnica de PCR em tempo real permite o monitoramento da quantidade de cópias de ácidos nucleicos através da intensidade da fluorescência gerada após cada ciclo (ANKLAM et al., 2002). A PCR em tempo real pode ser realizada através de três abordagens principais: com o uso de corantes que emitem fluorescência quando intercalados com qualquer DNA fita-dupla; com *primers* de PCR marcados com fluorescência, o que evita o uso de corantes inespecífico; ou com o uso de sondas fluorescentes que hibridizam especificamente com a sequência de interesse (ABDUL KADER et al., 2010; GAŠPARIČ et al., 2010).

A abrangência da PCR em tempo real não se restringe somente a amostras clínicas e médicas, expressão de genes em plantas, mas também podem ser realizadas com amostras ambientais para estudos ecológicos, almejando tanto o gene 16S rRNA ou outros genes relacionados aos ciclos biogeoquímicos, como o *mcrA* para metanogênicas (VIANNA; HOLTGRAEWE; SEYFARTH, 2008) e *pmoA* para metanotróficas (TUOMINVIRTA; YRJÄLÄ; FRITZE, 2009; MARTINEAU; WHYTE; GREER, 2010).

1.1.3.2 *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (TRFLP)*

A análise de TRFLP (do inglês *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) determina o polimorfismo no comprimento dos fragmentos com restrição terminal de um produto de amplificação de PCR. É um método sensível, rápido e com grande aplicabilidade, que permite comparar comunidades microbianas de diferentes ambientes (LIU et al, 1997; MARSH, 1999; TIEDJE et al, 1999; LUTON et al., 2002; THIES, 2007). Assim, a análise de TRFLP tem sido uma ferramenta útil para avaliar distintos tipos de ecossistemas e o efeito do manejo na comunidade microbiana, já tendo sido empregada para caracterizar as comunidades microbianas em solos de floresta, solos poluídos, sedimentos, estruturas de plantas, trato digestivo de minhocas, entre outros (THIES, 2007).

A técnica se baseia na extração de DNA da comunidade a ser estudada, seguido pela amplificação por PCR do gene de interesse (TIEDJE et al, 1999) com um dos *primers* marcado com fluoróforo que pode ser detectado por um sequenciador automático. Uma vez que o marcador está na extremidade 5', somente o fragmento terminal da digestão de restrição é detectado, e seu tamanho determinado pelo sequenciador. Após a amplificação por PCR o produto é purificado e, em reações individuais, digerido com 2 a 4 enzimas de restrição – endonucleases –. Os produtos da digestão são carregados no sequenciador e a corrida é realizada em um modo de varredura com tamanho interno padrão incluído em cada linha de leitura (LIU et al. 1997). Os tamanhos dos TRFs (fragmentos de restrição terminal) marcados com fluorescência são convertidos em um eletroferograma, em que cada pico representa um TRF. O processamento do eletroferograma é feito em uma matriz, em que cada linha representa uma amostra e cada coluna representa um TRF da amostra e analisados em softwares que calculam o tamanho do fragmento e a intensidade de fluorescência (altura ou área) do pico.

Apesar das vantagens da técnica, a discriminação de populações microbianas depende de alguns artifícios devido ao fato de que há tamanhos de fragmentos compartilhados entre diferentes populações microbianas dependendo da combinação *primer* e enzima; tais mecanismos podem ser resolvidos utilizando dois ou mais conjuntos de *primers* ou a utilização de duas ou mais enzimas de restrição (MARSH et al., 2000). As enzimas *HhaI*, *RsaI* e *MspI* são frequentemente usadas por proporcionarem melhor resolução em comunidades naturais, mas outras podem ser combinadas para usadas em situações especiais) (MARSH et al., 2000; SCHÜTTE et al., 2008).

REFERÊNCIAS

- ABDUL KADER, A. M.; SLEYMANE, G. A.; KHATIB, F.; SAKR, J.; BAUM, M. **Laboratory manual for the training course on detection of genetically modified organisms and biosafety for food and agriculture**. Icarda, Syria, 2010, 322 p.
- AMADO, T. J. C.; BAYER, C.; ELTZ, F. L. F.; BRUM, A. C. R. Potencial de culturas de cobertura em acumular carbono e nitrogênio no solo no plantio direto e a melhoria da qualidade ambiental. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 25, p. 189-197, 2001.
- ANKLAM, E.; GADANI, F.; HEINZE, P.; PIJNENBURG, H.; VAN DEN EEDE, G. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. **European Food Research and Technology**, v. 214, n. 1, p. 3-26, 2002.
- BAIS, H. P.; PARK, S.; WEIR, T. L.; CALLAWAY, R. M.; VIVANCO, J. M. How plants communicate using the underground information superhighway. **TRENDS in Plant Science**, v. 9, n. 1, p. 26-32, 2004.
- BANNING, N.; BROCK, F.; FRY, J. C.; PARKES, R. J.; HORNIBROOK, E. R. C.; WEIGHTMAN, A. J. Investigation of the methanogen population structure and activity in a brackish lake sediment. **Environ. Microbiol.**, v. 7, p. 947-960, 2005.
- BARRETO, R.C.; MADARI, B.E.; MADDOCK, J.E.L.; MACHADO, P.L.O.A.; TORRES, T.; FRANCHINI, J.; COSTA, A.R. The impact of soil management on aggregation, carbon stabilization and carbon loss as CO₂ in the surface layer of a Rhodic Ferralsol in Southern Brazil. **Agriculture Ecosystems and Environment**, v. 132, p. 243-251, 2009.
- BRUGGEN, A.H.C.; SEMENOV, A.M.. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. **Forestry**, v. 15, p. 13-24, 2000.
- CHIN, K. J.; LUEDERS, T.; FRIEDRICH, M. W.; KLOSE, M.; CONRAD, R. Archaeal community structure and pathway of methane formation on rice roots. **Microb. Ecol.**, v. 47, p. 59-67, 2004.
- CURTIS, T. P.; SLOAN, W. SCANNELL, J. Estimating prokaryotic diversity and its limits. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 10494-10499, 2002.
- CURTIS, T.P.; SLOAN, W. T. Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.7, p. 221-226, 2004.
- DENARDIN, J. E.; SANTI, A.; WIETHÖLTER, S.; DA SILVA JUNIOR, J. P.; FAGANELLO, A. **Cultivo de Trigo**. 2009. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Trigo/CultivodeTrigo/solo.htm>>. Acesso em: 30 out. 2013.

DERPSCH, R.; FRIEDRICH, T. Development and Current Status of No-till Adoption in the World. In: Triennial Conference of the International Soil Tillage Research Organization (ISTRO), 18th, 2009. Izmir, Turkey. Proceedings on CD. Izmir, Turkey: ISTRO, 2009. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/ca/ca-publications/istro%202009.pdf>>. Acesso em 30 out. 2013.

EDWARDS, T.; McBRIDE, B. C. New Method for the Isolation and Identification of Methanogenic Bacteria. **Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 540-545, 1975.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **World agriculture: towards 2030/2050**. 2006. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0607e/a0607e00.pdf>. Acesso em: 30 out. 2013.

FASCO, M. J.; TREANOR, C. P.; SPIVACK, S.; FIGGE, H. L.; KAMINSKY, L. S. Quantitative RNA-polymerase chain reaction-DNA analysis by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence. **Anal. Biochem.**, v. 224, p. 140-147, 1995.

FEBRAPDP. **Federação Brasileira de Plantio Direto e Irrigação – Área de PD**. Disponível em: <<http://www.febrapdp.org.br/?i1=34eAcoBnLhRWY05WYsBXYIJXYa12&i2=4b8QYIJXYfde&i3=e46ARQBSZkBSYIJXwece&i4=&i5=34eAcoBnLhRWY05WYsBXYIJXYa12&m=1>> Acesso em: 30 out. 2013.

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

FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; WRUCK, F. J.; SKORUPA, L. A.; WINK, N. N.; GUISSOLPHI, I. J.; CAUMO, A. L.; HATORI, T. **Integração Lavoura-Pecuária: Alternativa para diversificação e redução do impacto ambiental do sistema produtivo no Vale do Rio Xingu**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. 20 p. (Embrapa Soja, Circular Técnica, 77)

GALE, W.J.; CAMBARDELLA, C.A.; BAILEY, T.T. Root-derived carbono and the formation and stabilization of aggregates. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v. 64, p. 201-207, 2000.

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

GARCIA, R. A.; CRUSCIOL, C. A. C.; CALONEGO, J. C.; ROSOLEM, C. A. Potassium cycling in a corn-brachiaria cropping system. **European Journal of Agronomy**, v. 28, n. 4, p. 579-585, 2008.

GARCÍA-PRÉCHAC, F.; ERNST, O.; SIRI-PRIETO, G.; TERRA, J.A. Integrating no-till into crop-pasture rotations in Uruguay. **Soil & Tillage Research**, v. 77, p. 1-13, 2004.

GAŠPARIČ, M. B.; TENGS, T.; LA PAZ, J. L.; HOLST-JENSEN, A.; PLA, M.; ESTEVE, T.; ŽEL, J.; GRUDEN, K. Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 6, p. 2023-2029, 2010.

GILLER, K.E.; BEARE, M.H; LAVELLE, P. et al. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. **Applied Soil Ecology**, v.6, p.3-16, 1997.

GONÇALVES, S. L.; FRANCHINI, J. C. **Integração Lavoura-Pecuária**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 8 p. (Embrapa Soja, Circular Técnica, 44).

GROßKOPF, R.; STUBNER, S.; LIESACK, W. Novel euryarchaeotal lineages detected on rice roots and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 4983–4989, 1998.

GUALBERTO, V.; MELLO, C. R.; NÓBREGA, J. C. A. O uso do solo no contexto agroecológico: uma pausa para reflexão. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.24, n. 220, p.18-28, 2003.

HANDELSMAN, J.; SMALLA, K. Conversations with the silent majority. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 6, p. 271-273, 2003.

HANSON, R. S.; HANSON, T. E. Methanotrophic bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 6, n. 2, p. 439-471, 1996.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Res.**, v. 6, p. 986-994, 1996.

JOZEF CZUK, J.; ADJAVE, J. Quantitative real-time PCR-based analysis of gene expression. **Methods Enzymol.**, v. 500, p. 99-109, 2011.

KIRK, J.E.; BEAUDETTE, L.A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J.N.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 58, p. 169-188, 2004.

KLUTHCOUSKI, J.; COBUCCI, T.; AIDAR, H.; YOKOYAMA, L. P.; OLIVEIRA, I. P. de; COSTA, J. L. da S.; SILVA, J. G. da; VILELA, L.; BARCELOS, A. de O.; MAGNABOSCO, C. de U. **Sistema Santa Fé Tecnologia Embrapa: integração lavoura-pecuária pelo consórcio de culturas anuais com forrageiras, em área de lavoura, nos sistemas direto e convencional**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000. 28 p. (Embrapa Arroz e Feijão, Circular Técnica, 38).

KLUTHCOUSKI, J.; PACHECO, A. R.; TEIXEIRA, S. M.; OLIVEIRA, E. T. **Renovação da pastagens de cerrado com arroz. I – Sistema Barreirão**. Goiania: EMBRAPA-CNPAP, 1991. 20 p. (EMBRAPA-CNPAP, Documentos, 33).

KRAMER, S.; MARHAN, S.; RUESS, L.; ARMBRUSTER, W.; BUTENSCHOEN, O.; HASLWIMMER, H.; KUZYAKOV, Y.; PAUSCH, J.; SCHEUNEMANN, N.; SCHOENE, J.; SCHMALWASSER, A.; TOSTSCHE, K. U.; WALKER, F.; SCHEU, S.; KANDELER, E. Carbon flow into microbial and fungal biomass as basis for the belowground food web of agroecosystems. **Pedobiologia**, v. 55, p. 111-119, 2012.

KUZYAKOV, Y.; BOL, R. Sources and mechanisms of priming effect induced in two grassland soils amended with slurry and sugar. **Soil Biol. Biochem.**, v. 38, p. 747-58, 2006.

LAGOMARSINO, A.; GREGO, S.; KANDELER, E. Soil organic carbon distribution drives microbial activity and functional diversity in particle and aggregate-size fractions. **Pedobiologia**, v. 55, p. 101-110, 2012.

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

LUEDERS, T., CHIN, K.-J., CONRAD, R. et al. Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase alpha subunit (*mcrA*) gene in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage. **Environ. Microbiol.**, v. 3, p. 194-204, 2001.

LUEDERS, T.; FRIEDRICH, M. W. Evaluation of PCR Amplification Bias by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Small-Subunit rRNA and *mcrA* Genes by Using Defined Template Mixtures of Methanogenic Pure Cultures and Soil DNA Extracts. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 69, n.1, p. 320–326, 2003.

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

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

MARSH, T.L.; SAXMAN, P.; COLE, J.; TIEDJE, J. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3616-3620, 2000.

MARTINEAU, C.; WHYTE, L.G.; GREER, C.W. Stable Isotope Probing Analysis of the Diversity and Activity of Methanotrophic Bacteria in Soils from the Canadian High Arctic. **Appl. Env. Microb**, v. 76, n. 17, p. 5773-5784, 2010.

MAURIN, M. Real-time PCR as a Diagnostic Tool for Bacterial Diseases. **Expert Rev Mol Diagn.**, v. 12, n. 7, p. 731-754, 2012.

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

McINERNEY, M. J.; ROHLIN, L.; MOUTTAKI, H. et al. The genome of *Syntrophus aciditrophicus*: life at the thermodynamic limit of microbial growth. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 104, p. 7600–7605, 2007.

MILCHUMAS, D.G.; LAUENROTH, W.K.; SINGH, J.S.; COLE, C.V. Root turnover and production by ¹⁴C dilution: Implications of carbon partitioning in plants. **Plant Soil**, v. 88, p.353-365, 1985.

MULDER, J.; McKINNEY, N.; CHRISTOPHERSON, C.; SNINSKY, J.; GREENFIELD, L.; KWOK, S. Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: Application to acute retroviral infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 292-300, 1994.

OP DEN CAMP, H. J. M.; ISLAM, T.; STOTT, M. B.; HARHANGI, H. R.; HYNES, A.; SCHOUTEN, S.; JETTEN, M. S. M.; BIRKELAND, N.-K.; POL, A.; DUNFIELD, P. F. Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic *Verrucomicrobia*. **Environmental Microbiology Reports**, v. 1, n. 5, p. 293-306, 2009.

OVREAS, L. Population and community level approaches for analyzing microbial diversity in natural environments. **Ecology Letters**, Malden, v. 3, 236-251, 2000.

PURDY, K. J.; NEDWELL, D. B.; EMBLEY, T. M. Analysis of the sulfate-reducing bacterial and methanogenic archaeal populations in contrasting Antarctic sediments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 3181–3191, 2003.

RADMAN, R.; SAEZ, T.; BUCKE, C.; KESHAVARZ, T. Elicitation of plants and microbial cell systems. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 91-102, 2003.

RASKIN, L.; POULSEN, L. K.; NOGUERA, D. R.; RITTMANN, B. E. ; STAHL, D. A. Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p. 1241–1248, 1994.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D. Molecular microbial ecology: a minireview. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, p. 135-147, 1997.

ROSCOE, R.; MADARI, B.E.; MACHADO, P.L.O.A. Fracionamento físico do solo na obtenção de frações mensuráveis para uso em simuladores da dinâmica da matéria orgânica. In: ROSCOE, R.; MERCANTE, F.M.; SALTON, J.S. (Eds) **Dinâmica da matéria orgânica do solo em sistemas conservacionistas**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2006. p.107-132.

RUSSELL, J. R.; CLARK, J. T.; KARLEN, D. L.; BUSBY, W. D.; SECOR, L. J.; PETERSON, B.; OLSEN, C. R.; SHOUSE, S.C. Corn crop residue grazing effects on soil physical properties and soybean production in corn–soybean crop rotation. **J. Anim. Sci.** (Suppl. 1), p. 79:419, 1999.

SAENGERKERSUB, S.; HERRERA, P.; WOODWARD, L.; ANDERSON, C.; NISBET, D. J.; RICKE, S. C. Detection of methane and quantification of methanogenic archaea in faeces from young broiler chickens using real-time PCR. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 45, p. 629–634, 2007.

SCHÜTTE, U. M. E.; ABDO, Z.; BENT, S. J.; SHYU, C.; WILLIAMS, C. J.; PIERSON, J. D.; FORMEY, L. J. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v.80, p. 365-380, 2008.

SIRI-PRIETO, G.; REEVES, D.W.; RAPER, R.L.; Bransby, D.; Gamble, B.E.. Integrating winter annual grazing in a cotton-peanut rotation: Forage and tillage system selection. **Proceedings of Sod-Based Cropping Systems Conference**, North Florida Research and Education Center-Quincy, University of Florida. 2003.

SPOSITO, G.; ZABEL, A. The assessment of soil quality. **Geoderma**, Amsterdam, v. 114, n. 3/4, p. 143-144, 2003.

STEINBERG, L. M.; REGAN, J. M. mcrA-Targeted Real-Time Quantitative PCR Method To Examine Methanogen Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 13, p. 4435–4442, 2009.

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

THAUER, R. K. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. **Microbiology**, v. 144, p. 2377–2406, 1998.

THAUER, R.K.; KASTER, A.K., SEEDORF, H. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 579-591, 2008.

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

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

TIEDJE, J. M.; ASUMING-BREMPPONG, S.; NÜSSLEIN, K.; MARSH, L. T.; FLYNN, S. J. Opening the black box of soil microbial diversity. **Applied Soil Ecology**, v. 13, n. 2, p. 109-122, 1999.

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

TORSVIK, V.; ØVREAS, L.; THINGSTAD, T.F. Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, v. 296, p. 1064-1066, 2002.

TRIPLETT, G. B.; DICK, W. A. No-Tillage Crop Production: A revolution in Agriculture, **Agronomy Journal**, Madison, v. 100, n. Supplement_3, p. S153-S165, 2008.

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

TWEDORFF, D.A.; CHANASYK, D.S.; MAPFUMO, E.; NAETH, M.A.; BARON, V.S. Impacts of forage grazing and cultivation on near-surface relative compaction. **Canadian Journal of Soil Science**, v.79, p.465-471, 1999.

VIANNA, M. E.; HOLTGRAEWE, S.; SEYFARTH, I.; CONRADS, G.; HORZ, H. P. Quantitative Analysis of Three Hydrogenotrophic Microbial Groups, Methanogenic Archaea, Sulfate-Reducing Bacteria, and Acetogenic Bacteria, within Plaque Biofilms Associated with Human Periodontal Disease. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 10, p. 3779-3785, 2008.

VOROBÉV, A. V.; BAANI, M.; DORONINA, N. V.; BRADY, A. L., LIESACK, W., DUNFIELD, P. F.; DEDYSH, S. N. *Methyloferula stellatagen. nov., sp. nov.*, an acidophilic, obligately methanotrophic bacterium that possesses only a soluble methane monooxygenase,.**International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 2456-2463, 2011.

WEBLING, R.; PANSTRUGA, R. Rapid quantification of plant powdery mildew interactions by qPCR and conidiospore counts. **Plant Methods**, v. 8, n.1, aug. 2012. Disponível em: <<http://www.plantmethods.com/content/8/1/35>>. Acesso em: 01 nov. 2013.

WHITMAN, W.B.; COLEMAN, D.C.; WIEBE, W.J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 95, p. 6578-6583, 1998.

WILHELM, W.W., J. M. F. JOHNSON, J. L. HATFIELD, W. B. VOORHEES, e D. R. LINDEN. Crop and soil productivity response to corn residue removal. **Agron. J.**, v. 96, p. 1-17. 2004.

ZHENG, D.; RASKIN, L. Quantification of Methanosaeta species in anaerobic bioreactors using genus- and species-specific hybridization probes. **Microb. Ecol.**, v. 39, p. 246-262, 2000.

2 ESTRUTURA DAS COMUNIDADES MICROBIANAS E ABUNDÂNCIA DE METANOGÊNICOS E METANOTRÓFICOS EM DIFERENTES SISTEMAS AGRÍCOLAS CONSERVACIONISTAS E REFLORESTAMENTO DO MUNICÍPIO DE QUERÊNCIA-MT

Resumo

Os microrganismos são responsáveis por diversos processos biológicos essenciais ao ambiente. Algumas espécies participam produzindo ou oxidando o metano (CH₄), um dos gases do efeito estufa, e o resultado líquido desses processos é determinante se os solos liberam para a atmosfera ou o consomem. Mudanças de uso do solo associadas à agricultura, bem como as práticas agrícolas adotadas, às quais provocam severas alterações em suas propriedades físico-químicas, podem alterar tanto a estrutura das comunidades microbianas do solo quanto os processos por elas realizados. Essas mudanças, principalmente quando associadas ao uso inadequado de implementos e insumos agrícolas, podem provocar a diminuição da capacidade de sustentar a produção de alimentos, extenuar os recursos naturais ou estimular o aparecimento de doenças; afetando a qualidade do solo. A adoção de métodos conservacionistas de manejo do solo com integração lavoura-pecuária tem sido utilizada para minimizar os impactos ambientais da exploração agrícola, a fim de preservar as características físicas, químicas e biológicas do solo, estendendo sua resiliência e aumentando a produtividade. A região Norte Mato Grosso é considerada a mais recente fronteira de expansão agrícola do Brasil. Neste estudo foram avaliadas a abundância e a estrutura das comunidades de *Archaea* e *Bacteria* e a potencialidade de atuação do solo como emissor e mitigador de CH₄ através da quantificação dos microrganismos metanogênicos e metanotróficos de áreas agrícolas e reflorestamento do Alto Xingu, no município de Querência. Pelas análises por PCR em tempo real e TRFLP, os sistemas de integração lavoura-pecuária (ILP) apresentaram, de forma sutil, maior estabilidade que o sistema rotacionado de soja/milheto, devido ao sistema radicular da pastagem fornecer maior proteção e liberação de exsudatos; a área de reflorestamento se encontra em uma recuperação transitória com maiores semelhanças aos sistemas ILP, em uma média entre as enzimas de restrição *HhaI* e *MspI*, de 85%; e 65% em relação à floresta, que se estruturou de maneira diferenciada das demais áreas. As áreas agrícolas apresentaram forte influência da calagem o que eleva o pH e concomitantemente teores elevados de Ca e Mg. Já as comunidades de metanotróficas não apresentaram variação em função das metanogênicas.

Palavras-chave: Ecologia microbiana, metanogênicas, metanotróficas, sistemas agrícolas, reflorestamento, qPCR, TRFLP

MICROBIAL COMMUNITIES STRUCTURE AND ABUNDANCE OF METHANOGENS AND METHANOTROPHS IN DIFFERENT AGRICULTURAL CONSERVATIVE TILLAGE SYSTEMS OF CONSERVATION AND REFORESTING AREA AT QUERÊNCIA-MT

Abstract

The microorganisms are responsible for diverse biological processes that are essential to the environment. Some species produce or oxidize methane (CH₄), one of the greenhouse effect gases, and for the net result of these processes is determinant if the soils release to the atmosphere, or consume. Land use changes associated with agriculture, as well as adopted farming practices, which promote severe alterations on physico-chemical properties of the soil, can alter both the structures of soil microbial communities as the process for them performed. These changes, mainly when associated to the inadequate use of farming implements and inputs, can promote the decrease of the capacity to sustain the food production, overdrive the natural resources and stimulate diseases; affecting the soil quality. The adoption of conservationist soil management with crop-livestock integration (CLI) have been used to minimize the environmental impacts of agriculture, to preserve the physical, chemical and biological characteristics, understanding its resilience and growing its productivity. The north region of Mato Grosso State is considered the most recent frontier of agricultural expansion in Brazil. In this study were evaluated the community structures of *Archaea* and *Bacteria*, and the soil potential to be a releaser and mitigator of CH₄ through the quantification of methanogenic and methanotrophic microorganisms from farming and reforesting areas from Alto Xingu, at Querência city. By Real Time PCR and TRFLP analysis, the CLI presented more stability, but subtle, than the rotational soybean/millet system, due to the pasture root system that promotes higher protection and to the release of exudates; the reforesting area is in a transitory recuperation, owning highest similarities with CLI systems, on average between the restriction enzymes *HhaI* and *MspI*, 85%; and 65% in relation to forest, this structures itself in a differentiated manner from the other areas. The farming areas present strong influence of liming, which leads to grow pH and concomitantly high Ca and Mg contents. The methanotrophic community did not vary due to the methanogenic community.

Keywords: Microbial ecology, methanogenics, methanotrophics, farming systems, reforesting, qPCR, TRFLP

2.1 Introdução

Os microrganismos do solo desempenham diversas funções importantes, como a decomposição da matéria orgânica, a manutenção da fertilidade do solo e a ciclagem de nutrientes. Além disso, algumas espécies dos domínios *Bacteria* e *Archaea* envolvidas no ciclo biogeoquímico do carbono são responsáveis por processos metabólicos que levam a produção ou a oxidação do CH₄ (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Atualmente, estas têm sido o foco de diversos estudos, devido a crescente preocupação com a intensificação do efeito estufa.

Tanto os microrganismos produtores de CH₄ quanto os oxidadores são amplamente difundidos no solo e, em geral, podem ser encontrados na mesma área. Os microrganismos metanogênicos ocupam os locais onde são encontradas condições anaeróbias, e os metanotróficos ocupam ambientes óxicos (STEUDLER, 1989). O estudo destas espécies microbianas por meio de técnicas moleculares geralmente tem como alvo a análise de genes funcionais específicos, visto que os *primers* desenvolvidos para a amplificação dos mesmos permitem sua detecção e quantificação em amostras ambientais.

Em geral, as análises são feitas através dos genes *mcrA* e *pmoA*. O gene *mcrA*, que codifica uma subunidade da enzima metil-coenzima M redutase, é comum a todas as arqueias metanogênicas (FRIEDRICH, 2005). Por outro lado, o gene *pmoA* vem sendo amplamente utilizado em estudos de organismos metanotróficos, pois codifica uma subunidade da enzima metano monoxigenase, que oxida o metano em metanol (TUOMIVIRTA et al., 2009).

O resultado líquido dos processos que desempenham é determinante se os solos atuam como fonte ou dreno desse gás, ou seja, se este será liberado para a atmosfera ou consumido (SASS, 1994). Entretanto, as taxas em que tais processos ocorrem podem variar drasticamente em função da ação antrópica. Isso porque o desenvolvimento e a atividade das espécies microbianas são determinados por fatores ambientais, tais como temperatura, umidade, pH e disponibilidade de nutrientes.

Mudanças de uso do solo associadas à agricultura, bem como as práticas agrícolas adotadas, às quais provocam severas alterações em suas propriedades físico-químicas, podem alterar tanto a estrutura das comunidades microbianas do solo quanto os processos por elas realizados (LAUBER et al., 2008). Essas mudanças, principalmente quando associadas ao uso inadequado de implementos e insumos agrícolas, podem provocar a diminuição da capacidade

de sustentar a produção de alimentos, extenuar os recursos naturais ou estimular o aparecimento de doenças; afetando a qualidade do solo (FOLEY et al., 2005)

O Brasil é um dos países que apresenta desmatamento associado às mudanças do uso da terra, principalmente relacionadas à pecuária, agricultura em larga escala e agricultura de corte e queima (RIVERO et al, 2009), sendo considerado um dos países com uma vasta área de cultivo e remanescente florestal, com alto potencial de emissões dos gases do efeito estufa (FEARNSIDE, 2000; BARRETO et al., 2009).

Uma ampla faixa abrangendo o sudeste do Maranhão, norte do Tocantins, sul do Pará, norte de Mato Grosso, Rondônia, sul do Amazonas e sudeste do Acre denominou-se como “Arco do Desmatamento” em consequência do desmatamento ocasionado pela migração e colonização por madeireiros e agricultores provenientes de outras regiões do Brasil.

Querência é um dos municípios fruto dessa expansão agrícola. De acordo com o levantamento realizado pelo IBGE (2012) para a lavoura temporária no município de Querência no ano de 2012, a cultura da soja ocupou 277.398 hectares de área plantada e colhida do município, sendo colhidas 882.126 toneladas, inteirando um rendimento médio de 3.180 kg/ha, o que torna Querência o oitavo entre os municípios de Mato Grosso em produção de grãos de soja em 2012.

Segundo dados da CONAB, a sojicultora nacional tem alcançado recordes em produção e produtividade nos últimos anos. Na safra de 2010/2011, foram colhidas 75.324.000 toneladas em 24.181.000 hectares, perfazendo um rendimento médio de 3.115 kg/ha; a maior produtividade registrada no Brasil. Esse incremento da produção tem causas no manejo adequado do solo utilizando metodologias conservacionistas, como o plantio direto e a integração lavoura-pecuária, bem difundido na região centro-oeste que auxiliam na recuperação da fertilidade do solo em aspectos físicos e químicos (GONÇALVES; FRANCHINI et al., 2007; FRANCHINI et al., 2010).

A avaliação do tipo e extensão do impacto que os diferentes sistemas agrícolas produzem é de extrema importância, já que pode servir de base para determinar quais são aqueles que menos alteram a estrutura e abundância da microbiota do solo como um todo, bem como a de grupos microbianos responsáveis por processos de interesse, como aqueles associados à produção de gases do efeito estufa.

2.2 Objetivos

Determinar a abundância e a estrutura das comunidades de *Archaea* e *Bacteria* do solo e quantificar os genes *mcrA* e *pmoA*, verificando sua relações em sistemas agrícolas de integração lavoura-pecuária e rotação de cultura de soja/milheto comparando com as comunidades das áreas de floresta e reflorestamento.

2.3 Material e métodos

2.3.1 Área de estudo

A área de estudo está localizada no município de Querência, situado na região do Alto Xingu, no Nordeste do Estado do Mato Grosso entre os paralelos 12° 21' S e 12° 24' S e meridianos 52° 13' W e 52° 16' W e altitude de 350 m (Figura 2.1). O município conta com uma área total aproximada de 18 mil km², abrangendo uma extensa área sob vegetação natural composta de: 15% de cerrados; 70% de matas de transição e 10% de florestas tropicais que fazem parte da Amazônia Legal, a qual abriga parte da Reserva Indígena do Xingu (EMPAER, 1996).



Figura 2.1 – Localização do município de Querência - MT (Fonte: Google Maps)

O clima equatorial quente e úmido, com verões chuvosos e inverno curto e seco (Aw/Am) – segundo a classificação de Köppen-Geiger – e a localização no interior do continente favorecem a uma elevada temperatura média anual de 24°C e precipitação média

anual de aproximadamente 1810 mm, com 75% de ocorrência entre os meses de novembro a março (CORRÊA, 2000) (Figura 2.2)

O solo da região é caracterizado como Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico associado a Areias Quartzosas e Latossolo Vermelho-Escuro distrófico e álico, os quais apresentam baixa fertilidade natural e alta saturação de alumínio (EMBRAPA, 1999)

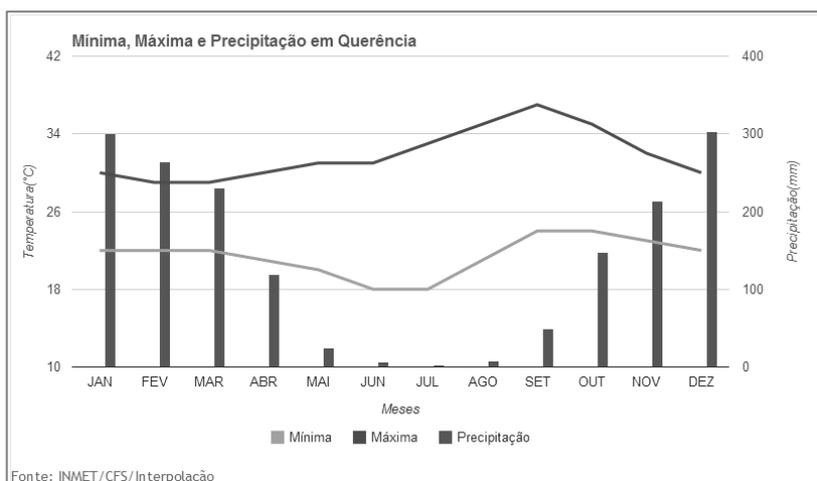


Figura 2.2 – Dados climáticos de temperaturas máximas e mínimas médias e precipitação média em cada mês (Fonte: Climatempo).

2.3.2 Amostragem

De um todo de cinco módulos experimentais com área de 22 ha manejados com plantio direto e sistema integração lavoura-pecuária foram escolhidos os módulos manejados conforme a Tabela 2.1. Ao todo foram amostradas seis áreas: os dois módulos experimentais; duas áreas com alternância de soja/milheto desmatadas em 1996 e outra em 2004; uma área de reflorestamento iniciado desde 2007, que anteriormente era uma pastagem, e uma área de fragmento florestal adjacente às áreas de integração lavoura-pecuária.

Em cada área, foram amostrados cinco pontos, distados em 100 m e em ziguezague devido à conformação das áreas experimentais, compostos por cinco subpontos (Figura 2.3a). As amostras foram coletadas utilizando tubos de PVC de 10 cm de comprimento por 5 cm de diâmetro, introduzindo-os no solo verticalmente.

Após a coleta, as amostras foram seladas nos tubos, armazenadas e mantidas sob baixa temperatura em caixas térmicas com gelo e enviadas para o Laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA/USP).

Tabela 2.1 – Descrição da rotação de culturas das áreas amostrais: os módulos experimentais sob sistema de plantio direto com diferentes rotações ao longo dos ciclos de cultivo (ILP) (FRANCHINI et al., 2010).

SAFRA	MÓDULOS	
	ILP A	ILP B
2007/2008	Soja	Arroz (plantio direto)
2008	Milho + <i>Brachiaria ruziziensis</i>	Sorgo + <i>B. brizantha</i> cv. Marandu e cv. Piatã
2008/2009	Soja	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu e cv. Piatã
2009	Milho + <i>B. ruziziensis</i>	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu e cv. Piatã
2009/2010	Soja	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu e cv. Piatã
2010	Milho + <i>B. brizantha</i> cv. Piatã	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu e cv. Piatã
2010/2011	<i>B. brizantha</i> cv. Piatã	Soja
2011	<i>B. brizantha</i> cv. Piatã	Sorgo + <i>B. brizantha</i> cv. Marandu e cv. Piatã
2011/2012	<i>B. brizantha</i> cv. Piatã	Milho
2012	<i>B. brizantha</i> cv. Piatã	Sorgo + <i>B. brizantha</i> cv. Marandu e cv. Piatã
2012/2013	Soja	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu e cv. Piatã

As amostras provenientes dos subpontos de cada ponto foram homogeneizadas, e de cada amostra composta resultante foi retirada uma alíquota para armazenamento em ultrafreezer, Glacier Ultra Low Freezer (Nuair Corporation), a -80°C para a extração de DNA. O restante foi enviado ao Laboratório de Análises Químicas do Departamento de Ciências do Solo, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), para as análises físico-químicas (Figura 2.3b).



Figura 2.3 – (a) Esquema da amostragem dos 5 pontos, constituídos por 5 subpontos, distantes em 100 m, e (b) os 5 pontos de cada área destinadas as análises químicas.

2.3.3 Extração do DNA total do solo

A extração do DNA total das amostras de solo coletadas foi realizada utilizando o *Kit PowerLyzer PowerSoil DNA Extraction*TM (MoBIO Laboratories, Carlsbad, CA) de acordo com as instruções do fabricante, descritas a seguir, com algumas modificações:

De cada amostra foram adicionados 350 mg de solo em tubo de 2 mL (Glass Tube 0,1mm), neste foi pipetado 1050 μ L de Bead Solution e agitado brevemente. Adicionou-se 60 μ L da solução C1 invertendo o tubo várias vezes e, então, preso ao adaptador do Vortex-Genie 2 (MoBIO Laboratories, Carlsbad, CA) e agitado por 15 min à velocidade máxima. Após a agitação, o tubo foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 30 s, do qual foi retirado 450 μ L do sobrenadante e transferido para um novo tubo; neste foi adicionado 250 μ L da solução C2 e vortexou-se por 5s com posterior incubação a 4°C por 5 min. A seguir, centrifugou-se a $10.000 \times g$ por 1 min e 600 μ L do sobrenadante foi transferido para um novo tubo; adicionou-se 200 μ L da solução C3 com breve agitação e novamente incubado a 4°C por 5 min. Logo após foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 1 min e transferiu-se até 750 μ L do sobrenadante a um novo tubo; então, foram colocados 1200 μ L da solução C4 com breve agitação. Após essa etapa, foram carregados 675 μ L da solução no tubo contendo a coluna e centrifugado a $10.000 \times g$ por 1 min com posterior descarte do líquido filtrado pela coluna, novamente a solução é carregada na coluna até finalizar a solução contida no tubo. Após, adicionou-se 500 μ L da solução C5 na coluna e centrifugou-se a $10.000 \times g$ por 30 segundos; descartou-se o sobrenadante e centrifugou-se novamente o tubo com a coluna vazia por mais 1 minuto a $10.000 \times g$; após essa etapa, a coluna foi transferida para um novo tubo do kit e foi adicionado 100 μ L da solução C6 no centro da coluna; centrifugou-se por 30 segundos a $10.000 \times g$ e obteve-se o DNA extraído das amostras.

Para a confirmação da qualidade da extração, uma alíquota de 5 μ L do DNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) corado com GelRedTM (Uniscience) em tampão SB (BRODY & KERN, 2004). Como padrão molecular foi utilizado 2 μ L de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen). O gel foi submetido a um campo elétrico de 90 V por aproximadamente 30 minutos.

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

2.3.4 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

As reações de PCR quantitativo foram realizadas no sistema *StepOne Plus*TM (Applied Biosystems) para os genes: 16S rRNA de *Archaea* e *Bacteria*; *mcrA* (metanogênicas) e *pmoA* (metanotróficas), tendo as condições estabelecidas nos respectivos trabalhos de referência dos *primers* com modificações quando necessário (Tabela 2.2). Ao final da reação foi incluída uma curva de *melting* nas seguintes condições 95°C por 15 s, a temperatura de anelamento do primer por 1 min e aumentada gradativamente, com leitura dos dados, a cada 0,7°C até 95°C.

As curvas padrões foram obtidas, realizando ampliações com o número de cópias do DNA padrão diluído em série (1:10) nos intervalos de 10^7 a 10^3 genes/ μ L (*Archaea*) e de 10^8 a 10^4 genes/ μ L (*Bacteria*). Desta maneira, os dados da amplificação do DNA extraído de amostras ambientais foram interpolados, para determinar o número de cópias do gene de interesse na amostra avaliada. Também foram colocadas duas amostras como referencial entre as placas de mesmo gene para posterior equalização dos dados.

Todas as reações foram preparadas para um volume final de 10 μ L, contendo concentrações finais de: 1X Sybr Green (Fermentas); 0,5 μ M de cada primer; o volume da amostra extraída indicada na Tabela 2.2, e completado com água desionizada estéril. Os valores de Cts (*cycle threshold*) foram utilizados para normalizar os dados obtendo as quantidades de DNA passíveis de amplificação de cada amostra.

2.3.5 PCR – T-RFLP

2.3.5.1 Amplificação dos genes 16S rRNA de *Archaea* e *Bacteria*

As reações de PCR para uso acoplado a técnica de T-RFLP foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) para os genes 16S rRNA de *Archaea* e *Bacteria*, seguindo as condições estabelecidas (Tabela 2.2). Para a detecção de fluorescência na análise de T-RFLP em sequenciado automático, a extremidade 5' dos *primers* 21F e 27F foram marcadas com 6-carboxyfluorescein (FAM).

Tabela 2.2 – *Primers* utilizados nas reações de qPCR e TRFLP com seus programas de amplificação e variações no preparo das reações.

Gene	Primer	Sequência	Fragmento (pb)	Referência	Programa de amplificação / quantidade de DNA
16S Archaea	ARC787F	ATTAGATACCCSBGTAGTCC	273	Yu et al. (2005)	95°C - 5 min; 46 ciclos, 95°C - 15 s, 57°C - 20 s, 72°C - 30 s / 1 µL de DNA extraído
	ARC1059R	GCCATGCACCCWCCCTCT			
16S Bacteria	U968F	GAACGGGAAGAACCCTTAC	419	Heuer et al. (1997)	95°C - 5 min; 40 ciclos, 95°C - 15 s, 56°C - 30 s, 72°C - 45 s / 1 µL de DNA extraído
	1387R	GGGCGGWGTGTACAAGGC		Marchesi et al. (1998)	
<i>mcrA</i>	LuF	GGTGGTGTMGGATTTCACACART AYGCWACAGC	464	Luton (2002)	95°C - 5 min; 42 ciclos, 95°C - 30 s, 58°C - 30 s, 72°C - 45 s / 3 µL de DNA extraído
	LuR	TTCATTGCRTAGTTWGGRTAGTT			
	A189F	GGNGACTGGGACTTCTGG			
<i>pmoA</i>	Mb661R	CCGGMGCAACGTCYTTACC	491	Holmes et al. (1995) Costello; Lidstrom (1999)	95°C - 5 min; 42 ciclos, 95°C - 30 s, 58°C - 30 s, 72°C - 45 s / 2 µL de DNA extraído
16S Archaea	21F-FAM	TTCYGGTTGATCCYGCCGGA	937	DeLong (1992)	95°C - 5 min; 35 ciclos, 95°C - 15 s, 53°C - 30 s, 72°C - 45 s / 1 µL de DNA extraído
	958R	YCCGGCGTTGAMTCCAATT			
16S Bacteria	27F-FAM	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1465	Amann; Ludwig; Schleifer (1995)	95°C - 5 min; 35 ciclos, 95°C - 15 s, 59°C - 30 s, 72°C - 45 s / 1 µL de DNA extraído
	1492R	ACCTTGTTACGACTT			

Todas as reações foram preparadas para um volume final de 35 μL , contendo concentrações finais de: 1X de tampão PCR; 0,75 mM de MgCl_2 ; 0,5 mM de dNTPs; 0,2 μM de cada primer; 1% de BSA; e 1 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen); 1 μL da amostra extraída e água desionizada estéril para completar o volume.

Para a verificação do tamanho dos *amplicons* resultantes de cada reação foi retirada uma alíquota de 5 μl e submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) corado com GelRed™ (Uniscience) em tampão SB (BRODY & KERN, 2004). Como padrão molecular foi utilizado 2 μl de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen). O gel foi submetido a um campo elétrico de 90 V por aproximadamente 30 minutos.

2.3.5.2 Purificação dos produtos de PCR-TRFLP

Os produtos de PCR-TRFLP foram purificados utilizando o Kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante:

Adicionou-se o *Capture buffer type 3* em uma proporção de 5:1 (150 μL) ao produto de PCR (30 μL) e a mistura foi transferida para uma coluna GFX (com filtro), sendo centrifugada a $16.000 \times g$ por 30 s. O filtrado foi descartado para adicionar 500 μL de *Wash buffer type 1* na coluna GFX e centrifugou-se a $16.000 \times g$ por 30 s, descartando o filtrado e então centrifugou-se a $16.000 \times g$ por 1 min para certificar que resíduos do *Wash buffer type 1* foram eliminados. Logo após, a coluna foi transferida para um novo tubo e, para a eluição do DNA, foi adicionado 20 μL do *Elution buffer type 4* no centro da membrana. Incubou-se a mistura por 1 min à temperatura ambiente e centrifugou-se a $16.000 \times g$ por 1 min para recolher o DNA purificado.

Uma alíquota de 5 μL do DNA purificado foi analisada em gel de agarose 1% (p/v) em tampão SB (BRODY; KERN, 2004), utilizando como padrão molecular 2 μL de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology). O gel foi submetido a um campo elétrico de 90 V por aproximadamente 30 min.

2.3.5.3 Reação de restrição dos produtos de PCR-TRFLP

Nas reações de restrição dos produtos de PCR-TRFLP purificados foram utilizadas as endonucleases *HhaI* (GCG[^]C) e *MspI* ou *HpaII* (C[^]CGG), por apresentarem melhores

resultados para distinguir comunidades microbianas (MARSH et al., 2000) e elevada abrangência de sequências do banco de dados do RDP e de sequências únicas de acordo com a ferramenta ERPA do MiCA (<http://mica.ibest.uidaho.edu/enzyme.php>) (SHYU et al., 2007).

As reações foram preparadas para um volume final de 15 μL , contendo concentrações finais de: 1X Buffer (React ou Tango, dependendo da enzima de restrição); 1% de BSA; 0,06 U de endonuclease (Invitrogen); 5 μL do produto de PCR-TRFLP purificado e água desionizada estéril para completar o volume. As reações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) nas condições: 37°C por 3h e 68°C por 10 min para inativar a endonuclease.

2.3.5.4 Precipitação dos produtos da restrição

Após a reação de restrição faz-se necessário precipitar os produtos para análise de fragmentos no sequenciador automático. Para a precipitação foram misturados 2 μL de tampão Acetato de Sódio/EDTA e, então, adicionou-se 60 μL de etanol absoluto com leve agitação no vortex e centrifugada por 15 min a $12.000 \times g$, descartando o sobrenadante. Foram adicionados 150 μL de etanol 70% recém-preparados e centrifugou-se a $12.000 \times g$ por 5 min. O sobrenadante foi eliminado e o precipitado foi seco em concentrador (Concentrator 5301, Eppendorf) a 45°C por aproximadamente 10 minutos. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até posterior utilização.

2.3.5.5 Análise do polimorfismo dos fragmentos terminais de restrição (TRFLP)

A análise dos fragmentos terminais de restrição (TRFs) foi feita em sequenciador automático ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Para o carregamento das amostras no sequenciador, o produto precipitado foi ressuspenso em mistura contendo 9,75 μL de Formamida HiDi e 0,25 μL de padrão de comprimento *GeneScan*TM – 500 *ROX*TM *Size Standard* (Applied Biosystems). Antes do carregamento as amostras foram desnaturadas por 5 min a 95°C e resfriadas a 0°C por 4 min.

2.3.6 Processamento de dados

Os dados do qPCR foram obtidos pelo *StepOne Software 2.2.2* (Applied Biosystems), deste foram exportados para o programa Microsoft Excel (Microsoft) onde foram calculados as quantidades de cópias do gene para cada grama de solo. A partir desses dados foram realizadas as análises estatísticas utilizando o programa SAS 9.3 (SAS Institute).

Os dados de TRFLP obtidos foram analisados com o programa PeakScanner v1.0 (Applied Biosystems) observando a qualidade das corridas, os quais foram exportados para o programa Microsoft Excel (Microsoft) no qual foram organizados para a análise multivariada. Onde, nas amostras de *Bacteria*, foi usada uma linha base limite de 50 unidades de fluorescência para discriminar os “picos verdadeiros” dos ruídos provenientes da técnica, sendo descartados os abaixo desse valor (CULMAN et al., 2008); e para *Archaea*, 20 unidades de fluorescência. Neste também, os dados absolutos dos picos foram transformados em dados relativos com valores percentuais de detecção, através da divisão de cada valor de tamanho de pico pelo valor total dos picos da amostra (CULMAN et al., 2008). Após a montagem da matriz dos dados, os dados foram ordenados e filtrados para que fossem distinguidos os picos verdadeiro; que podem diferir em média 3 pares de base (bp) (KAPLAN; KITTS, 2003), e alinhados por tamanho dos picos e transformada em uma matriz de distância, usando a medida de Hellinger (LEGENDRE; GALLAGHER, 2001). As análises estatísticas foram realizadas através dos programas SAS 9.3 (SAS Institute, Cary, Estados Unidos) e PAST 3 (Natural History Museum, University of Oslo, NO), Canoco for Windows 4.5 (Biometris, Wageningen, Holanda) e Primer6 (Plymouth Marine Laboratory, Primer-E, Reino Unido).

2.3.7 Resultados e discussão

2.3.7.1 Análises físico-químicas

Através da análise de componentes principais (PCA) realizada com dados químicos do solo (Figura 2.4) foram revelados agrupamentos distintos das áreas de floresta e rotação soja/milheto. Já no que se refere às demais áreas houve um agrupamento pouco pronunciado entre as áreas de ILP e reflorestamento; o que pode ter ocorrido por este ainda se encontrar em estágio inicial de formação, sendo composto por arvoretas e gramíneas.

Fatores como o pH, cálcio (Ca), matéria orgânica (M.O.) e alumínio (Al) são os principais aspectos de diferenciação das áreas, ao referenciar as amostras em seu transecto – próximos ao eixo 1, com 64,8% e 62,2% de explicabilidade dos dados dos anos 2012 e 2013, respectivamente. Todavia as áreas também sofrem grande influência do magnésio (Mg) e fósforo (P).

O pH das áreas de cultivo se mostrou alto em relação a área de floresta devido ao processo da calagem, corrigindo a acidez do solo para o plantio das culturas (Tabela 2.3). Por esse fato, há a redução das concentrações de alumínio disponível e também uma maior disponibilidade de cálcio e magnésio nessas áreas (EMBRAPA, 2011). Todavia, nas áreas de ILP o cálcio e o magnésio sofreram redução, em relação às áreas de soja/milheto, pela exportação desse nutriente através forrageio das gramíneas pelo gado (BALL et al., 2007). Tal fenômeno em contrapartida, não ocorre na área cultivada com a soja onde a palhada permanece no local, praticamente em sua totalidade, devolvendo esses nutrientes ao solo.

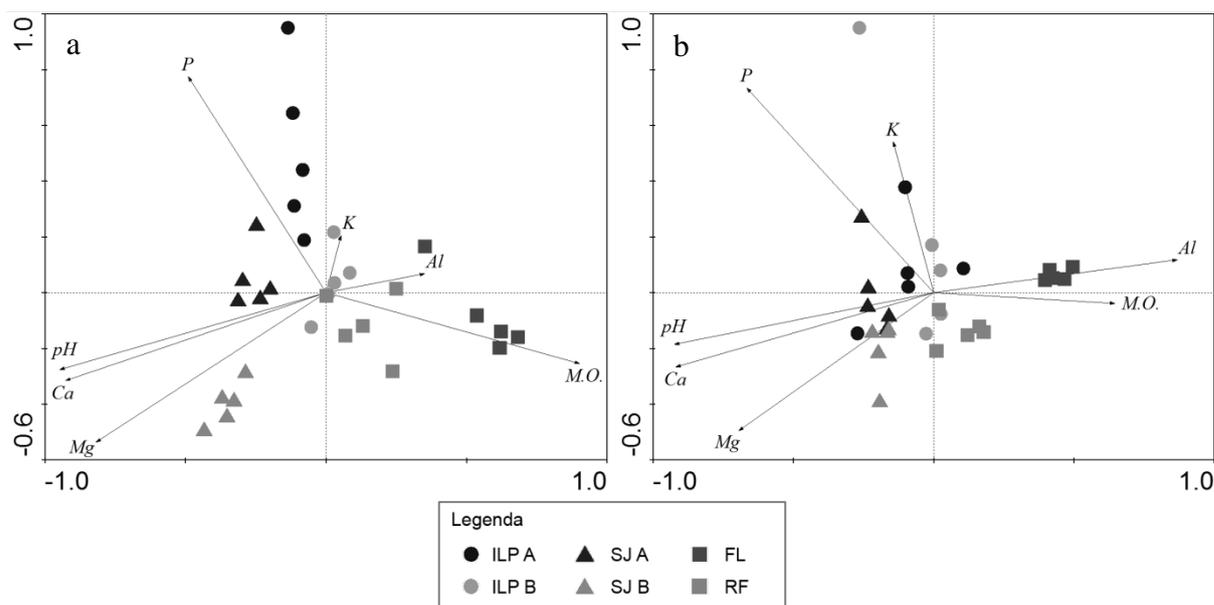


Figura 2.4 – Análise de componentes principais dos dados físico-químicos do solo das amostras coletadas em 2012 (a) e 2013 (b). Os eixos 1 e 2 apresentaram valores de 64,9% e 20% de explicabilidade, respectivamente, para 2012, e 62,2% e 20,5% para 2013. **ILP A e B**: áreas integração lavoura-pecuária; **SJ A e B**: áreas de soja/milheto desmatadas em 1996 e 2004, respectivamente; **RF**: área de reflorestamento e **FL**: área de fragmento florestal. M.O – matéria orgânica.

Tabela 2.3 - Caracterização físico-química dos solos de integração lavoura-pecuária, rotação soja/milheto, reflorestamento e fragmento florestal.

Amostra	pH*	P*	K	Ca*	Mg*	Al	H+Al	SB	CTC	V*	m	Umid.	M.O.*	Areia	Silte	Argila	
Ano	Área	mg.Kg ⁻¹			mmolc.Kg ⁻¹					%	%		g.Kg ⁻¹				
2012	ILP A	4,8 ^c	24,8 ^e	1,3	19,4 ^{jk}	7,6 ^o	1,8	23,0	28,1	51,1	55,4 st	17,9	32,6 ^{wxyz}	637,2	26,8	336,0	
	ILP B	4,7 ^c	11,6 ^e	1,0	19,4 ^{jk}	10,0 ^{no}	1,6	25,8	30,6	56,5	53,8 ^t	17,5	38,6 ^{wxyz}	619,0	44,6	336,2	
	SJA	5,5 ^b	14,4 ^e	1,3	28,4 ^{hij}	13,6 ^{mn}	<1,0	15,0	43,5	58,5	74,4 ^t	0,0	13,4	28,6 ^z	656,6	32,0	311,6
	SJB	6,0 ^a	10,4 ^e	0,8	38,0 ^h	22,6 ^m	<1,0	11,4	60,9	72,5	83,8 ^t	0,0	16,9	33,8 ^{wxyz}	624,6	59,4	316,2
	RF	4,6 ^c	5,2 ^f	0,9	15,0 ^k	10,8 ^{no}	4,0	37,0	26,9	63,7	43,2 ^t	12,6	17,7	41,2 ^{wxy}	676,0	68,0	256,0
	FL	3,7 ^d	3,2 ^{fg}	1,1	3,4 ^l	2,6 ^p	2,8	67,8	7,5	75,4	9,8 ^u	26,0	18,5	58,6 ^v	600,8	67,6	331,6
2013	ILP A	4,9 ^c	18,4 ^e	0,8	27,0 ^j	11,8 ^{no}	1,6	34,4	39,6	74,1	53,4 ^t	17,0	33,2 ^{wxyz}	620,4	23,6	356,0	
	ILP B	5,0 ^c	21,4 ^e	3,1	21,2 ^{jk}	11,4 ^{no}	1,0	36,0	35,7	71,8	49,6 ^t	17,7	35,2 ^{wxyz}	592,8	21,2	386,0	
	SJA	5,7 ^{ab}	20,0 ^e	1,3	35,8 ^{hi}	16,2 ^{mn}	<1,0	21,0	53,5	74,7	72,0 ^{rs}	0,0	17,7	31,8 ^{yz}	669,8	19,6	310,8
	SJB	5,4 ^b	12,6 ^e	0,6	35,4 ^{hi}	22,4 ^m	<1,0	24,2	52,2	82,3	70,8 ^{rs}	0,0	18,2	32,0 ^{xyz}	619,4	24,2	356,4
	RF	4,7 ^c	6,4 ^f	1,2	16,8 ^k	16,8 ^{mn}	2,0	52,8	34,9	87,7	39,4 ^t	6,6	21,9	43,2 ^{wxx}	691,2	18,0	291,0
	FL	3,7 ^d	2,2 ^g	0,8	4,2 ^l	2,8 ^p	23,6	98,4	8,0	106,2	7,4 ^u	75,4	18,7	44,4 ^{vw}	608,4	23,0	368,6

Métodos: pH em KCl; P – Mehlich 1; K, Ca, Mg – extração pelo acetato de amônio; Al – extração pelo KCl 1mol.L⁻¹; H+Al – extração Ca(CH₃OO)₂.H₂O; Matéria orgânica (M.O.) - dicromato/titométrico; Areia, silte e argila - Bouyoucos (densímetro), S.S.S.A. Book Series: 5 Methods of Soil Analysis Part4 - Classe de diâmetro (mm) U.S.D.A. **ILP A e B:** áreas de integração lavoura-pecuária; **SJ A e B:** áreas de soja/milheto desmatadas em 1996 e 2004, respectivamente; **RF:** área de reflorestamento e **FL:** área de fragmento florestal.

H+Al: acidez potencial; **SB:** soma de bases; **CTC:** capacidade de troca catiônica; **V:** saturação por bases; **m:** saturação por alumínio; **Umíd.:** umidade; **M.O.:** matéria orgânica. *As médias com mesma letra não são significativamente diferentes. (Tukey, p ≤ 0.05)

A maior disponibilidade de fósforo no solo está relacionada com as áreas de cultivo, (áreas de ILP e SJ) onde ocorre a fertilização na troca da cultura, contudo a área com a maior permanência da pastagem recente (ILP A de 2012) (Tabela 2.1) houve um aumento nas concentrações de fósforo devido a fertilização a cada 2 anos, de acordo com as recomendações de Franchini et al. (2010), para a manutenção da saúde da pastagem.

Observando as concentrações de matéria orgânica, é possível concluir que o longo tempo de adoção do plantio direto nas áreas permitiu elevação expressiva de seus teores. No entanto as concentrações encontradas na área de floresta ainda se conservam maiores e o aumento gradual da área de reflorestamento.

Quanto à fertilidade do solo, os sistemas em rotação de soja/milheto apresentaram valores elevados de saturação por bases (V%), sendo classificados como férteis ($V\% \geq 50\%$) (RONQUIM, 2010), seguidos dos sistemas ILP que ostentam uma fertilidade moderada, no entanto, com menor gasto em fertilizantes.

2.3.7.2 Extração do DNA total do solo

Foram realizadas duas extrações de DNA do solo para cada ponto amostral. Para as amostras que apresentaram diferenças discrepantes, pertencentes ao mesmo ponto, foi realizada uma terceira extração para averiguá-las; selecionando as similares. As amostras apresentaram concentrações entre $8 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ a $80 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

2.3.7.3 Análise de PCR quantitativa

Os dados obtidos foram corrigidos, de acordo com a quantidade de amostra utilizada na reação, e transformados em número de cópias dos genes por grama de solo (Figura 2.5 e 2.6; Tabela A.1).

A comparação dos dados do número de cópias dos genes de 16S de *Archaea* e *Bacteria*, tanto em relação ao tempo (2012 e 2013), como entre as áreas mostrou-se de uma maneira quase constante, não havendo diferenças significativas; exceto para *Archaea* na área de reflorestamento em ambos os anos, com valores abaixo dos demais, variando em média de $3,1 \times 10^5$ a $8,0 \times 10^5$ cópias do gene.

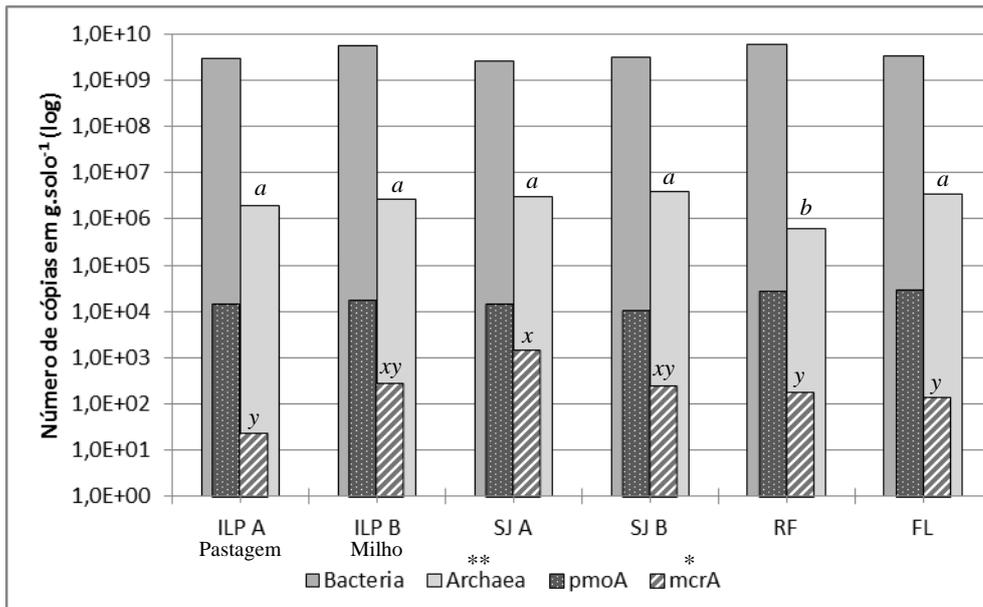


Figura 2.5 – Gráfico comparativo da quantificação dos genes *pmoA* e *mcrA* correlacionados com os genes 16S de *Bacteria* e *Archaea*, respectivamente. **ILP A e B**: áreas integração lavoura-pecuária; **SJ A e B**: áreas de soja/milho desmatadas em 1996 e 2004, respectivamente; **RF**: área de reflorestamento e **FL**: área de fragmento florestal. Houve diferenças significativas entre as áreas: *(Tukey, $p \leq 0,05$) e *(Tukey, $p \leq 0,01$); em que as letras iguais não diferem significativamente. No momento da coleta cultura presente referente a safra 2011/2012 na área de ILP A era pastagem; em ILP B, milho.

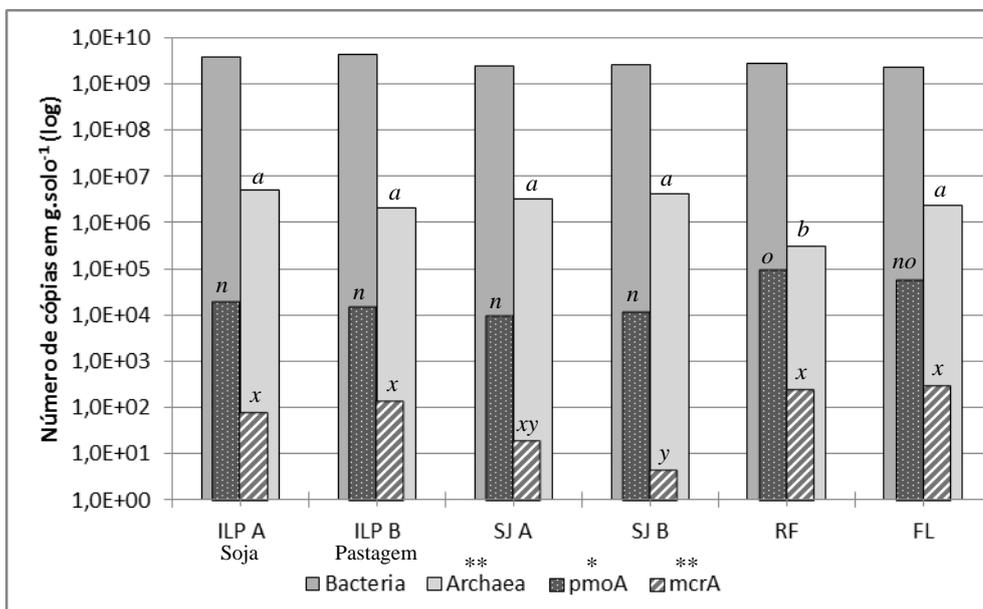


Figura 2.6 – Gráfico comparativo da quantificação dos genes *pmoA* e *mcrA* correlacionados com os genes 16S de *Bacteria* e *Archaea*, respectivamente. **ILP A e B**: áreas integração lavoura-pecuária; **SJ A e B**: áreas de soja/milho desmatadas em 1996 e 2004, respectivamente; **RF**: área de reflorestamento e **FL**: área de fragmento florestal. Houve diferenças significativas entre as áreas: *(Tukey, $p \leq 0,05$) e *(Tukey, $p \leq 0,01$); em que as letras iguais não diferem significativamente. No momento da coleta cultura presente referente a safra 2012/2013 na área de ILP A era soja; em ILP B, pastagem.

Para os gene *pmoA* houve uma diferenciação das amostras de reflorestamento e floresta com relação aos sistemas de cultivo, para o ano de 2013, entretanto não houve diferença na quantificação de um ano para o outro.

Por outro lado, o gene *mcrA* apresentou as maiores variações entre as áreas de cultivo. No sistema ILP A, no ano de 2012, cujo histórico dispõe de uma maior permanência de pastagem recente, apresentou uma menor quantidade de cópias do gene em relação ao sistema ILP B, SJ A e B; entretanto aumentou após a conversão para a cultura de soja, no ano de 2013. No sistema ILP B ocorreu ao contrário ao converter a área de milho em consórcio de sorgo e pastagem, entretanto essas mudanças não foram significativas a ponto de formar um agrupamento de Tukey distinto. Nos sistemas de rotação soja/milheto houve uma queda expressiva de um ano para o outro, todavia não há causas aparentes.

Uma análise geral da variação de *mcrA*, entre as áreas, pode ser constatado que há uma maior estabilidade dos dois sistemas de ILP e das áreas de reflorestamento e floresta, onde há menor ou praticamente nenhum movimento no solo, ou ainda um maior efeito rizosférico de proteção do solo, mostrando a sensibilidade no desenvolvimento das metanogênicas a estas variações. Esta sensibilidade é decorrente da necessidade de ambientes anaeróbicos e com altas concentrações de matéria orgânica (RADL et al., 2007).

2.3.7.4 Análise de PCR-TRFLP

A partir da matriz de dados obtida foi realizada a verificação da equitabilidade das amostras, que indica o padrão de distribuição de indivíduos de cada uma das espécies em relação ao total de indivíduos desta comunidade, em que infere sobre a robustez dos resultados (PIELOU, 2000) (Tabela 2.4). De acordo com o índice houve uma equitabilidade maior das amostras de *Bacteria* para ambas as enzimas de restrição, em contra partida, as amostras de *Archaea* apresentaram índices menores com exceção das amostras de *HhaI* do ano de 2013.

Também foram efetuadas análises de similaridade entre as áreas para observar relação de diferenças na composição das comunidades para os anos de 2012 (Tabelas 2.5 e 2.6) e 2013 (Tabelas 2.7 e 2.8).

Nas amostras de 2012, as relações indicam uma maior similaridade das comunidades bacterianas dos sistemas agrícolas entre si, acima de 78% para ambas as enzimas. Por outro lado, a floresta é a mais diferente das áreas com valores abaixo de 6% para a enzima *HhaI* e o

reflorestamento se encontra em um estágio transitório, que apresenta valores próximos aos sistemas ILP (acima de 80% com relação a enzima *MspI*), por apresentar grande quantidade de gramíneas em meio as arvoretas.

Tabela 2.4 - Equitabilidade das amostras - Índice de Pielou* (J').

Ano	Área	<i>Bacteria</i>		<i>Archaea</i>	
		<i>HhaI</i>	<i>MspI</i>	<i>HhaI</i>	<i>MspI</i>
2012	ILP A	0,7375	0,9019	0,6390	0,2459
	ILP B	0,7601	0,8820	0,6502	0,2335
	SJ A	0,8237	0,8301	0,6532	0,3074
	SJ B	0,8602	0,8579	0,6899	0,3214
	RF	0,9322	0,8559	0,6550	0,1449
	FL	0,8623	0,8401	0,5510	0,3125
2013	ILP A	0,9176	0,9293	0,8717	0,2711
	ILP B	0,7691	0,9300	0,8785	0,1822
	SJ A	0,9224	0,9351	0,7280	0,2825
	SJ B	0,9384	0,9200	0,6793	0,2185
	RF	0,8925	0,9029	0,9011	0,1336
	FL	0,9042	0,8904	0,6797	0,3695

*Quanto mais próximo de 1 maior é a equitabilidade da amostragem

Tabela 2.5 – Relação de similaridade entre as áreas a partir dos TRFs do gene 16S de *Bacteria*, clivados pelas endonucleases *HhaI* e *MspI* das amostras coletadas em 2012.

2012	<i>Bacteria</i>	ILP A	ILP B	SJ A	SJ B	RF	FL
<i>HhaI</i>	ILP A		92,79%	91,49%	89,95%	88,58%	58,82%
	ILP B	96,30%		79,19%	78,18%	95,36%	68,89%
	SJ A	94,68%	95,62%		98,34%	77,04%	46,65%
	SJ B	91,32%	94,84%	96,70%		75,48%	43,78%
	RF	58,25%	68,38%	61,91%	66,85%		81,07%
	FL	0,77%	0,56%	5,32%	3,85%	45,83%	

ILP A e B: áreas integração lavoura-pecuária; SJ A e B: áreas de soja/milheto desmatadas em 1996 e 2004, respectivamente; RF: área de reflorestamento e FL: área de fragmento florestal.

Tabela 2.6 – Relação de similaridade entre as áreas a partir dos TRFs do gene 16S de *Archaea*, clivados pelas endonucleases *HhaI* e *MspI* das amostras coletadas em 2012.

2012	<i>Archaea</i>	ILP A	ILP B	SJ A	SJ B	RF	FL
<i>HhaI</i>	ILP A		94,56%	92,30%	94,41%	88,50%	60,99%
	ILP B	95,37%		94,33%	96,40%	91,48%	45,33%
	SJ A	88,72%	95,25%		97,91%	87,70%	40,42%
	SJ B	88,71%	95,68%	94,82%		91,89%	42,88%
	RF	88,46%	92,17%	92,01%	96,64%		49,59%
	FL	83,51%	75,78%	76,70%	76,95%	80,00%	

ILP A e B: áreas integração lavoura-pecuária; SJ A e B: áreas de soja/milheto desmatadas em 1996 e 2004, respectivamente; RF: área de reflorestamento e FL: área de fragmento florestal.

Já para as amostras de *Archaea*, em 2012, houve uma categorização entre as áreas de mesmo manejo, porém não muito pronunciadas, em que as similaridades são elevadas de modo geral, revelando uma provável diversidade baixa entre as áreas e em relação à *Bacteria* (ALLER; KEMP, 2008). Novamente a área florestal apresentou as maiores diferenças para a enzima *MspI*.

Tabela 2.7 – Relação de similaridade entre as áreas a partir dos TRFs do gene 16S de *Bacteria*, clivados pelas endonucleases *HhaI* e *MspI* das amostras coletadas em 2013.

2013	<i>Bacteria</i>	ILP A	ILP B	SJ A	SJ B	RF	FL
<i>HhaI</i>	ILP A		94,24%	82,24%	82,56%	86,78%	39,58%
	ILP B	53,96%		89,07%	87,37%	85,02%	41,84%
	SJ A	45,56%	48,34%		91,87%	83,47%	32,32%
	SJ B	52,21%	68,04%	78,53%		81,89%	17,73%
	RF	52,06%	64,65%	78,60%	63,50%		41,80%
	FL	17,34%	14,12%	48,26%	23,35%	56,85%	
							<i>MspI</i>

ILP A e B: áreas integração lavoura-pecuária; **SJ A e B:** áreas de soja/milheto desmatadas em 1996 e 2004, respectivamente; **RF:** área de reflorestamento e **FL:** área de fragmento florestal.

Tabela 2.8 – Relação de similaridade entre as áreas a partir dos TRFs do gene 16S de *Archaea*, clivados pelas endonucleases *HhaI* e *MspI* das amostras coletadas em 2013.

2013	<i>Archaea</i>	ILP A	ILP B	SJ A	SJ B	RF	FL
<i>HhaI</i>	ILP A		99,89%	99,99%	99,97%	99,81%	99,40%
	ILP B	99,25%		99,89%	99,91%	99,94%	99,50%
	SJ A	95,88%	95,51%		99,95%	99,80%	99,40%
	SJ B	95,81%	95,65%	98,96%		99,90%	99,44%
	RF	96,99%	97,37%	93,54%	93,28%		99,50%
	FL	87,11%	85,64%	84,86%	84,92%	87,16%	
							<i>MspI</i>

ILP A e B: áreas integração lavoura-pecuária; **SJ A e B:** áreas de soja/milheto desmatadas em 1996 e 2004, respectivamente; **RF:** área de reflorestamento e **FL:** área de fragmento florestal.

No ano de 2013, houve uma perturbação que afetou a correlação da comunidade *Bacteria*, onde as áreas e de soja reduziram de 96,7% a 78,53% para *HhaI* e de 98,34% a 91,87% para *MspI*, e a área florestal variou para ambas as enzimas de restrição, aumentando a similaridade para *HhaI* e diminuído para *MspI*, mas vale lembrar, que também apresenta uma vegetação heterogênea onde há maior chance de amostrar áreas sob influência de espécies arbóreas diferentes, criando microhabitats distintos. (GRAYSTON; VAUGHAN; JONES, 1997; MARTINY et al, 2011). E a mesma perturbação afetou a comunidade de *Archaea* elevando a similaridade de quase todos os valores para ambas as enzimas de restrição.

Todavia, a redução notória da similaridade das áreas de ILP entre si, de 96,3% a 53,96% para a enzima *HhaI*, e também para todas as áreas, mas se manteve estável para *MspI*,

pode ser referente a alteração da cultura de pastagem à soja (ILP A) e milho à pastagem (ILP B); contribuindo para que a área de reflorestamento, cuja similaridade aumentou, se aproxima-se das áreas de soja. As demais relações se mantiveram relativamente estáveis

A elevada similaridade encontrada entre os sistemas de mesmo manejo, no ano de 2012, e a indissociação aparente de algumas áreas, em 2013, confirma a afinidade aos dados químicos (Figura 2.4) das áreas para a modulação da estrutura da comunidade. Nesse sentido, foram realizadas análises multivariadas para dimensionar e observar os grupos de organismos e sua exposição às condições ambientais.

Para isto, os dados foram organizados em matrizes NMDS (*Non-metric Multidimensional Scaling*) que reduzem a dimensão da matriz de dados de forma proporcional ao espaço multidimensional original (RAMETE, 2007), sendo recomendada a distância de Hellinger dado pela grande frequência de dados faltantes (igual a zero) nas matrizes geradas pelos dados de TRFLP (LEGENDRE; GALLAGHER, 2001) (Figura.2.6)

As análises de NMDS evidenciaram que as comunidades de *Bacteria* das áreas diferem conforme os dados químicos do solo e as espécies vegetais que o recobrem. Em que os atributos químicos explicam em 75% e 64,5% da variabilidade dos dados para a endonuclease *HhaI*, respectivamente para os anos de 2012 e 2013; e para *MspI* 70,8% e 87,7%. Entre os atributos, há uma maior correlação da matéria orgânica (M.O.), alumínio (Al) e a umidade com as áreas de reflorestamento e floresta, ao passo que o pH, cálcio (Ca) e magnésio (Mg) estão relacionados para as áreas com cultivo rotacionado de soja/milheto, e, o fósforo (P) e potássio (K) com as áreas de integração lavoura-pecuária.

Opostamente, as comunidades de *Archaea* responderam em um grau mais independente aos mesmos atributos do solo, cuja explicação é de 28,8% e 35,8% para *HhaI*, respectivamente 2012 e 2013, e 51% e 29,2% para *MspI*. Sendo assim, houve apenas as relações de matéria orgânica (M.O.) com a área de floresta; enquanto que cálcio, pH e Mg continuaram relacionados as áreas de cultivo rotacionado de soja/milheto devido a calagem realizada para o plantio; e os demais atributos variaram entre as áreas.

A partir dos fragmentos terminais de restrição (TRFs) é possível obter a estrutura da comunidade de forma semi-quantitativa através da intensidade dos picos de fluorescência gerados na leitura das amostras, desde que considere cada pico (TRF) uma unidade taxonômica operacional (UTO) distinta (BRAKER et al., 2001).

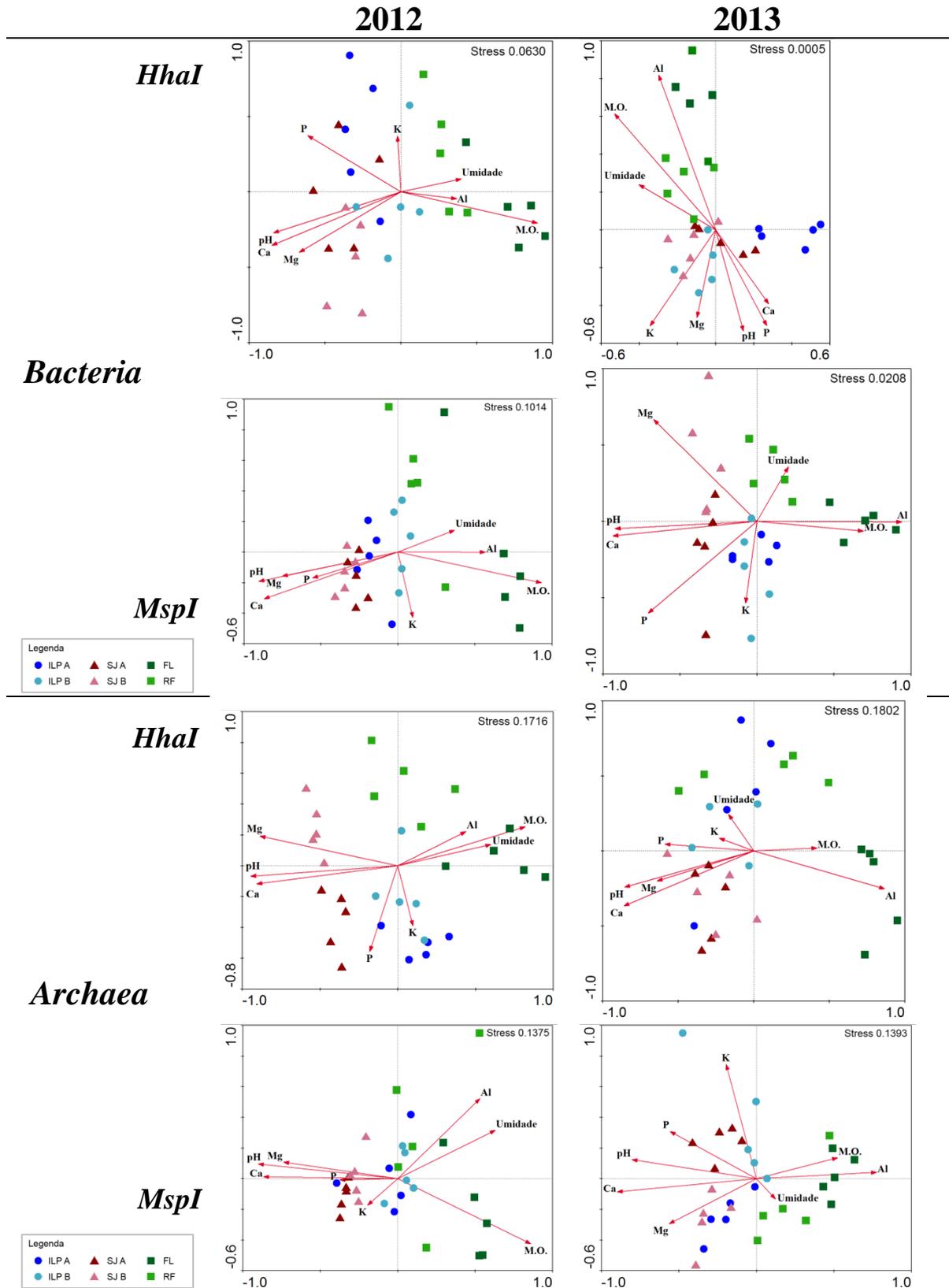


Figura 2.6 – Análises de redundância (RDA) para dados organizados em matrizes NMDS das comunidades microbianas dos solos estudados. **ILP A e B**: áreas integração lavoura-pecuária; **SJ A e B**: áreas de soja/milheto desmatadas em 1996 e 2004, respectivamente; **RF**: área de reflorestamento e **FL**: área de fragmento florestal.

Nesse sentido, os dados obtidos de ambos os anos, foram alinhados para que as UTOs referentes a cada domínio e enzima de restrição permanecessem com a mesma legenda, em que as cores em um ano são as mesmas UTOs do outro. Assim, os histogramas foram construídos utilizando fragmentos com abundância relativa >1% para melhor visualização da estrutura da comunidade (Figuras 2.7 e 2.8), que pode variar conforma as alterações ambientais persistentes ou temporais, sendo considerados UTOs de organismos dominantes (LeHOURS et al., 2005).

No gráfico de abundância relativa de UTOs do gene 16S de *Bacteria* de 2012 é notável a presença das UTOs mais abundantes nos sistemas de cultivo e sua redução nas áreas de reflorestamento e floresta; bem como ocorre ao contrário, o que é dominante na floresta se reduz nas demais áreas. Isto mostra a existência fatores, que propiciam benefícios para o desenvolvimento de populações de microrganismos, encontrados na floresta e reflorestamento são ou agem de maneiras distintas. Bem como, para a enzima *HhaI*, a presença da maior concentração da abundância em poucas OTUs, nos sistemas agrícolas, contrariamente a maior homogeneidade encontrada no reflorestamento e na floresta.

Em 2013, apesar das alterações de cultura nos sistemas de ILP, há a persistência de OTUs em proporções próximas a do ano anterior, em todas as áreas, indicando que a estas são atribuídas a microrganismos com atividades essenciais ao funcionamento do ambiente. Em concordância com o discutido nas análises anteriores a conversão da área de pastagem em soja, aproximou a sua formação estrutural as encontradas nas áreas rotacionadas de soja/milheto.

As alterações encontradas na estrutura das comunidades bacterianas, referente à enzima *HhaI*, de um ano para o outro – mais precisamente nas áreas de soja em que não houve troca de cultura na safra e não sofre influência de outras espécies vegetais senão soja e milho – podem ter associação a um evento em grande escala, pois as áreas apresentaram um mesmo distúrbio, beneficiando mesmas OTUs em áreas distintas. O distúrbio nessa região é geralmente relacionado ao clima pelas variações decorrentes da redução ou elevação da umidade provocada pelos fenômenos *El Niño* e *La Niña* (GRIMM, 2003). Já a clivagem pela enzima *MspI* apresentou um padrão de estrutura para ambos os anos, em que as diferenças são marcadas pela abundância das OTUs dominantes e as diferenças entre as UTOs menos evidentes. Este padrão agregou as áreas conforme a influência exercida pela cultura e o histórico da área, onde há um pareamento entre as áreas de soja; outro entre os sistemas ILP A

e B e a área de reflorestamento, no entanto, este possui certa semelhança com a área de floresta de forma transitória no ano de 2012.

Para as comunidades de *Archaea* a estrutura é baseada em um número menor de UTOs, que se mostrou variável entre as áreas para a enzima *HhaI* no ano de 2012, com poucas semelhanças entre as áreas de mesmo manejo e cultura, todavia no ano de 2013 houve a homogeneização das estruturas entre as áreas agrícolas e por tipo de manejo, não sendo afetadas pela troca de cultura. Considerando ao aumento da proporção de algumas UTOs pode se inferir que o distúrbio mencionado do ano de 2013, beneficiou o aumento dessas populações. Na análise das UTOs clivadas pela enzima *MspI*, a diferença entre as áreas se restringe de maneira geral à interação das plantas, correlacionando as áreas: com gramíneas (ILPs e reflorestamento) e com soja (SJs) apresentaram grande compartilhamento entre si.

Observando em todos os gráficos, a área de floresta se apresentou de forma individualizada, tanto em relação às demais áreas como na mudança do ano. Isto expressa que a diversidade da floresta pode variar entre pontos distintos em uma mesma microrregião, que pode ser delimitada até mesmo em microhabitats específicos criados pela influência das espécies vegetais de determinado local (MARTINY et al., 2011; MONTEIRO et al., 2012)

Também foram criados diagramas de Venn para averiguar a presença de UTOs exclusivas e compartilhadas entre áreas revelando as particularidades de cada comunidade em função do manejo empregado (Figura 2.9) e a riqueza de UTOs presentes nas áreas (Figura 2.10 e 2.11).

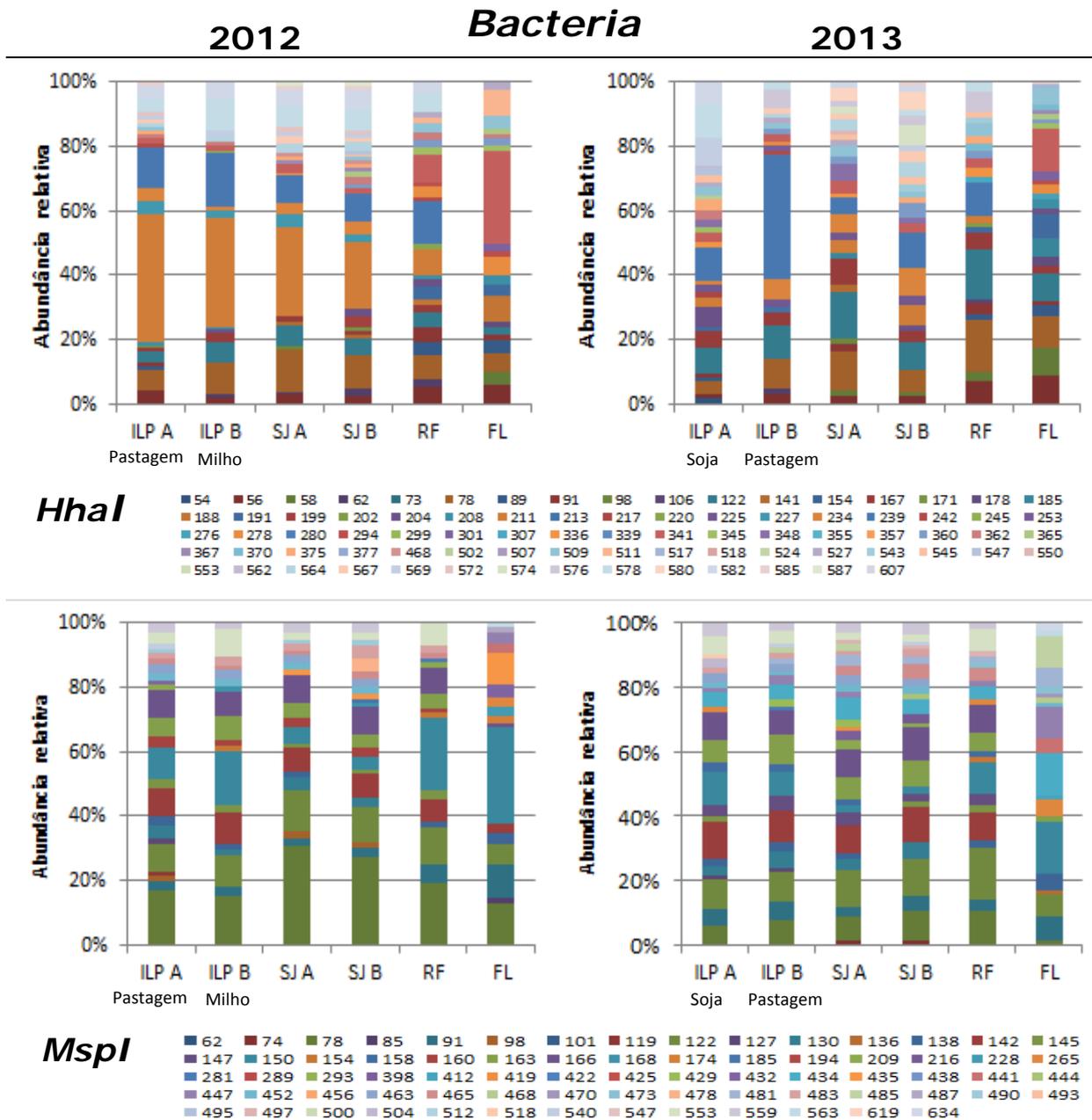


Figura 2.7 – Abundância relativa das UTOs dominantes (>1% de representatividade) do gene 16S rRNA de comunidades de *Bacteria* clivadas com a endonuclease *HhaI*. **ILP A e B**: áreas integração lavoura-pecuária; **SJ A e B**: áreas de soja/milheto desmatadas em 1996 e 2004, respectivamente; **RF**: área de reflorestamento e **FL**: área de fragmento florestal. A cultura presente no solo está descrita próximo à área.



Figura 2.8 – Abundância relativa das UTOs dominantes (>1% de representatividade) do gene 16S rRNA de comunidades de *Archaea* clivadas com a endonuclease *HhaI*. **ILP A e B**: áreas integração lavoura-pecuária; **SJ A e B**: áreas de soja/milheto desmatadas em 1996 e 2004, respectivamente; **RF**: área de reflorestamento e **FL**: área de fragmento florestal. A cultura presente no solo está descrita próximo à área.

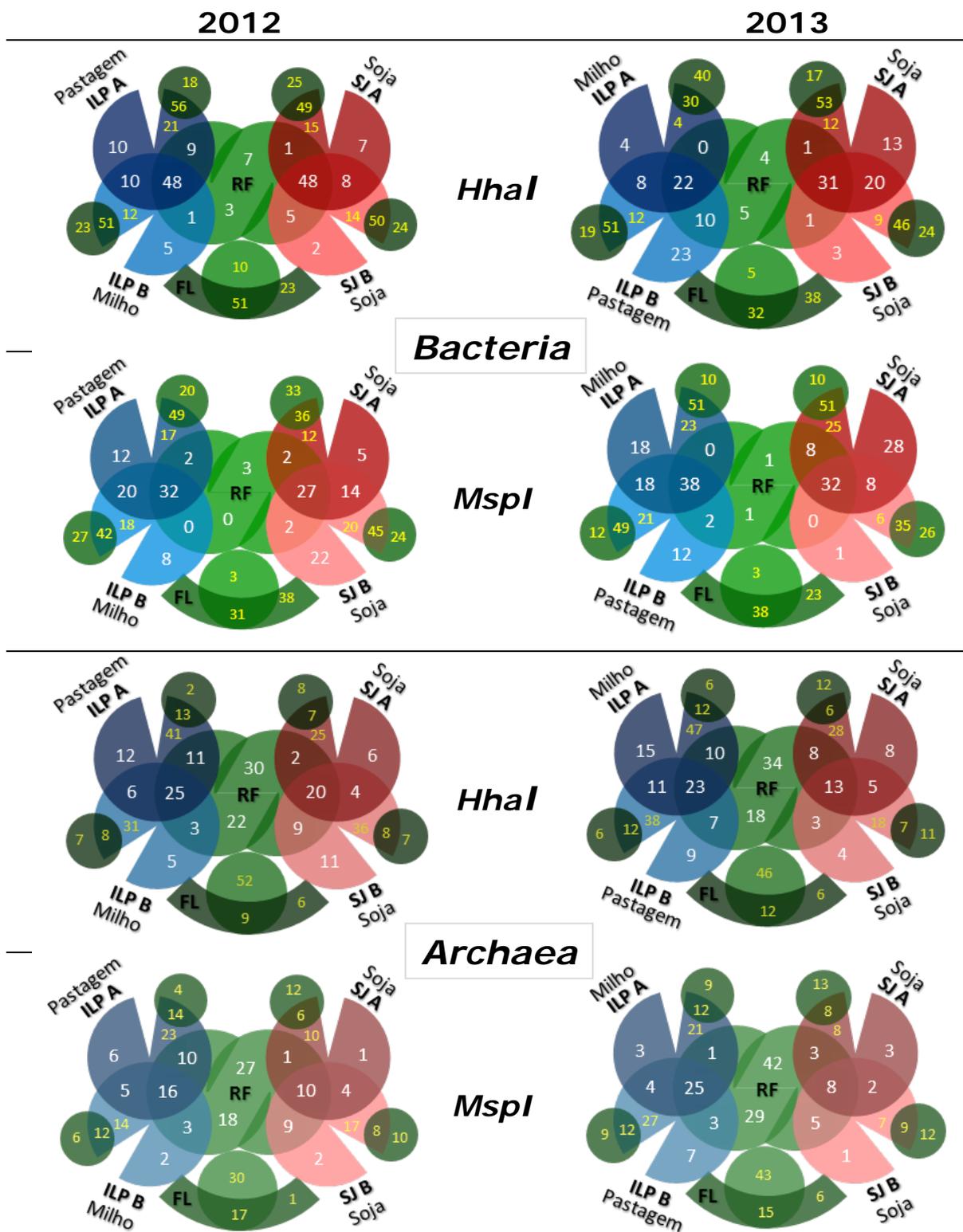


Figura 2.9 – Diagramas de Venn baseados nos UTOs do gene 16S rRNA de comunidades de *Bacteria* e *Archaea* clivadas com as endonucleases *HhaI* e *MspI*. **ILP A e B**: áreas integração lavoura-pecuária; **SJ A e B**: áreas de soja/milho desmatadas em 1996 e 2004, respectivamente; **RF**: área de reflorestamento e **FL**: área de fragmento florestal. Os números em amarelo são as comparações dos TRFs de floresta com as demais áreas. A cultura presente no solo está descrita próximo à área.

Segundo os diagramas de Venn, as áreas apresentam em sua maioria UTOs bacterianas compartilhadas e poucas exclusivas entre as áreas de sistemas de cultivo e reflorestamento, diferentemente da floresta a qual apresenta as maiores quantidades de UTOs únicas. Em comunidades de *Archaea* verifica-se uma menor riqueza e diversidade em relação às comunidades de *Bacteria* (ALLER; KEMP, 2008); claramente observado em conjunto das Figuras 2.9 e 2.10, principalmente para a área de floresta que apresenta uma menor riqueza de UTOs por ser um ambiente menos antropizado em relação às demais (TAKETANI; TSAI, 2010).

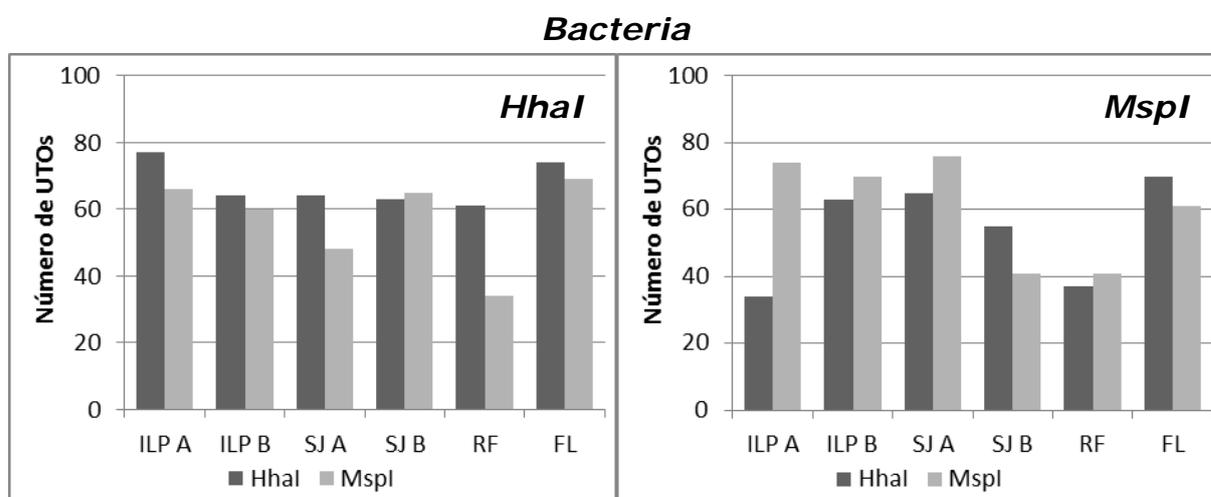


Figura 2.9 – Riqueza de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) para as endonucleases *HhaI* e *MspI* das comunidades de *Bacteria*. **ILP A e B**: áreas integração lavoura-pecuária; **SJ A e B**: áreas de soja/milheto desmatadas em 1996 e 2004, respectivamente; **RF**: área de reflorestamento e **FL**: área de fragmento florestal.

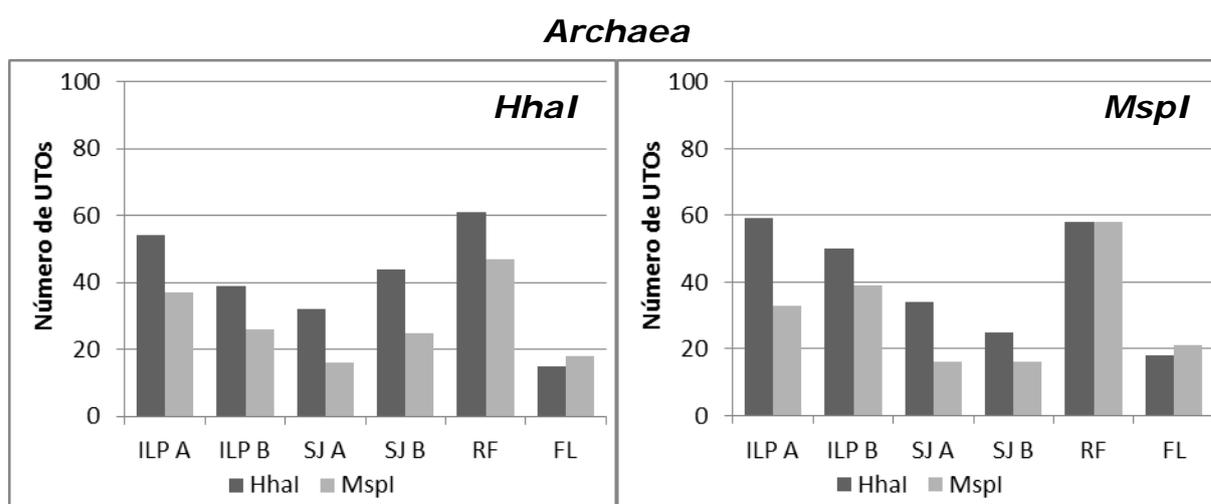


Figura 2.10 – Riqueza de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) para as endonucleases *HhaI* e *MspI* das comunidades de *Archaea*. **ILP A e B**: áreas integração lavoura-pecuária; **SJ A e B**: áreas de soja/milheto desmatadas em 1996 e 2004, respectivamente; **RF**: área de reflorestamento e **FL**: área de fragmento florestal.

Na comunidade bacteriana, o número de UTOs para a enzima *HhaI* apresentou redução em todas as áreas exceto a área de soja desmatada em 2004 (SJ B); havendo uma redução drástica na área de reflorestamento e no sistema ILP A. Utilizando a enzima *MspI*, o número de UTOs aumentou para as áreas de ILP (A e B), soja desmatada em 1996 (SJ B) e reflorestamento (RF); e reduziu para SJ B e floresta (FL).

Além disso, foi constatado que houve a redução de UTOs na área ILP A, para ambas as enzimas, onde ocorreu a conversão da área de pastagem, que permaneceu por 2 anos consecutivos, em uma área de plantio de soja. E ao contrário, na área ILP B ocorreu à conversão da área plantada com milho para pastagem, em que se observou um aumento, porém menos pronunciado; isto é evidenciado pelo número de UTOs compartilhadas entre as duas áreas, diminuindo a similaridade entre elas. Tal fato tem sua causa na alta diversidade atribuída a rizosfera das pastagens quando associadas a níveis compatíveis de fertilidade (McCAIG; GLOVER; PROSSER, 1999).

2.4 Conclusão

Com base na confiabilidade e sensibilidade das técnicas de qPCR e TRFLP, juntamente com as relações e análises estatísticas empregadas para a análise de dados, foi possível averiguar que o uso do plantio direto por um longo tempo fornece condições estáveis para o desenvolvimento das comunidades de *Archaea* e *Bacteria*, suprimindo as necessidades de carbono orgânico solúvel do solo, através da matéria orgânica, responsável pela alta atividade microbiana e manutenção da qualidade do solo.

A fim de avaliar a qualidade do solo dos diferentes sistemas agrícolas e o reflorestamento podemos concluir que os sistemas de integração lavoura-pecuária, quando bem estabelecidos, mostraram-se sutilmente mais estáveis às variações temporais que os sistemas rotacionados de soja/milheto. Com relação à área de reflorestamento, há grande similaridade aos sistemas de integração lavoura-pecuária pela presença de gramíneas, isto ocorre devido ao seu estágio relativamente inicial, que futuramente pode haver o desenvolvimento de um dossel capaz de selecionar o ambiente a espécies arbóreas, entretanto ainda é evidente a diferença estrutural das comunidades em relação à floresta.

Em síntese, as práticas agrícolas quando manejadas adequadamente, seguindo as práticas conservacionistas dos solos, podem obter um retorno econômico eficiente e mantedor da qualidade do solo.

REFERÊNCIAS

ALLER, J.Y.; KEMP, P.F. Are Archaea inherently less diverse than Bacteria in the same environments? **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 65, p. 74-87, 2008.

BALL, D.M.; HOVELAND, C.S.; LACEFIELD, G.D. **Southern forages** : modern concepts for forage crop management. 4th ed. Norcross, GA: Potash & Phosphate Institute and the Foundation for Agronomic Research, 2007. 332 p.

BARRETO, R.C.; MADARI, B.E.; MADDOCK, J.E.L.; MACHADO, P.L.O.A.; TORRES, T.; FRANCHINI, J.; COSTA, A.R. The impact of soil management on aggregation, carbon stabilization and carbon loss as CO₂ in the surface layer of a Rhodic Ferralsol in Southern Brazil. **Agriculture Ecosystems and Environment**, v. 132, p. 243-251, 2009.

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**, Washington, v. 67, p. 1893-1901, 2001.

BRODY, J.R.; KERN, S.E. Sodium boric acid: Atriz-less, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, New York, v. 36, p. 214-216, 2004.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Safra – Séries Históricas. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=&Pagina_objcmsconteudos=3#A_objm_sconteudos>. Acesso em: 6 jan. 2014.

CORRÊA, J. C . **Manejo do solo no município de Querência/MT**. Planaltina : Embrapa Cerrados, 2000. 40 p. (Embrapa Cerrados, Documentos, 26).

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

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**, Amsterdam, v. 75, p. 55-63, 2008.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: EMBRAPA Produção de Informação, 1999. 412 p.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil 2012 e 2013**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 261 p.

EMPAER. **Querência-MT: estudo da realidade**. Cuiabá: EMPAER, 1996. 21 p.

FEARNSIDE, P.M. Global warming and tropical land-use change: greenhouse gas emissions from biomass burning, decomposition and soils in forest conversion, shifting cultivation and secondary vegetation. **Climatic Change**, v. 46, p. 115–158, 2000.

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

FRIEDRICH, M. W. Methyl-coenzyme M reductase genes: unique functional markers for methanogenic and anaerobic oxidizing *Archaea*. **Methods Enzymol.**, v. 397, p. 428-42, 2005.

GONÇALVES, S. L.; FRANCHINI, J. C. **Integração Lavoura-Pecuária**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 8 p. (Embrapa Soja, Circular Técnica, 44).

GRAYSTON; S. J.; VAUGHAN, D.; JONES, D.; Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. **Applied Soil Ecology**, v. 5, n. 1, p. 29-56, 1997.

GRIMM, A. M. The El Niño Impact on the Summer Monsoon in Brazil: Regional Processes versus Remote Influences. **J. Climate**, v. 16, 263–280, 2003.

HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. Real Time Quantitative PCR. **Genome Research**, New York, v.6, p.986-994, 1996.

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

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal: culturas temporárias e permanentes 2012**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2012/default_pdf.shtm>. Acesso em: 6 jan. 2014.

KAPLAN, C. W.; KITTS, C. L. Variation between observed and true Terminal Restriction Fragment length is dependent on true TRF length and purine content. **J. Microbiol. Methods**, v. 54, n. 1, p. 121-125, 2003.

LAUBER, C. L.; STRICKLAND, M. S.; BRADFORD, M. A.; FIERER, N. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2407-2415, 2008.

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

LeHOURS, A.C.; BARDOT, C.; THENOT, A.; DEBROAS, D.; FONTY, G. Anaerobic microbial communities in Lake Pavin, a unique meromictic lake in France. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 7389-7200, 2005.

LIU, W.T.; MARSH, T.L.; CHENG, H.; FORNEY, L.J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphism of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, p.4516-4522, 1997.

McCAIG, E. A.; GLOVER, L. A.; PROSSER, J. I. Molecular Analysis of Bacterial Community Structure and Diversity in Unimproved and Improved Upland Grass Pastures. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 4, p. 1721-1730, 1999.

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

MARSH, T.L.; SAXMAN, P.; COLE, J.; TIEDJE, J. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3616-3620, 2000.

MARTINY, J. B. H.; EISEN, J. A.; PENN, K.; ALLISON, S. D.; HORNER-DEVINE, M. C. Drivers of bacterial β -diversity depend on spatial scale. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 108, n. 19, p. 7850-7854, 2011.

MONTEIRO, F. P.; PACHECO, L. P.; LORENZETTI, E. R.; ARMESTO, C.; SOUZA, P. E.; ABREU, M. S. Exsudatos radiculares de plantas de cobertura no desenvolvimento de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 87-93, 2012.

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

PIELOU, E.C. **The interpretation of ecological data** – a primer on classification and ordination. New York: John Wiley & Sons, 2000. 263 p.

PREFEITURA DE QUERÊNCIA. História de Querência – Prefeitura Municipal de Querência – MT. Disponível em: <<http://www.querencia.mt.gov.br/Historia/>>. Acesso em: 1 dez. 2013.

RADL, V.; GATTINGER, A.; CHROŇÁKOVÁ, A.; NĚMCOVA, A.; ČUHEL, J.; ŠIMEK, M.; MUNCH, J. C.; SCHLOTER, M.; ELHOTTOVÁ, D. Effects of cattle husbandry on abundance and activity of methanogenic archaea in uploan soil. **The ISME Journal**, v. 1, p. 443-452, 2007

RAMETTE, A. Multivariate analyses in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 62, p. 142-160, 2007.

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

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, T.; MANIATIS. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**, 2o Ed. USA . p 1.25- 1.30, 1989.

SASS, R. L. Short summary chapter for methane. In: MINAMI, K.; MOSIER, A.; SASS, R. (Ed.). **CH₄ and N₂O: Global emissions and controls from rice fields and other agricultural and industrial sources**. Japan: National Institute of Agro-Environmental Sciences, 1994, 234 p.

SHARMA, R.; RYAN, K.; HAO, X.; LARNEY, F. J.; McALLISTER, T. A.; TOPP, E. Real-Time Quantification of *mcrA*, *pmoA* for Methanogen, Methanotroph Estimations during Composting. **Journal of Environmental Quality**, v. 40, p. 199-205, 2011.

SHYU, C.; SOULE, T.; BENT, S.J.; FOSTER, J.A.; FORNEY, L.J. .MiCA: A Web-Based Tool for the Analysis of Microbial Communities Based on Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphisms of 16S and 18S rRNA Genes. **Microbial Ecology**, New York, v. 53, p. 562-570, 2007.

STEUDLER, P. A.; BOWDEN, R. D.; MELILLO, J. M.; ABER, J. D. Influence of nitrogen fertilization on methane uptake in temperate forest soil. **Nature**, v. 341, p. 314-316, 1989.

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**, v. 59, n. 4, p. 734-743, 2010.

TIEDJE, J.M.; ASUMING-BREMPPONG S.; NUSSLEIN, K.; MARSH, T.L.; FLYNN, S.J. Opening the black box of soil microbial diversity. **Appl. Soil Ecol.**, Amsterdam, v. 386, p. 1-14, 1999.

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

3 RESPOSTAS DA COMUNIDADE MICROBIANA SOB INTERAÇÃO RIZOSFÉRICA E SATURAÇÃO HÍDRICA EM SOLOS DE SISTEMAS AGRÍCOLAS E REFLORESTAMENTO SOB EXPERIMENTO CONTROLADO

Resumo

A emissão de gases do efeito estufa está relacionada à existência de uma microbiota diversa. Entretanto alguns grupos de organismos, os metanogênicos e metanotróficos, são responsáveis pela produção e o consumo de metano, respectivamente, no qual o processo de produção ocorre sob condições específicas de anoxia e baixos níveis de condição redox. Os microrganismos sofrem influência das variações climáticas, tipo de solo, qualidade da cobertura vegetal e o manejo utilizado. Dentre os quais, exsudatos radiculares liberados pelos vegetais influenciam os microrganismos por disponibilizarem carbono orgânico no solo, o que é distinto entre espécies diferentes. Deste modo, a avaliação dos solos dos sistemas agrícolas, sob a interação rizosférica de diferentes culturas e a criação de um ambiente anóxico se faz necessário para entender o comportamento de tais comunidades. Através das técnicas de qPCR e TRFLP foi possível observar que os microrganismos são estruturados, primariamente, em função do tipo de solo e consecutivo efeito rizosférico dos vegetais; e a saturação hídrica promove o crescimento das comunidades metanogênicas somente nos solos de floresta, onde ocorre maior incorporação de matéria orgânica.

Palavras-chave: Ecologia microbiana, metanogênicas, metanotróficas, rizosfera, saturação hídrica, qPCR, TRFLP

SOIL MICROBIAL COMMUNITIES RESPONSE TO RHIZOSPHERIC INTERACTION AND WATER SATURATION FROM AGRICULTURAL SYSTEMS AND REFORESTING AREA UNDER CONTROLLED EXPERIMENT

Abstract

Greenhouse gases emissions are related to the existence of a diverse microbiota. However, some groups of organisms, methanogens and methanotrophs are responsible for the production and use of methane, respectively, wherein the production process occurs under specific conditions of anoxia and low redox conditions. The microorganisms are influenced climate variations, soil type, quality of the vegetation cover and the management used. Among which, exudates released by plant roots influence the microorganisms for making available organic carbon in soil, which is distinct among different species. Thus, the evaluation of soils for agricultural systems under the rhizospheric interaction of different cultures and the creation of an anoxic environment is needed to understand the behavior of such communities. Through the techniques of qPCR and TRFLP was observed that microorganisms are structured primarily on the type of soil and rhizosphere effect of consecutive vegetables, and the water saturation promotes the growth of methanogenic communities only in forest soils where occurs greater organic matter incorporation.

Keywords: Microbial ecology, methanogens, methanotrophs, rizosphere interaction, water saturation, qPCR, TRFLP

3.1 Introdução

A produção de gases do efeito estufa (GEEs), como o dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) e óxido nitroso (N_2O), é afetada por vários fatores, que podem ser modificados através das práticas de manejo, variações climáticas e tipo de solo (PAUSTIAN et al., 1997; SIRIVEDHIN; GRAY, 2006).

Por sua vez, as práticas de manejo adotadas e as mudanças de uso do solo podem alterar as condições edáficas, como a estrutura do solo, a disponibilidade de nutrientes e a umidade, que modulam as populações dos microrganismos e suas interações (GIRVAN et al., 2003; LAUBER et al., 2008). Essas comunidades microbianas são responsáveis por diversas atividades ligadas à ciclagem de nutrientes, decomposição da matéria orgânica, solubilização de fosfatos, fixação de nitrogênio, nitrificação, desnitrificação (SOUCHIE ABBOUD, 2007; HARTER et al., 2013), podendo também estar envolvidas na emissão de gases como produto final do seu metabolismo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A emissão de metano é promovida pelas arqueias metanogênicas as quais sobrevivem em ambientes anóxicos, que podem ocorrer através da saturação de água nos solos e baixos níveis de condição redox e grande disponibilidade de nutrientes, como os manguezais (TAKETANI et al., 2010). Essas condições podem ser obtidas em sistemas irrigados (MOTERLE et al, 2013) e ou durante o período chuvoso (HAMILTON; SIPPEL; MELACK, 1995).

Dessa forma, com a elevação da disponibilidade de nutrientes, através da deposição de matéria orgânica do solo, há a ativação da microbiota do solo rapidamente; magnificando as populações microbianas e sua diversidade funcional envolvida em todos os processos relacionados à utilização dos componentes químicos agregados à matéria (KUZYAKOV; BOL, 2006 LAGOMARSINO; GREGO; KANDELER, 2012; THANGARAJAN et al, 2013).

Também foi constatado que as plantas influenciam fortemente os microrganismos através da liberação de exsudatos no solo, uma importante fonte de carbono orgânico no solo (HUSTCH; AUGUSTIN; MERBACH, 2000). Segundo Nguyen (2003), os exsudatos radiculares representam cerca de 15% do CO_2 fixado pelas plantas. Sua liberação pelas plantas no ambiente tem como finalidade a comunicação entre outras plantas e os microrganismos, como por exemplo, interações de resistência da planta a patógenos e herbivoria, estímulo das simbioses benéficas de fixação biológica do nitrogênio e outros microrganismos associativos, alterações das propriedades químicas e físicas do solo e a

inibição do crescimento de espécies competidoras (KNUDSON, 1920; RADMAN et al., 2003; BAIS et al., 2004; BADRI; VIVANCO, 2009).

Por conseguinte a determinação da abundância e da estrutura das comunidades microbianas do solo é essencial para avaliar as respostas quando submetidas a diferentes manejos empregados nos sistemas produtivos, que podem propiciar o desenvolvimento dos grupos responsáveis por processos de interesse, como aqueles associados à produção de gases do efeito estufa.

3.2 Objetivos

Avaliar o efeito da rizosfera e da umidade sobre as comunidades de *Bacteria* e *Archaea*; e observar como as quantidades de microrganismos metanogênicos e metanotróficos variam em função destes fatores.

3.3 Material e métodos

3.3.1 Experimento de mesocosmos em casa de vegetação

Os mesocosmos constituíram-se de vasos de cerâmica (30 cm de altura e 20 cm de diâmetro) com orifício na base (± 5 cm) e impermeabilizados internamente com tinta atóxica apropriada. Os vasos foram envoltos em folhas de alumínio e preenchidos com uma camada de pedras britadas de modo a cobrir o orifício, neste foi instalado um tubo flexível e transparente para auxiliar no controle hídrico (Figura 3.1).

Os vasos foram montados na casa de vegetação do CENA/USP, sobre estrados de madeira suspensos. Foram utilizados os solos de uma área de Integração Lavoura-Pecuária (ILP), uma área de rotação de soja/milheto desmatada em 1996 (SJ); uma área de reflorestamento desde 2007 (RF) e uma área de fragmento florestal adjacente à área de integração lavoura-pecuária (FL); provenientes da fazenda Certeza descritas no capítulo 2 (ver seções 2.2.1 e 2.2.2) coletados no ano de 2013.

Ao todo foram realizados 4 tratamentos: plantio de braquiária – *Brachiaria brizantha* var. Marandu (sin. *Urochloa brizantha* var. Marandu); plantio de soja – *Glycine max* (L.) Merr.; controle e solo encharcado.

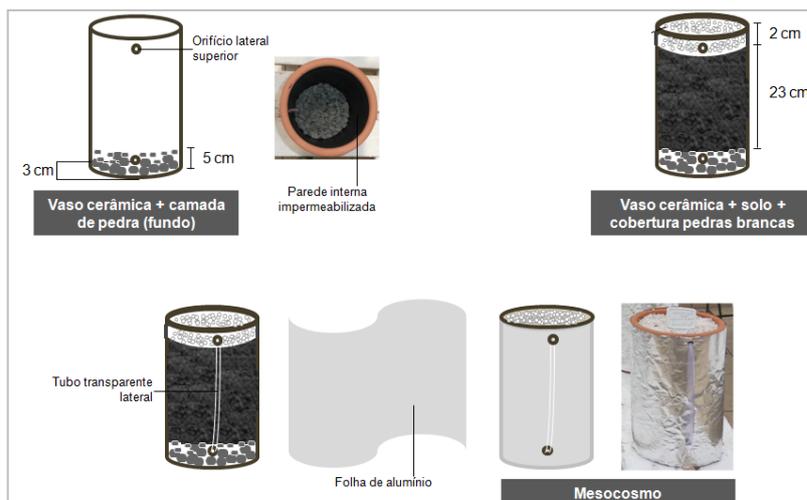


Figura 3.1 – Vasos de cerâmica utilizados no experimento de mesocosmos em casa de vegetação (Imagem cedida por NAVARRETE, A.A.).

O experimento foi conduzido no ano de 2013, iniciando em março com o plantio das sementes inoculadas com fixadoras de nitrogênio. Para a padronização, a adubação com NPK foi realizada durante o estágio V2 da soja, segundo a recomendação de Oliveira et al. (2007) utilizando a proporção de 60 Kg.ha^{-1} de P_2O_5 e 100 Kg.ha^{-1} de K_2O . O controle hídrico foi realizado utilizando 60% da capacidade de campo dos solos para os tratamentos com braquiária, soja e controle – o tratamento encharcado era mantido em 100% – com verificações diárias. A retirada do material foi realizada em maio (após 75 dias), logo após o período de desenvolvimento das inflorescências da soja do experimento e a formação de touceira da braquiária, pois nesses estágios o sistema radicular encontra-se desenvolvido e as comunidades microbianas associadas já estão estabelecidas, por terem forte relação com os exsudatos radiculares liberados (MONTEIRO et. al., 2012).

3.3.2 Amostragem

As amostras foram coletadas dos mesocosmos (Figura 3.2a) utilizando ferramentas de jardinagem para a retirada do solo e das plantas. As plantas foram trazidas ao laboratório para a retirada do solo agregado as raízes com auxílio de pincéis e colocadas em tubo de 15 ml tipo Falcon (Figura 3.2b), sendo armazenados em ultrafreezer Glacier Ultra Low Freezer (Nuair Corporation) a -80°C . O mesmo ocorreu para as amostras controle e do tratamento de encharcamento.



Figura 3.2 – Experimento de mesocosmos conduzido em casa de vegetação (a) retirada do solo agregado às raízes e armazenagem das amostras em tubos de 15 mL (b).

3.3.3 Extração do DNA total do solo e análises de qPCR e TRFLP

As etapas de: extração do DNA total do solo; as reações de qPCR e amplificação dos genes para TRFLP de *Archaea* e *Bacteria*; a purificação, restrição e precipitação dos produtos e a análise de TRFLP, bem como as análises estatísticas procedeu-se nos mesmos padrões descritos no capítulo 2 (ver seções de 2.2.3 a 2.2.6)

3.3.4 Resultados e discussão

3.3.4.1 Extração do DNA total do solo

Foram realizadas duas extrações de DNA do solo para cada ponto amostral. Para as amostras que apresentaram diferenças discrepantes, pertencentes ao mesmo ponto, foi realizada uma terceira extração para averiguá-las; selecionando as similares. As amostras apresentaram concentrações entre $14 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ a $90 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

3.3.4.2 Análise de PCR quantitativa

Os dados obtidos foram corrigidos, de acordo com a quantidade de amostra utilizada na reação, e transformados em número de cópias dos genes por grama de solo (Figuras 3.3 e 3.4; Tabela A.2).

Tabela 3.1 - Comparativo do número de cópias dos genes com relação à manutenção das condições encontradas em campo sob o experimento em mesocosmo.

Área	Estudo	Número de cópias do gene			
		<i>Bacteria</i>	<i>Archaea</i>	<i>pmoA</i>	<i>mcrA</i>
ILP	Q	$3,8 \times 10^9$	$5,0 \times 10^{6*}$	$1,9 \times 10^4$	$7,4 \times 10^1$
	M	$4,7 \times 10^9$	$1,1 \times 10^{7*}$	$1,3 \times 10^4$	$2,2 \times 10^2$
SJ	Q	$2,4 \times 10^9$	$3,1 \times 10^6$	$9,4 \times 10^3$	$1,8 \times 10^1$
	M	$3,0 \times 10^9$	$4,1 \times 10^6$	$1,4 \times 10^4$	$1,1 \times 10^1$
RF	Q	$2,7 \times 10^{9**}$	$3,1 \times 10^{5**}$	$9,8 \times 10^4$	$2,5 \times 10^2$
	M	$5,4 \times 10^{9**}$	$2,1 \times 10^{6**}$	$3,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^2$
FL	Q	$2,3 \times 10^9$	$2,3 \times 10^6$	$5,8 \times 10^4$	$2,3 \times 10^2$
	M	$4,8 \times 10^9$	$4,6 \times 10^6$	$6,8 \times 10^4$	$1,3 \times 10^1$

ILP: área de integração lavoura-pecuária; **SJ:** áreas de soja/milheto desmatada em 1996; **RF:** área de reflorestamento e **FL:** área de fragmento florestal.

Q: solo trazido do campo, referente ao tempo 0; **M:** solo da retirada do experimento.

As médias de mesma área mostraram-se diferentes * (Tukey, $p \leq 0,05$) e ** (Tukey, $p \leq 0,01$)

De forma a controlar e equiparar a eficácia do experimento, os dados foram pareados e analisados estatisticamente com os obtidos no estudo anterior (Tabela 3.1), do qual foi retirado o solo para a implantação do experimento. Como resultado, os mesocosmos controle mantiveram quantidades de cópias de genes próximas às obtidas em campo, mas houve algumas alterações significativas, principalmente para a área de reflorestamento. Essas perdas podem ter ocorrido em virtude do transporte ou da homogeneização do solo para a montagem do experimento em triplicatas, que desestruturaram o solo, bem como as diferenças nos fatores abióticos de uma região para outra.

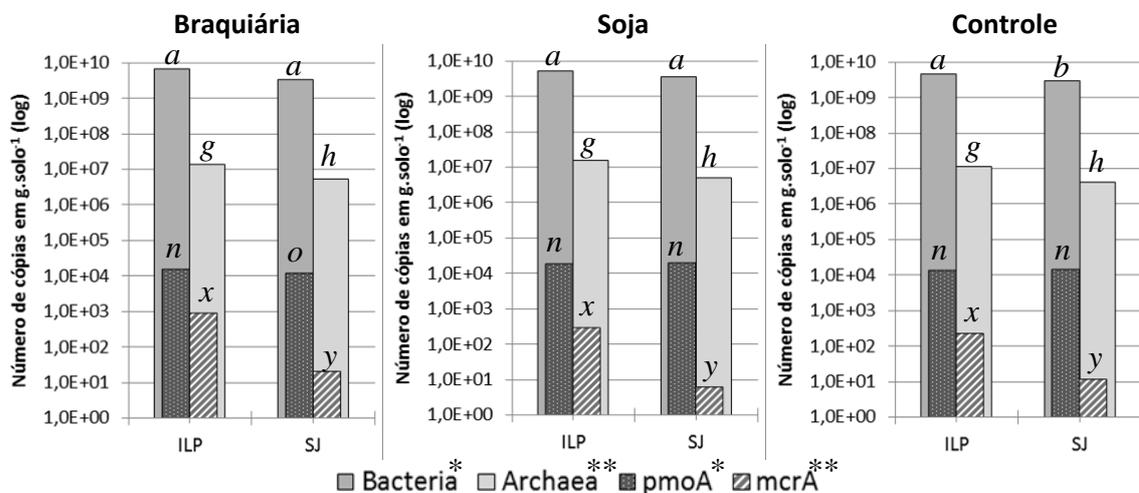


Figura 3.3 – Gráfico comparativo da quantificação dos genes *pmoA* e *mcrA* correlacionados com os genes 16S de *Bacteria* e *Archaea*, respectivamente, sob interação rizosférica em solos de integração lavoura-pecuária (ILP), soja/milheto desmatadas em 1996 (SJ). Houve diferenças significativas entre tratamentos de áreas distintas *(Tukey, $p \leq 0,05$) e ** (Tukey, $p \leq 0,05$), em que letras iguais não são significativamente diferentes.

Segundo as análises de qPCR, os experimentos de rizosfera não apresentaram diferença entre os tratamentos e o controle dos solos de mesma origem, somente há diferenças entre solos de áreas distintas.

De maneira análoga ocorreu para o tratamento de solo encharcado em relação ao controle, exceto para o gene *mcrA* no solo de floresta. O que pode ter sido causado pela grande quantidade de matéria orgânica em processo de decomposição agregada ao solo, característica presente em menor intensidade às demais áreas, e que ao ser estimulado pela elevação da umidade aumentou a comunidade de metanogênicas (SHARMA et al., 2011; THANGARAJAN et al., 2013). E a variação dessa comunidade não alterou a quantidade de metanotróficas no ambiente, isto mostra que o consumo de metano ocorre de maneira independente do seu metabolismo primário; podendo utilizar outras fontes de energia.

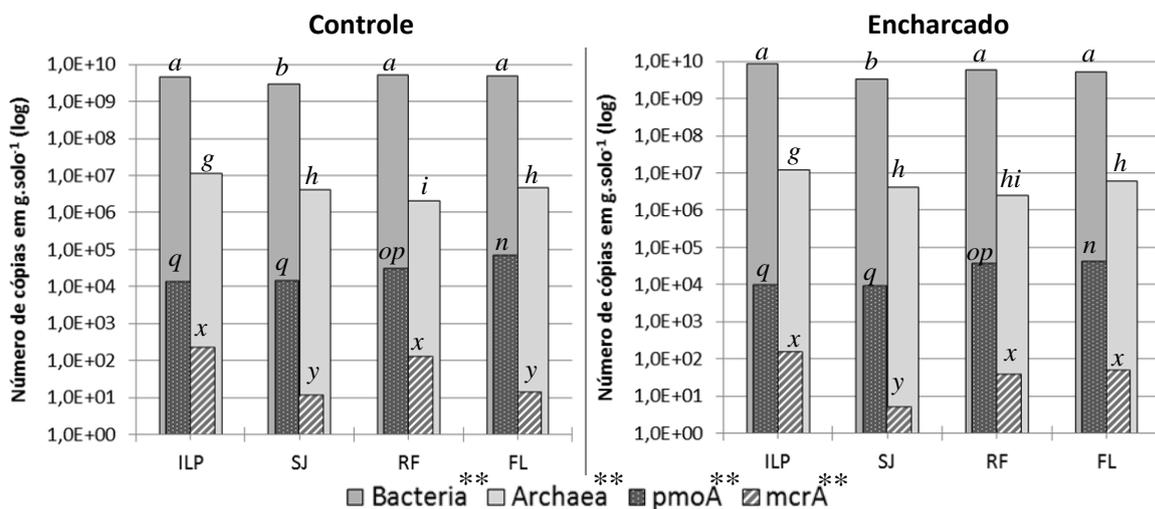


Figura 3.4 – Gráfico comparativo da quantificação dos genes *pmoA* e *mcrA* correlacionados com os genes 16S de *Bacteria* e *Archaea*, respectivamente, com elevação da umidade em solos de integração lavoura-pecuária (ILP), soja/milheto desmatadas em 1996 (SJ); reflorestamento (RF) e floresta (FL) sob encharcamento comparado a um controle. Houve diferenças significativas entre tratamentos de áreas distintas *(Tukey, $p \leq 0,05$) e **(Tukey, $p \leq 0,05$), em que letras iguais não são significativamente diferentes.

3.3.4.3 Análise de PCR-TRFLP

A partir da matriz de dados obtida foi realizada a verificação da equitabilidade das amostras pelo índice de Pielou (Tabela 3.2), cujos valores variam de 0 a 1, sendo o maior valor traduzido a maior equitabilidade da amostragem e, assim, dados mais robustos e confiáveis (PIELOU, 2000).

De acordo com o índice houve uma equitabilidade da maioria das amostras, sendo que para a enzima *HhaI*, em *Archaea*, apresentou os valores tenuamente menores, exceto a amostra controle do solo de floresta com 0,4769.

Tabela 3.2 - Equitabilidade das amostras - Índice de Pielou* (J').

Área	Tratamento	<i>Bacteria</i>		<i>Archaea</i>	
		<i>HhaI</i>	<i>MspI</i>	<i>HhaI</i>	<i>MspI</i>
ILP	Braquiária	0,8613	0,9358	0,9011	0,9358
	Soja	0,9201	0,9213	0,7301	0,9213
	Controle	0,9176	0,9254	0,9025	0,9254
	Encharcado	0,8774	0,9406	0,7564	0,9406
SJ	Braquiária	0,9454	0,9484	0,7683	0,9484
	Soja	0,9151	0,9619	0,6799	0,9619
	Controle	0,9146	0,9351	0,7686	0,9351
	Encharcado	0,9061	0,9888	0,8313	0,9888
RF	Controle	0,9444	0,9243	0,9011	0,9243
	Encharcado	0,9556	0,9132	0,8439	0,9132
FL	Controle	0,9356	0,8866	0,4769	0,8866
	Encharcado	0,9378	0,9197	0,7708	0,9197

*Quanto mais próximo de 1 maior é a equitabilidade da amostragem

Também foram efetuadas análises de similaridade comparando a composição entre os tratamentos: com efeito rizosférico (Tabelas 3.3 e 3.4) e de elevação da umidade (Tabelas 3.5 e 3.6)

Com relação ao efeito rizosférico, as comunidades tanto de *Archaea*, como de *Bacteria*, para ambas as enzimas, mostraram maior similaridade entre os tratamentos de lavoura-pecuária, assim como os mesocosmos contendo solo da área de soja.

A exceção está na enzima *Hha* em *Bacteria*, em que os mesocosmo com solos da área de soja sob plantio da braquiária, apresentaram maior semelhança com as áreas de ILP. Isto pode estar relacionado à maior influência da rizosfera da braquiária em relação à da soja, pois apresenta o sistema radicular mais volumoso que proporciona maior contato de superfície com o solo e liberação de exsudatos.

Tabela 3.3 – Relação de similaridade entre as áreas a partir dos TRFs do gene 16S de *Bacteria*, clivados pelas endonucleases *HhaI* e *MspI* das amostras coletadas em 2012.

	<i>Bacteria</i>	ILP Braq	ILP Soja	ILP Ctrl	SJ Braq	SJ Soja	SJ Ctrl	
<i>HhaI</i>	ILP Braq		89,63%	74,31%	73,58%	74,11%	77,58%	<i>MspI</i>
	ILP Soja	95,02%		63,89%	74,34%	70,60%	67,74%	
	ILP Ctrl	93,18%	86,76%		66,99%	73,54%	81,36%	
	SJ Braq	75,97%	71,72%	81,93%		92,13%	81,20%	
	SJ Soja	75,83%	74,06%	82,25%	84,02%		84,93%	
	SJ Ctrl	85,92%	80,34%	89,96%	90,85%	93,18%		

ILP: área integração lavoura-pecuária; **SJ:** área de soja/milheto desmatadas em 1996. **Braq:** cultivo de braquiária e **Ctrl:** controle

Tabela 3.4 – Relação de similaridade entre as áreas a partir dos TRFs do gene 16S de *Archaea*, clivados pelas endonucleases *HhaI* e *MspI* das amostras coletadas em 2012.

	<i>Archaea</i>	ILP Braq	ILP Soja	ILP Ctrl	SJ Braq	SJ Soja	SJ Ctrl	
<i>HhaI</i>	ILP Braq		95,43%	95,10%	87,00%	89,35%	92,16%	<i>MspI</i>
	ILP Soja	75,37%		92,41%	88,51%	88,81%	92,04%	
	ILP Ctrl	95,55%	68,45%		89,33%	93,60%	95,01%	
	SJ Braq	59,62%	50,14%	53,44%		96,32%	97,47%	
	SJ Soja	50,74%	20,21%	49,39%	78,15%		97,71%	
	SJ Ctrl	58,68%	44,76%	52,49%	95,60%	76,67%		

ILP: área integração lavoura-pecuária; **SJ:** área de soja/milheto desmatadas em 1996. **Braq:** cultivo de braquiária e **Ctrl:** controle

Já o efeito da umidade, sem a presença de vegetal, além de agrupar de acordo com a origem do solo – exceto para a área de ILP para *Bacteria* (para ambas as enzimas) e a área de soja para *Archaea* (para a enzima *MspI*) – também distinguiu as áreas agrícolas da área de floresta. Um caso a parte é referente ao mesocosmo de reflorestamento, onde a comunidade *Bacteria* apresentou maior semelhança aos solos agrícolas no mesocosmo controle (menor umidade) e aproximação à floresta quanto encharcada.

Posteriormente foi realiza a análise de abundância relativa para obter estrutura da comunidade que auxilia na visualização de UTOs dominantes e a oscilação da abundância das demais por alterações ambientais. Assim, os histogramas foram definidos para a obtenção de uma visão holística do comportamento estrutural, na qual foram utilizados OTUs de abundância relativa >1% (Figuras 3.5 a 3.8) (LeHOURS et al., 2005) e diagramas de Venn para observar as diferenças peculiares de UTOs exclusivas de cada comunidade (Figuras 3.9 a 3.12).

Tabela 3.5 – Relação de similaridade entre as áreas a partir dos TRFs do gene 16S de *Bacteria*, clivados pelas endonucleases *HhaI* e *MspI* das amostras coletadas em 2012.

	<i>Bacteria</i>	ILP Ctrl	ILP Enc	SJ Ctrl	SJ Enc	RF Ctrl	RF Enc	FL Ctrl	FL Enc
<i>HhaI</i>	ILP Ctrl		70,79%	81,36%	65,43%	53,53%	33,01%	32,80%	51,80%
	ILP Enc	82,14%		72,44%	79,95%	69,73%	55,41%	35,03%	41,82%
	SJ Ctrl	89,96%	77,04%		82,20%	47,91%	32,77%	23,31%	40,72%
	SJ Enc	87,48%	78,33%	97,59%		48,76%	37,41%	20,50%	36,45%
	RF Ctrl	53,88%	58,86%	59,32%	59,11%		87,14%	80,23%	77,55%
	RF Enc	57,91%	63,22%	61,37%	59,89%	92,49%		71,24%	62,86%
	FL Ctrl	10,44%	7,48%	22,84%	20,76%	56,59%	53,74%		91,38%
	FL Enc	8,13%	3,90%	15,81%	13,74%	52,69%	48,22%	93,29%	

ILP: área integração lavoura-pecuária; **SJ:** área de soja/milheto desmatadas em 1996; **RF:** área de reflorestamento e **FL:** área florestal. **Braq:** cultivo de braquiária e **Ctrl:** controle

Tabela 3.6 – Relação de similaridade entre as áreas a partir dos TRFs do gene 16S de *Archaea*, clivados pelas endonucleases *HhaI* e *MspI* das amostras coletadas em 2012.

	<i>Archaea</i>	ILP Ctrl	ILP Enc	SJ Ctrl	SJ Enc	RF Ctrl	RF Enc	FL Ctrl	FL Enc
<i>HhaI</i>	ILP Ctrl		95,04%	95,01%	76,85%	43,18%	40,32%	54,23%	48,50%
	ILP Enc	79,15%		93,57%	70,38%	50,64%	41,94%	47,95%	46,93%
	SJ Ctrl	52,49%	26,99%		75,41%	42,48%	32,21%	50,36%	48,38%
	SJ Enc	61,85%	32,13%	92,12%		30,76%	37,27%	42,53%	29,76%
	RF Ctrl	31,48%	15,04%	50,71%	47,61%		84,60%	21,46%	24,65%
	RF Enc	28,64%	19,21%	40,45%	36,76%	61,34%		22,47%	17,63%
	FL Ctrl	31,85%	7,06%	54,57%	48,88%	58,75%	36,48%		95,01%
	FL Enc	8,63%	0,73%	3,47%	12,85%	4,59%	12,51%	44,69%	

ILP: área integração lavoura-pecuária; **SJ:** área de soja/milheto desmatadas em 1996; **RF:** área de reflorestamento e **FL:** área florestal. **Braq:** cultivo de braquiária e **Ctrl:** controle

Bacteria

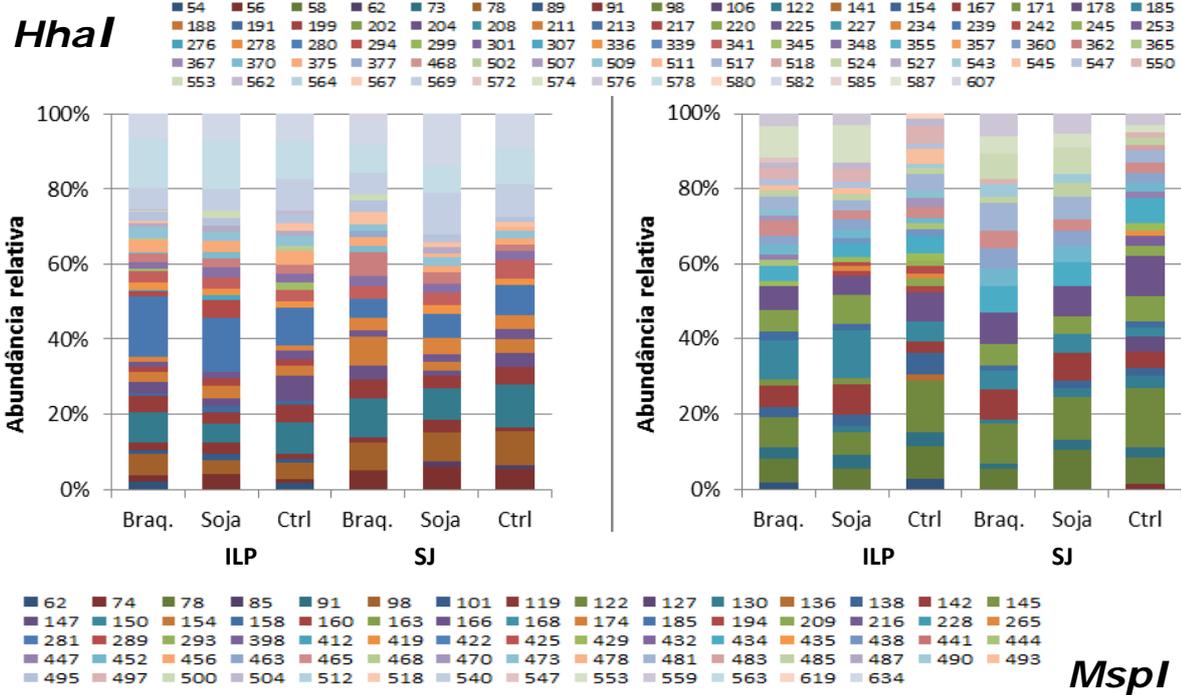


Figura 3.5 – Abundância relativa das UTOs dominantes (>1% de representatividade) do gene 16S rRNA de comunidades de *Bacteria* clivadas com a endonuclease *HhaI* e *MspI*, sob interação rizosférica de braquiária (Braq.) e soja, comparados a um controle (Ctrl) com solos de integração lavoura-pecuária (ILP), soja/milheto desmatadas em 1996 (SJ).

Archaea

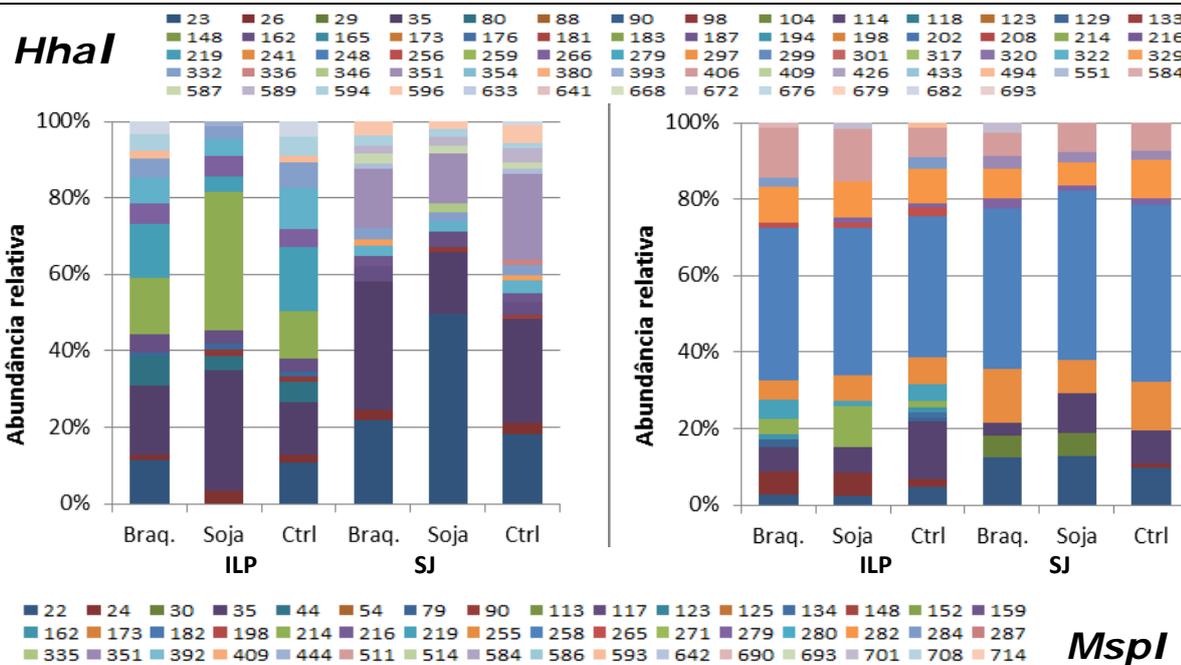


Figura 3.6 – Abundância relativa das UTOs dominantes (>1% de representatividade) do gene 16S rRNA de comunidades de *Archaea* clivadas com a endonuclease *HhaI* e *MspI*, sob interação rizosférica de braquiária (Braq.) e soja, comparados a um controle (Ctrl) com solos de integração lavoura-pecuária (ILP), soja/milheto desmatadas em 1996 (SJ)

A abundância de OTUs para ambas as enzimas, modulou conforme a estrutura original da área, podendo ser observado nas Figuras 2.7 e 2.8 (ver seção 2.2.7.4), dando suporte aos dados de similaridade obtidos e juntamente aos dados de quantificação dos genes por grama de solo. Essa menor influência dos exsudatos radiculares das culturas em ambiente controlado apoia os estudos de Girvan et al. (2003), em que a composição microbiana é determinada primordialmente pelo tipo de solo e suas características físicas e químicas.

Apesar disso, as estruturas das comunidades de bactérias e arqueias distinguiram em função da espécie vegetal, tanto em relação ao mesocosmo controle como nos diferentes plantios. Todavia, é mais evidente se atentar as modificações dispostas na comunidade de *Archaea* por esta ter uma menor quantidade de OTUs.

Sobre a elevação da umidade, as comunidades microbianas de maneira geral, apresentaram uma restrição na estrutura em que várias UTOs aumentaram suas proporções na comunidade após o encharcamento do solo em detrimento de outras; bem como o aparecimento de UTOs que não estavam representadas nos mesocosmo controle, circunstância vista fortemente nos solos de floresta encharcada, que apresentou uma ativação das demais populações microbianas.

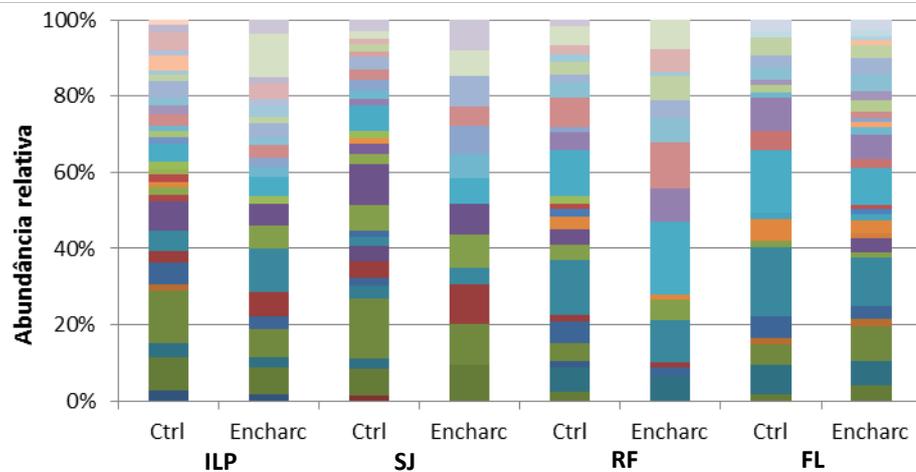
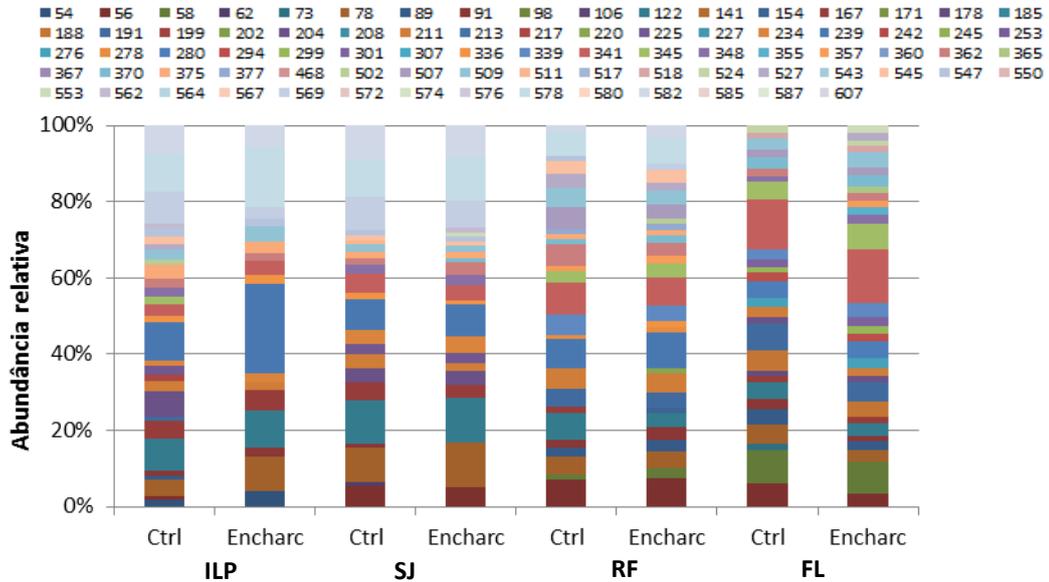
O excesso de água promovido pelo encharcamento do solo gera condições restritivas de difusão de oxigênio no solo, criando um ambiente anóxico em favor ao desenvolvimento de microrganismos anaeróbios, provavelmente relacionados a essas UTOs emergentes; e em detrimento de microrganismos aeróbios estritos.

O efeito rizosférico não teve influência expressiva para a ocorrência de UTOs exclusivas na maioria dos mesocosmos, em que as UTOs se compartilham acima de 60% entre as áreas, havendo apenas uma exceção para enzima *MspI* em *Archaea*, com 47% de UTOs comuns. Entretanto, para a elevação umidade a existência de UTOs únicas foi sempre maior que o controle nos solos de floresta.

No computo geral, sob condições controladas, os solos de floresta e reflorestamento retém a maior riqueza de UTOs em relação às áreas de sistemas agrícolas, entretanto pela complexidade desses sistemas nem todos os organismos presentes são detectados. Nessa visão, provavelmente houve um afinamento nas comunidades, que reduziu o número de UTOs em relação ao estudo anterior, possibilitando o desenvolvimento de outras populações menos abundantes no ambiente que atingiram um nível detectável pela PCR, uma vez que as técnicas moleculares possuem vieses agregados (BECKER, et al, 2000; LUEDERS; FRIEDRICH, 2003).

Bacteria

HhaI



MspI

Figura 3.7 – Abundância relativa das UTOs dominantes (>1% de representatividade) do gene 16S rRNA de comunidades de *Bacteria* clivadas com a endonuclease *HhaI* e *MspI*, com solos de integração lavoura-pecuária (ILP), soja/milheto desmatadas em 1996 (SJ); reflorestamento (RF) e floresta (FL) sob encharcamento (Encharc) comparado a um controle (Ctrl).

Archaea

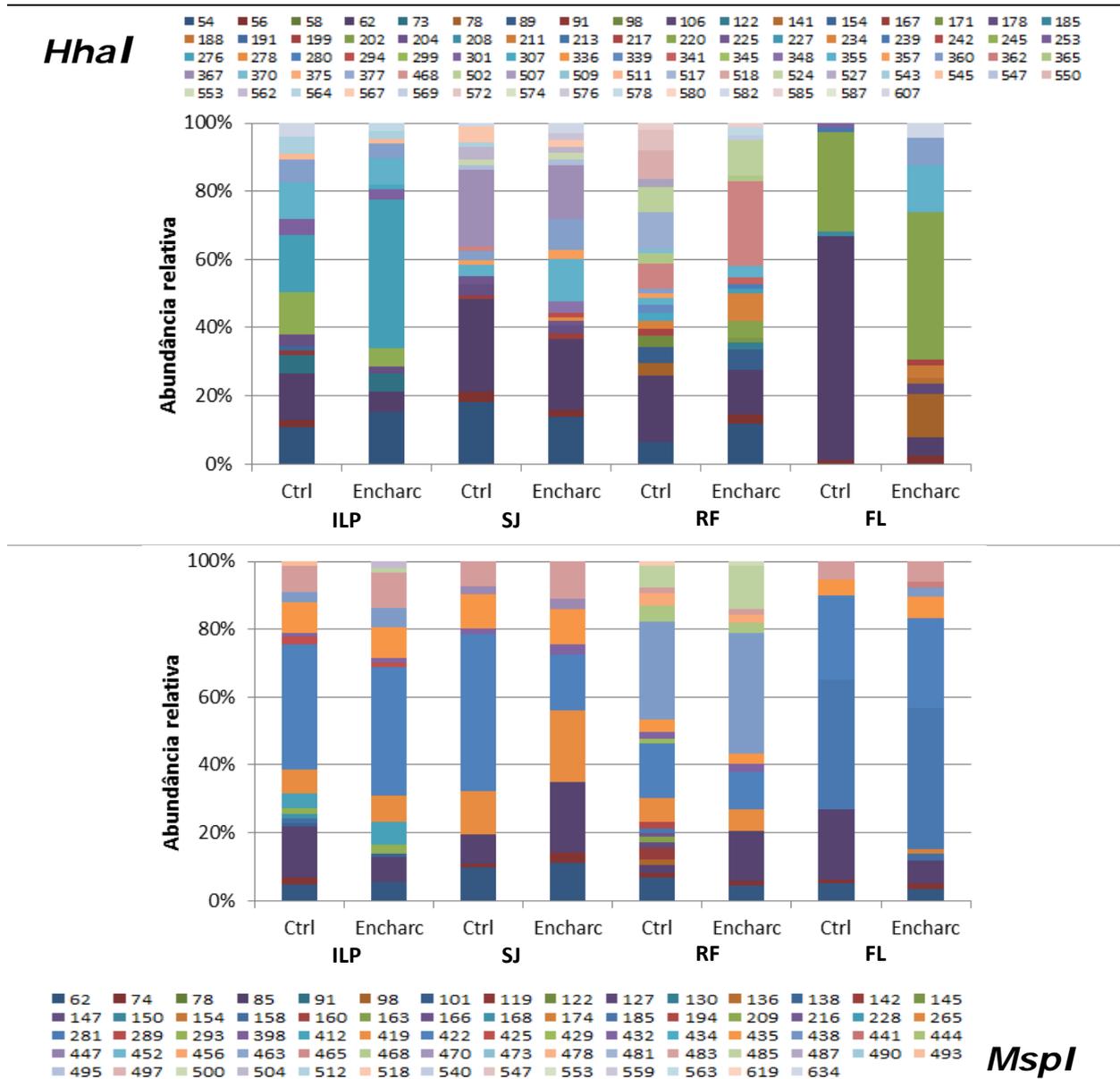


Figura 3.8 – Abundância relativa das UTOs dominantes (>1% de representatividade) do gene 16S rRNA de comunidades de *Archaea* clivadas com a endonuclease *HhaI* e *MspI*, com solos de integração lavoura-pecuária (ILP), soja/milheto desmatadas em 1996 (SJ); reflorestamento (RF) e floresta (FL) sob encharcamento (Encharc) comparado a um controle (Ctrl).

Bacteria - HhaI

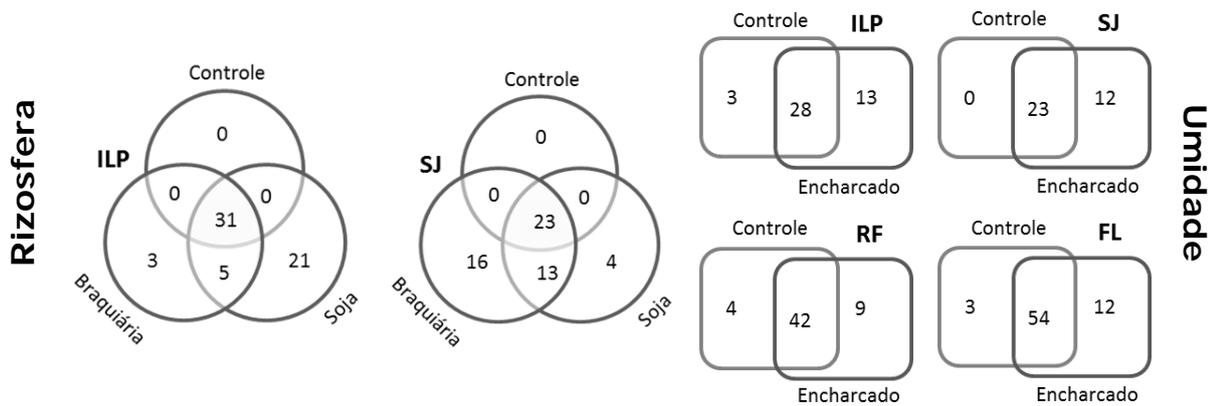


Figura 3.9 – Diagrama de Venn do gene 16S rRNA de comunidades de *Bacteria*, clivadas com a endonuclease *HhaI*, sob interação rizosférica e elevação da umidade com solos de integração lavoura-pecuária (ILP), soja/milheto desmatadas em 1996 (SJ); reflorestamento (RF) e floresta (FL).

Bacteria - MspI

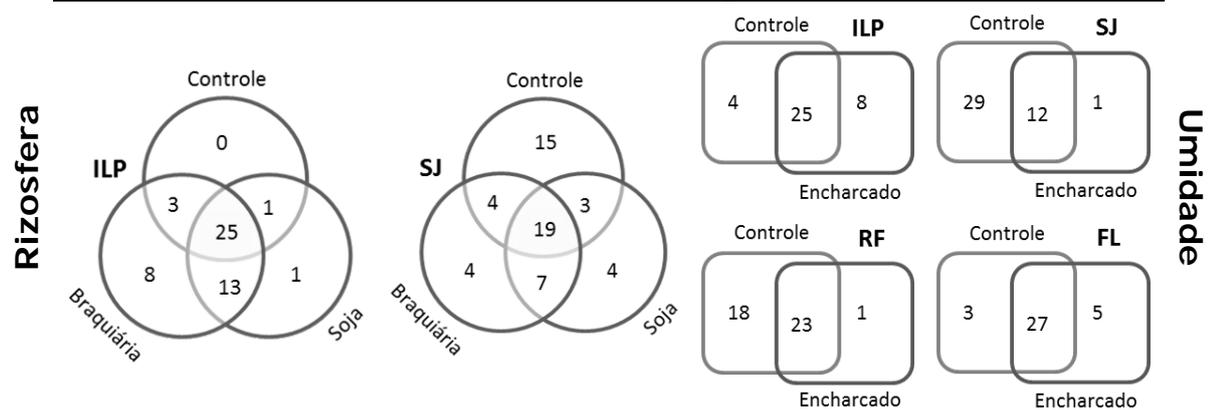


Figura 3.10 – Diagrama de Venn do gene 16S rRNA de comunidades de *Bacteria*, clivadas com a endonuclease *MspI*, sob interação rizosférica e elevação da umidade com solos de integração lavoura-pecuária (ILP), soja/milheto desmatadas em 1996 (SJ); reflorestamento (RF) e floresta (FL).

Archaea - HhaI

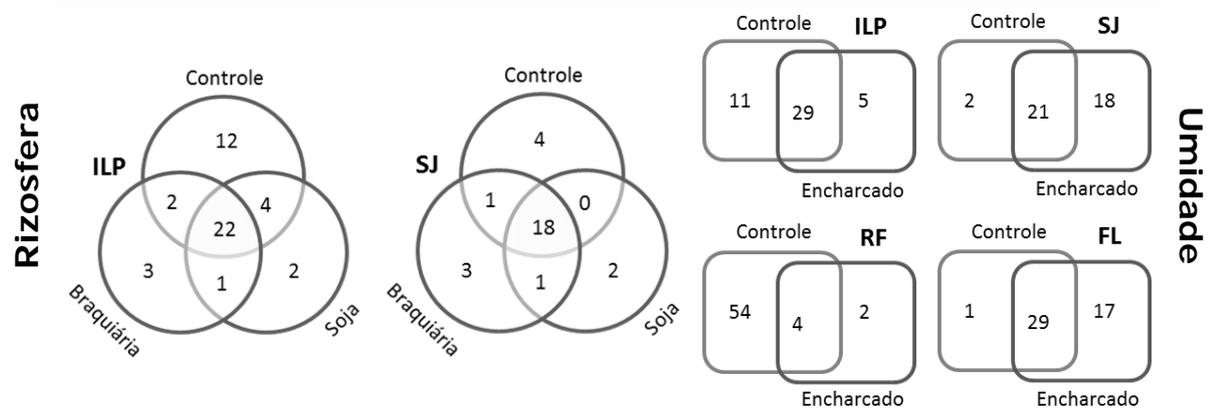


Figura 3.11 – Diagrama de Venn do gene 16S rRNA de comunidades de *Archaea*, clivadas com a endonuclease *HhaI*, sob interação rizosférica e elevação da umidade com solos de integração lavoura-pecuária (ILP), soja/milheto desmatadas em 1996 (SJ); reflorestamento (RF) e floresta (FL).

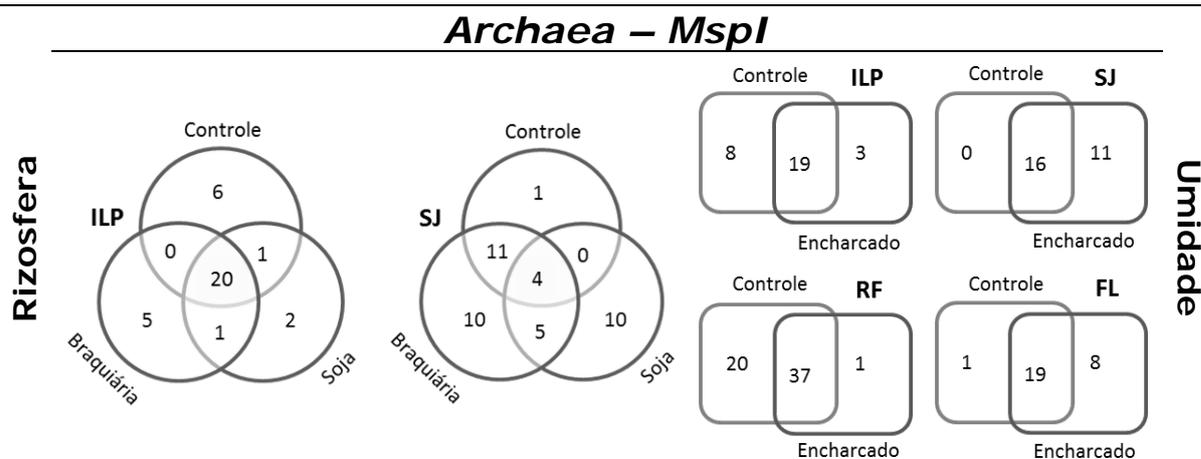


Figura 3.12 – Diagrama de Venn do gene 16S rRNA de comunidades de *Archaea*, clivadas com a endonuclease *MspI*, sob interação rizosférica e elevação da umidade com solos de integração lavoura-pecuária (ILP), soja/milheto desmatadas em 1996 (SJ); reflorestamento (RF) e floresta (FL).

3.4 Conclusão

Considerando a confiabilidade e a sensibilidade das técnicas empregadas – qPCR e TRFLP – e os métodos estatísticos, foi possível observar que os microrganismos são estruturados, primariamente, em função do tipo de solo e consecutivo efeito rizosférico dos vegetais. Todavia, em comparação com o estudo anterior, para que haja maior distinção das áreas é necessária a condução do experimento por uma escala maior de tempo.

E a saturação hídrica promove o crescimento das comunidades metanogênicas somente nos solos de floresta, onde ocorre maior incorporação de matéria orgânica. E nos sistemas agrícolas houve a redução dessa comunidade.

Em contrapartida a comunidade de metanotróficas de maneira geral não apresentou variação, mostrando que não houve relação do tamanho de sua população com o consumo do metano. Isto implica na utilização em uma utilização concomitante a outras fontes de carbono na obtenção de energia para sua sobrevivência.

REFERÊNCIAS

BADRI, D. V.; VIVANCO, J. M. Regulation and function of root exudates. **Plant, Cell and Environment**, v. 32, p. 666–681, 2009.

BAIS, H. P.; PARK, S.; WEIR, T. L.; CALLAWAY, R. M.; VIVANCO, J. M. How plants communicate using the underground information superhighway. **TRENDS in Plant Science**,

v. 9, n. 1, p. 26-32, 2004.

BECKER, S.; BÖGER, P.; OEHLMANN, R.; ERNST, A. PCR Bias in Ecological Analysis: a Case Study for Quantitative Taq Nuclease Assays in Analyses of Microbial Communities. **Appl. Environ. Microbiol.** V. 66, n. 11, p. 4945-4953, 2000.

GIRVAN, M. S.; BULLIMORE, J.; PRETTY, J. N.; MARK OSBORN, A.; BALL, A. S. Soil Type Is the Primary Determinant of the Composition of the Total and Active Bacterial Communities in Arable Soils. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 3, p 1800-1809, 2003.

HAMILTON, S. K.; SIPPEL, S. J.; MELACK, J. M. Oxygen depletion and carbon dioxide and methane production in waters of the Pantanal wetland of Brazil. **Biogeochemistry**, v. 30, p. 115-141, 1995.

HARTER, J.; KRAUSE, H.; SCHUETTLER, S.; RUSER, R.; FROMME, M.; SCHOLTEN, T.; KAPPLER, A.; BEHRENS, S. Linking N₂O emissions from biochar-amended soil to the structure and function of the N-cycling microbial community. **The ISME Journal**, p. 1-15, 2013)

HUTSCH, B. W.; AUGUSTIN, J.; MERBACH, W. Plant rhizodeposition an important source for carbon turnover in soils. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, n. 165, p.397-407, 2000.

LAUBER, C. L.; STRICKLAND, M. S.; BRADFORD, M. A.; FIERER, N. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2407-2415, 2008.

KNUDSON, L. The secretion of invertase by plant roots. **American Journal of Botany**, v.7, p. 371-379, 1920.

LINN; D. M.; DORAN, J. W. Aerobic and Anaerobic Microbial Populations in No-till and Plowed Soils. **Soil Science Society of American Journal**, v. 48, n. 4, p. 794-799, 1984.

LUEDERS, T.; FRIEDRICH, M. W. Evaluation of PCR Amplification Bias by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Small-Subunit rRNA and *mcrA* Genes by Using Defined Template Mixtures of Methanogenic Pure Cultures and Soil DNA Extracts. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 1, p. 320-326, 2003.

MONTEIRO, F. P.; PACHECO, L. P.; LORENZETTI, E. R.; ARMESTO, C.; SOUZA, P. E.; ABREU, M. S. Exsudatos radiculares de plantas de cobertura no desenvolvimento de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 87-93, 2012.

MONTERLE, D. F.; SILVA, L. S. da; MORO, V. J.; BAYER, c.; ZSCHORNACK, T.; AVILA, L. A.de; CAS BUNDT, A das. Methane efflux in rice paddy field under different irrigation managements. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, v. 37, n. 2, p. 431-437, 2013

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

NGUYEN, C. Rhizodeposition of organic C by plant, mechanisms and controls. **Agronomie**, v. 23, p. 375–396, 2003.

OLIVEIRA, F. A.; SFREDO, G. J.; CASTRO, C. de; KLEPKER, D. **Fertilidade do solo e nutrição da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 8 p. (Embrapa Soja, Circular Técnica, 50).

PAUSTIAN, K.; ANDRÉN, O.; JANZEN, H. H.; LAL, R.; SMITH, P.; TIAN, G.; TIESSEN, H.; VAN NOORDWIJK, M.; WOOMER, O. L. Agricultural soils as a sink to mitigate CO₂ emissions. **Soil Use Manag**, v. 13, p. 230–44, 1997.

PIELOU, E.C. **The interpretation of ecological data** – a primer on classification and ordination. New York: John Wiley & Sons, 2000. 263 p.

RADMAN, R.; SAEZ, T.; BUCKE, C.; KESHAVARZ, T. Elicitation of plants and microbial cell systems. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 91-102, 2003.

SHARMA, R.; RYAN, K.; HAO, X.; LARNEY, F. J.; McALLISTER, T. A.; TOPP, E. Real-Time Quantification of *mcrA*, *pmoA* for Methanogen, Methanotroph Estimations during Composting. **Journal of Environmental Quality**, v. 40, p. 199-205, 2011.

SIRIVEDHIN, T.; GRAY, K. A. Factors affecting denitrification rates in experimental wetlands: field and laboratory studies. **Ecol Eng**, v. 26, p. 167–81, 2006.

STROBEL, B. J.; BERNHOFT, I.; BORGGAARD, O. K. Low-molecular-weight aliphatic carboxylic acids in soil solutions under different vegetations determined by capillary zone electrophoresis. **Plant and Soil**, v. 212, p. 115-121, 1999.

SOUCHIE, E. L.; ABOUD, A. C. S. Solubilização de fosfato por microrganismos rizosféricos de genótipos de Guandu cultivados em diferentes classes de solo. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 11-18, 2007.

TAKETANI, R. G.; YOSHIURA, C. A.; DIAS, A. C. F.; ANDREOTE, F. D.; TSAI, S. M. Diversity and identification of methanogenic archaea and sulphate-reducing bacteria in sediments from a pristine tropical mangrove. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 97, p. 401–411, 2010.

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

APÊNDICE A

Tabela A.1 - Quantificação média dos genes das áreas amostradas.

Ano	Área	Número de cópias dos genes (g.solo ⁻¹)			
		<i>Bacteria</i>	<i>Archaea</i> *	<i>pmoA</i> *	<i>mcrA</i> *
2012	ILP A	$2,9 \times 10^9$	$2,0 \times 10^{6a}$	$1,5 \times 10^{4cde}$	$2,3 \times 10^{1gh}$
	ILP B	$5,7 \times 10^9$	$2,6 \times 10^{6a}$	$1,7 \times 10^{4cde}$	$2,8 \times 10^{2fg}$
	SJ A	$2,6 \times 10^9$	$3,1 \times 10^{6a}$	$1,4 \times 10^{4cde}$	$1,4 \times 10^{3f}$
	SJ B	$3,1 \times 10^9$	$3,8 \times 10^{6b}$	$1,0 \times 10^{4de}$	$2,4 \times 10^{2fgh}$
	RF	$5,9 \times 10^9$	$6,3 \times 10^{5a}$	$2,7 \times 10^{4cd}$	$1,7 \times 10^{2gh}$
	FL	$3,4 \times 10^9$	$3,5 \times 10^{6a}$	$2,9 \times 10^{4cde}$	$1,4 \times 10^{2fgh}$
2013	ILP A	$3,8 \times 10^9$	$5,0 \times 10^{6a}$	$1,9 \times 10^{4cde}$	$7,4 \times 10^{1fgh}$
	ILP B	$4,3 \times 10^9$	$2,1 \times 10^{6a}$	$1,5 \times 10^{4cde}$	$1,4 \times 10^{2fgh}$
	SJ A	$2,4 \times 10^9$	$3,1 \times 10^{6a}$	$9,4 \times 10^{3e}$	$1,8 \times 10^{1gh}$
	SJ B	$2,7 \times 10^9$	$4,3 \times 10^{6a}$	$1,2 \times 10^{4de}$	$4,4 \times 10^{0h}$
	RF	$2,7 \times 10^9$	$3,1 \times 10^{5b}$	$9,8 \times 10^{4c}$	$2,5 \times 10^{2fgh}$
	FL	$2,3 \times 10^9$	$2,3 \times 10^{6a}$	$5,8 \times 10^{4cde}$	$2,3 \times 10^{2fgh}$

ILP A e B: áreas de integração lavoura-pecuária; **SJ A e B:** áreas de soja/milheto desmatadas em 1996 e 2004, respectivamente; **RF:** área de reflorestamento e **FL:** área de fragmento florestal.

Nas coletas de 2012, a cultura presente na área de ILP A era pastagem; em ILP B, milho. E em 2013, soja e pastagem, respectivamente.

*As médias com mesma letra não são significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0,05$).

Tabela A.2 – Quantificação média dos genes das amostras do experimento de mesocosmos.

Área	Mesocosmo Tratamento	Número de cópias dos genes			
		<i>Bacteria</i>	<i>Archaea</i> *	<i>pmoA</i> *	<i>mcrA</i> *
ILP	Braquiária	$6,8 \times 10^9$	$1,4 \times 10^{7a}$	$1,5 \times 10^{4fg}$	$8,7 \times 10^{2i}$
	Soja	$5,2 \times 10^9$	$1,6 \times 10^{7a}$	$1,8 \times 10^{4f}$	$2,7 \times 10^{2ij}$
	Controle	$4,7 \times 10^9$	$1,1 \times 10^{7a}$	$1,3 \times 10^{4fg}$	$2,2 \times 10^{2ij}$
	Encharcado	$8,6 \times 10^9$	$1,2 \times 10^{7a}$	$9,6 \times 10^{3gh}$	$1,5 \times 10^{2ijk}$
SJ	Braquiária	$3,4 \times 10^9$	$5,2 \times 10^{6b}$	$1,1 \times 10^{4gh}$	$1,9 \times 10^{1jkl}$
	Soja	$3,7 \times 10^9$	$5,1 \times 10^{6b}$	$1,9 \times 10^{4f}$	$5,6 \times 10^{0l}$
	Controle	$3,0 \times 10^9$	$4,1 \times 10^{6b}$	$1,4 \times 10^{4fg}$	$1,1 \times 10^{1kl}$
	Encharcado	$3,4 \times 10^9$	$4,2 \times 10^{6b}$	$8,9 \times 10^{3gh}$	$4,7 \times 10^{0l}$
RF	Controle	$5,4 \times 10^9$	$2,1 \times 10^{6c}$	$3,0 \times 10^{4e}$	$1,2 \times 10^{2ijk}$
	Encharcado	$5,9 \times 10^9$	$2,5 \times 10^{6c}$	$3,5 \times 10^{4e}$	$3,6 \times 10^{1jkl}$
FL	Controle	$4,8 \times 10^9$	$4,6 \times 10^{6b}$	$6,8 \times 10^{4d}$	$1,3 \times 10^{1kl}$
	Encharcado	$5,1 \times 10^9$	$5,9 \times 10^{6b}$	$4,0 \times 10^{4e}$	$4,7 \times 10^{1jkl}$

ILP: área de integração lavoura-pecuária; **SJ:** áreas de soja/milheto desmatada em 1996; **RF:** área de reflorestamento e **FL:** área de fragmento florestal.

*As médias com mesma letra não são significativamente diferentes. (Tukey, $p \leq 0,05$)