

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

LEANDRO FONSECA DE SOUZA

Desmatamento e pastagens na Amazônia:
impactos do manejo de acidez e da rizosfera de *Urochloa brizantha*
sobre a ciclagem de metano no solo e microbiota associada

Piracicaba
2020

LEANDRO FONSECA DE SOUZA

Desmatamento e pastagens na Amazônia:
impactos do manejo de acidez e da rizosfera de *Urochloa brizantha*
sobre a ciclagem de metano no solo e microbiota associada
Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e
no Ambiente

Orientadora: Prof^a. Dr^a Tsai Siu Mui

Piracicaba

2020

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)

Técnica de Biblioteca - CENA/USP

de Souza, Leandro Fonseca

Desmatamento e pastagens na Amazônia: impactos do manejo de acidez e da rizosfera de *Urochloa brizantha* sobre a ciclagem de metano no solo e microbiota associada / Leandro Fonseca de Souza; Tsai Siu Mui. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2020.

132 p.: il.

Tese (Tese – 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, 2020.

1. Conservação do solo. 2. Ecologia microbiana 3. Gases de efeito estufa. 4. Microbiologia ambiental 5. Mudanças climáticas I. Título

CDU 579.26 : 551.583

Elaborada por:

Marília Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

À minha esposa, grato pelo amor, compreensão e estímulo,
essenciais para que finalizasse este trabalho.

Agradecimentos

às **agências de fomento** FAPESP, CNPq e CAPES, porque pelas bolsas concedidas tive suporte para realizar este trabalho | minha orientadora **profa. tsai siu mui**, que me recebeu, deu suporte e apoio e me puxou a ir mais longe | meu supervisor durante estágio na UMASS/EUA, **prof. klaus nüsslein**, por toda discussão, amizade, apoio e acolhida, por me fazer mais crítico | ao programa LBA (Programa de Grande Escala Biosfera-Atmosfera na Amazônia), coordenado pelo INPA, pelo uso e disponibilização dos dados, suporte logístico e infraestrutura durante as atividades de campo | aos proprietários e gestores da Fazenda Nova Vida e aristeu, rigoberto, tocandira, manguito, elói e bernardo pelo acesso às suas propriedades e suporte à pesquisa | **profa. carol quecine** pela supervisão nos estágios PAE e motivação para docência acadêmica | profa. vivian pellizari e rosa por disponibilizarem o laboratório e apoio para realizar a técnica de SIP | prof. marcelo, pelo apoio com as análises isotópicas | prof. plinio, ralf, liliam e morgado, pelo apoio do laboratório de biogeoquímica ambiental | profa. marli e ana andreote, por manterem as portas de seu laboratório sempre abertas | prof. pavinato pela ajuda com cálculos para calagem e naissa com cálculos de fluxo de gases | lucas mendes, acacio e prof. fernando andreote, pelas orientações valiosas | ao amigo **dasiel**, pelas constantes discussões, revisões críticas de texto e palavras de ânimo | ao amigo luiz horta, pelas discussões, leituras críticas e apoio nos EUA | a meus amigos e aos colegas de laboratório no brasil: **leandro lemos**, caciara, fernanda, miriam, moacir, luis, alexandre, andressa, fabiana cannavan, wagner, fabio duarte, cleuza, wanderlei, jessica, nathalia, fabiana paula, carol, julia, mariley, lucas palma, yara, deisi, dani, bia, andreia, clovis, andreas, caio, aline e nos EUA: **john fellows**, emily e marie – pelas discussões científicas, boas conversas e apoio na pesquisa | aos estagiários que fizeram esta pesquisa ser mais leve e produtiva, pelo apoio na realização dos experimentos: **fabio gomes, cassio**, samela, mariana e marcos | à minha **mãe**, que sempre me deu suporte, palavras de ânimo e orações | à minha tia luzimar, que me inspirou como a primeira a concluir o ensino superior na família, e me encorajou a ser o segundo | à minha **esposa** e melhor amiga, que sempre me estimula a ir mais longe, a pensar e fazer o melhor, compartilhando tudo, alegrias e pesares | ao Estado brasileiro, pelas **políticas públicas** de inclusão e permanência no ensino superior que me ofereceram oportunidade de chegar ao doutorado | a **Deus**, que me dá sentido, vida plena e sonhos: “pois nele vivemos, nos movemos e existimos”.

FAPESP: bolsa de doutorado (2018/09117-1) e apoio por projeto temático NSF-FAPESP BIOTA (2014/50320-4)

CNPq: bolsa de doutorado (140953/2017-5) e apoio por bolsa de produtividade ao orientador (311008/2016-0)

CAPES: bolsa de doutorado (001) e de doutorado sanduíche (88881.189492/2018-01)

"The world is changing: I feel it in the water, I feel it in the earth, and I smell it in the air."

J. R. R. Tolkien, *The Return of the King*

RESUMO

DE SOUZA, L. F. **Desmatamento e pastagens na Amazônia**: impactos do manejo de acidez e da rizosfera de *Urochloa brizantha* sobre a ciclagem de metano no solo e microbiota associada. 2020. 132 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020.

Na região amazônica, pastagens são o principal uso do solo após desmatamento. Esta conversão afeta a ciclagem de metano no solo, mudando o balanço no fluxo de gases de dreno de metano atmosférico sob floresta para emissores sob pastagem. Nesta pesquisa avaliou-se como o manejo de pastagens pode afetar o processo, considerando a cobertura do solo por *Urochloa brizantha* cv. Marandu e sua rizosfera, e a calagem destes solos a pHs 5,8-6,5. O papel da acidez de solos de floresta no sequestro de metano também foi testado. Dois experimentos foram conduzidos em condições controladas de casa de vegetação, partindo de solos de floresta e pastagem do leste e do oeste amazônico, além de estudo em campo. Também foram realizadas incubações dos solos sob condições de laboratório com $^{13}\text{CH}_4$ para utilização da técnica de Sondas de Isótopos Estáveis (SIP-DNA). A microbiota associada à ciclagem de metano no solo foi avaliada por quantificação de genes *pmoA* e *mmoX* (metanotróficos), *mcrA* (metanogênicos) e pelo sequenciamento massivo do gene 16S *rRNA*. Observou-se que a cobertura do solo com capim Marandu, em contraponto a um solo descoberto, aumenta o sequestro de metano pelo solo em até 35% e reduz em até 10x a abundância absoluta de arqueias metanogênicas na rizosfera, compostas pelos gêneros *Methanosarcina sp.*, *Methanocella sp.*, *Methanobacterium sp.* e Rice Cluster I. A calagem de solos de pastagem pode aumentar o sequestro de metano no solo sob altas concentrações de metano, com aumento da atividade de metanotróficas *Beijerinckiaceae* (tipo II) e *Methylocaldum sp.* (tipo I), ou pode reduzir esta capacidade sob concentrações atmosféricas, sem alteração significativa da abundância absoluta de metanotróficas ou metanogênicas. Observou-se também que a calagem de solos de floresta reduz sua capacidade de oxidação de metano, podendo torná-los emissores, sem alterações significativas na abundância absoluta de metanotróficas ou metanogênicas. Estes resultados apontam o potencial do manejo de pastagens, por calagem e conservação da cobertura do solo com gramínea, na mitigação de emissões de metano da atividade pecuária na região amazônica. Indicam também a necessidade de pesquisas de validação em campo considerando a sazonalidade das chuvas e exposição do solo a condições de saturação de umidade, favoráveis à metanogênese.

Palavras-chave: Mudanças climáticas. Gases de efeito estufa. Conservação do solo. Ecologia microbiana. Microbiologia ambiental.

ABSTRACT

DE SOUZA, L. F. **Deforestation and pastures in the Amazon**: impacts of soil acidity management and of *Urochloa brizantha* rhizosphere on the methane microbial community. 2020. 132 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020.

In the Amazon region, pastures are the main land-use after deforestation. This land conversion affects soil methane cycling, changing the soils from being a sink of atmospheric methane to becoming a source. Here, we evaluate how the management of pastures can affect this process, considering the rhizosphere of the common pasture grass *Urochloa brizantha* cv. Marandu and soil liming to pHs 5.8-6.5. We also tested the importance of soil acidity in forest soils to methane sinking. Two greenhouse experiments were set using forest and pasture soils from eastern and western Amazonia, incubations with $^{13}\text{CH}_4$ for DNA stable isotope probing (SIP-DNA) and field measurements (gas flux, soil chemistry, etc.). The methane cycling microbiota was accessed by quantifying its marker genes *pmoA* and *mmoX* (methane oxidation), *mcrA* (emissions) and by high throughput sequencing of 16S *rRNA* gene. We observed that acidic pasture soils with grass coverage had up to 35% higher methane sinking, and a 10-fold reduced abundance of methanogens in the grass rhizosphere vs bulk soil, comprising *Methanosarcina* spp., *Methanocella* spp., *Methanobacterium* spp. and Rice Cluster I. Furthermore, liming pasture soils can increase methane sinking under high concentrations of this gas by active methanotrophs *Beijerinckiaceae* (type II) and *Methylocaldum* sp. (type I), and reduce sinking under atmospheric concentrations, with no changes on methanotrophs or methanogens absolute abundance. We also find that liming acidic forest soils can reduce its methane oxidation, shortly turning them to sources, with no changes on methanotrophs or methanogens absolute abundance. These results show the potential of pasture management by liming soils and conserving a grass coverage on soils to mitigate soil methane emissions. It also indicates the need of research to validate these results under field conditions, considering the rain seasonality in the region and under soil moisture saturation, as favorable conditions to methanogenesis.

Keywords: Climatic changes. Greenhouse gases. Soil conservation. Microbial ecology. Environmental microbiology.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Conversão da floresta amazônica a pastagens e a ciclagem de metano no solo	17
2.2 Microbiota produtora e consumidora de metano	18
2.3 Microbiota associada à ciclagem de metano na conversão de floresta amazônica a pastagem.....	20
2.4 Metano e pH do solo	22
2.5 Metano e rizosfera.....	24
2.6 Técnicas de estudo em biogeoquímica do metano	25
Referências	30
3. RIZOSFERA DE BRAQUIÁRIA REDUZ ABUNDÂNCIA DE ARQUÉIAS METANOGÊNICAS E CONTRIBUI COM O SEQUESTRO DE METANO EM SOLOS DE PASTAGEM NA AMAZÔNIA.....	41
Resumo.....	41
Abstract.....	42
3.1 Introdução	43
3.2 Materiais e Métodos	46
3.2.1 Local de amostragem.....	46
3.2.2 Experimentos em mesocosmos	47
3.2.3 Determinação de fluxos gases de efeito estufa.....	48
3.2.4 Caracterização das propriedades químicas das amostras de solo	48
3.2.5 Extração de DNA.....	49
3.2.6 Abundância de produtores e consumidores de metano	49
3.2.7 Sequenciamento de porção do gene 16S <i>rRNA</i> com MiSeq®	50
3.2.8 Análises filogenéticas	51
3.2.9 Análises estatísticas	52
3.3 Resultados	53
3.4 Discussão.....	60
3.5 Conclusão	64
Referências	65

4. CALAGEM DE SOLOS DE PASTAGEM NA REGIÃO AMAZÔNICA ESTIMULA A OXIDAÇÃO DE METANO DE BAIXA AFINIDADE COM AÇÃO DE METANOTRÓFICAS TIPO I E II.....	73
Resumo	73
Abstract.....	74
4.1 Introdução.....	75
4.2 Materiais e Métodos.....	77
4.2.1 Descrição dos sítios.....	77
4.2.2 Incubação preliminar sob distintas concentrações de $^{12}\text{CH}_4$	78
4.2.3 Correção de acidez.....	78
4.2.4 Medidas de concentração de CH_4	79
4.2.5 Incubação com $^{13}\text{CH}_4$ e fracionamento do DNA.....	79
4.2.6 Caracterização das propriedades químicas das amostras de solo.....	80
4.2.7 Extração de DNA	80
4.2.8 Fracionamento do DNA por ultracentrifugação.....	81
4.2.9 Quantificação de gene marcador para consumo de metano (qPCR).....	81
4.2.10 Sequenciamento de porção do gene 16S <i>rRNA</i> com MiSeq®.....	82
4.2.11 Análises filogenéticas	83
4.2.12 Análises estatísticas	83
4.2.13 Análise de abundância diferencial entre grupos bacterianos.....	84
4.3 Resultados.....	85
4.4 Discussão	94
4.5 Conclusão.....	100
Referências.....	100
5. CONCLUSÕES GERAIS	109
APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO 3	113
APÊNDICE B – MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO 4	123

1. INTRODUÇÃO

O desmatamento na Amazônia seguido pelo estabelecimento de pastagens é uma realidade, que necessita ser entendida quanto a seus impactos nos fluxos de gases de efeito estufa entre solo e atmosfera, sobre os microrganismos no solo, e suas consequências sobre as mudanças climáticas. Nos últimos 30 anos têm-se acumulado conhecimento sobre como essa conversão pode afetar os balanços de produção e sequestro de gás metano pelo solo. Além disto, estes estudos trouxeram indicações de fatores na composição química e na estrutura do solo que são relevantes e explicam parte das alterações observadas. A fronteira atual está no entendimento do microbioma do solo, sobre quem são os microrganismos associados aos processos de transformação do metano na região, qual seu papel no ecossistema e como podem ser manejados.

Entender o microbioma e suas interações entre microrganismos e com o ambiente é um problema complexo, que exige uma abordagem interdisciplinar. No sentido de compreender melhor este sistema, são apresentados aqui resultados de medidas de fluxo de metano, composição química do solo, dinâmica da comunidade microbiana, abundância de microrganismos produtores e consumidores e discriminação dos ativos no sequestro de metano. No trabalho são considerados solos de floresta e pastagem do Leste e Oeste Amazônico, manejo com calagem e com cobertura de gramínea, e são somadas observações de campo a estudos em condições controladas em laboratório e casa de vegetação.

A hipótese inicial do estudo propunha que o manejo do solo de pastagem com calagem e a cobertura do solo com gramínea poderiam favorecer o sequestro de metano no solo. O mecanismo explicativo seria o aumento da abundância das bactérias que sequestram metano no solo pós calagem e na rizosfera da gramínea, por estes ambientes apresentarem condições edáficas que podem favorecer a proliferação destes microrganismos. O primeiro capítulo apresenta a pesquisa desenvolvida para testar esta hipótese. Após obtidos os resultados preliminares, uma nova hipótese foi estabelecida, de que a atividade das bactérias oxidadoras de metano poderia ser modificada pela correção de acidez do solo, independente de uma resposta na abundância desses microrganismos. Esta hipótese foi testada no segundo capítulo.

Com o fim de contextualizar os temas abordados, conceitos relevantes e técnicas utilizadas na pesquisa, o capítulo introdutório apresenta uma revisão de literatura. São abordados a relação da mudança do uso do solo na Amazônia e os fluxos de metano no solo, os microrganismos que atuam na produção e sequestro do metano e como as alterações do uso do solo os afetam, o papel do pH do solo e da rizosfera sobre o processo e, de forma geral, técnicas que podem ser utilizadas neste tipo de estudo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Conversão da floresta amazônica a pastagens e a ciclagem de metano no solo

O metano é um gás de composição CH_4 , encontrado na atmosfera em concentrações de 1,803 ppm (partes por milhão) (IPCC, 2013). Apesar das baixas concentrações, é o terceiro gás de efeito estufa mais relevante, após o vapor de água e o dióxido de carbono. Sua relevância está no alto poder em reter calor na atmosfera, aproximadamente 34 vezes maior que o do CO_2 num horizonte de 100 anos, ou 86 vezes maior num horizonte de 20 anos (IPCC, 2013). A concentração atual de metano na atmosfera é 2,5 vezes maior que os 0,7 ppm observados há aproximadamente 270 anos, com as principais fontes sendo antropogênicas, como: produção e uso de energia, aterros, pecuária, cultivo alagado de arroz e queima de biomassa (IPCC, 2013). Fontes naturais de metano para atmosfera são solos alagados, cupinzeiros, oceanos, queimadas naturais e fontes geológicas (IPCC, 2013). A origem do metano atmosférico é principalmente biológica (70-80%); arqueias metanogênicas são a principal fonte, produzindo o metano por vias anaeróbias e este pode ser novamente incorporado à matéria orgânica por bactérias metanotróficas por oxidação do metano em zonas aeróbias (LE MER; ROGER, 2001). Além do metano que deixa de ser emitido à atmosfera por ser consumido por metanotróficas, 5% do metano atmosférico é removido por ação destas bactérias (KNIEF, 2015). A maior parte do metano é removida da atmosfera por reações fotoquímicas com radicais OH^\cdot na atmosfera ou com radicais de Cloro e Oxigênio na estratosfera (IPCC, 2013).

O desmatamento na região amazônica tem como principal resultado o estabelecimento de pastagens para pecuária extensiva (MARGULIS, 2003; MORTON et al., 2006). Esta atividade representa 50% das emissões de gases de efeito estufa no Brasil, sendo que as emissões pelo solo de pastagem já chegaram a superar em mais de 20% as emissões de combustíveis fósseis brasileira (BUSTAMANTE et al., 2012; FEARNSSIDE; BARBOSA, 1998). Dentre os solos de terra firme, solos de floresta são tidos como dreno de CH_4 tanto em clima temperado (HENCKEL; ROSLEV; CONRAD, 2000; STEINKAMP; BUTTERBACH-BAHL; PAPEN, 2001) quanto tropical (KELLER et al., 2005; KELLER; KAPLAN; WOFYSY, 1986). No entanto, o desmatamento seguido do estabelecimento de pastagens para

pecuária, converte esses solos a emissores (FERNANDES et al., 2002; GOREAU; DE MELLO, 1988; LAMMEL et al., 2015; MEYER et al., 2020; STEUDLER et al., 1996). As emissões por solos de pastagem são o saldo de um balanço anual, de forma que na estação seca há maior sequestro e na estação chuvosa, maior emissão (STEUDLER et al., 1996; VERCHOT et al., 2000). Nesta região, o clima é classificado como Am (Köppen), tropical úmido, portanto com pequena variação anual de temperatura, inferior a 5 °C, e com altas precipitações, maiores que 2.500 mm anuais (ALVARES et al., 2013). A estação chuvosa acontece entre os meses de dezembro e junho.

2.2 Microbiota produtora e consumidora de metano

Os microrganismos capazes de produzir metano são classificados entre as arqueias e chamados metanogênicas. Constituem seis ordens no filo Euryarcheota: *Methanomicrobiales*, *Methanocellales*, *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales*, *Methanococcales* e *Methanopyrales* (ANGEL; CLAUS; CONRAD, 2012), com candidatos no filo Bathyarchaeota (KALLISTOVA et al., 2017). A metanogênese das arqueias é o último processo em uma sequência de passos que se inicia com a hidrólise de polímeros, fermentação e termina com produção de CH₄, através da ação da enzima metil coenzima M redutase, que tem o gene *mcrA* como marcador para estudos ambientais (SERRANO-SILVA et al., 2014). São ubíquos, encontrados em ambientes como solos de terra firme, oceanos e rios e rúmen animal. *Methanosarcina spp.* e *Methanocella spp.* se destacam como os gêneros mais encontrados globalmente, capazes de suportar a presença de oxigênio em ambientes como solos de terra firme, e se tornando ativos sob condições de alta umidade e baixa disponibilidade de oxigênio (ANGEL; CLAUS; CONRAD, 2012). O processo de metanogênese pode ser caracterizado de acordo com seu substrato, sendo hidrogenotrófico ($4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$) e acetoclástico ($\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{CH}_4$) os mais comuns (SERRANO-SILVA et al., 2014). Recentemente foi demonstrada a capacidade de produção de metano por cianobactérias e plantas, no entanto acredita-se que este é um subproduto formado nas reações em cadeia do processo fotossintético (BIŽIĆ et al., 2020; KEPPLER et al., 2006).

Bactérias metanotróficas são aquelas capazes de utilizar metano como fonte energética. São ubíquas, encontradas em todo tipo de solos, oceanos, e mesmo em ambientes com pHs extremos (CONRAD, 2009; KUSSMAUL; WILIMZIG; BOCK, 1998). Em solos, são comumente encontradas na interface óxido-anóxica. São gram-negativas e classificadas nos filos Proteobactéria e Verrucomicrobia, com candidatos no filo NC10. O filo Proteobacteria abriga as metanotróficas mais abundantes e melhor conhecidas e as classes que agrupam as bactérias metanotróficas mais comuns em solos são gama-proteobactéria (tipo I) e alfa-proteobactéria (tipo II) (KNIEF, 2015; PARK; LEE, 2013; SEMRAU; DISPIRITO; YOON, 2010). A separação em tipos (I e II) se baseava inicialmente em: composição de lipídeos da membrana celular, arranjo interno da membrana em discos, capacidade de fixar nitrogênio e morfologia (PARK; LEE, 2013). No entanto, estas características apresentam muitas exceções quando considerados os novos gêneros e espécies descobertos (KNIEF, 2015). A única característica que mostra capacidade de distinção entre os tipos (I e II) é a via bioquímica utilizada para assimilação do carbono a partir do formaldeído (etapa intermediária da fixação do metano). Metanotróficas do tipo I são gama-proteobactéria que assimilam formaldeído pela via ribulose monofosfato (RUMP), enquanto tipo II são alfa-proteobactéria que utilizam a via serina. A via RUMP é teoricamente mais eficiente que a via das serinas na incorporação do metano em biomassa, considerando a estequiometria das reações, mas os resultados experimentais disponíveis são inconclusivos (HILGER; HUMER, 2003). A etapa inicial da incorporação do metano se dá por sua conversão a metanol. Esta etapa é mediada pela enzima metano mono-oxigenase, que é codificada por genes conservados e que tem sido utilizados como marcadores para estudos em ecologia molecular: *pmoA* (constituente da subunidade beta da pMMO) e *mmoX* (constituente da subunidade alfa da sMMO) (HANSON; HANSON, 1996; KNIEF, 2015). A enzima metano mono-oxigenase é encontrada na natureza em duas formas: uma solúvel (sMMO) e outra particulada e ligada à membrana celular (pMMO). A enzima na forma particulada é mais comum, e encontrada na maior parte das metanotróficas de tipo I e II, enquanto que a enzima solúvel é presente principalmente em alguns gêneros na família Beijerinckaceae, e varia mesmo no nível de espécie (KNIEF, 2015). Há também um parálogo pMMO caracterizado pelo gene *pmoA2*, com atuação funcional distinta, capaz de permitir incorporação de

metano sob concentrações 10-100 vezes menores do que as concentrações ideais para funcionamento da enzima produto do gene *pmoA* (BAANI; LIESACK, 2008).

2.3 Microbiota associada à ciclagem de metano na conversão da floresta amazônica a pastagem

As relações entre mudanças no uso do solo e transformações da comunidade microbiana não são bem compreendidas (NAZARIES et al., 2013; TATE, 2015), mas impactam significativamente a diversidade microbiana na região amazônica (DE CARVALHO et al., 2016; JESUS et al., 2009; MENDES et al., 2015; NAKAMURA, 2019; NAVARRETE et al., 2015; PEDRINHO et al., 2019; RODRIGUES et al., 2013; VENTURINI, 2019). Em estudo com solos de floresta primária, pastagens com distintas idades de estabelecimento e floresta em regeneração no oeste amazônico, foi observado que o marcador para metanotrofia *pmoA* está relacionado significativamente a solos de floresta e que, apesar de não terem sido detectadas mudanças significativas na correlação de *mcrA* entre os solos, a metanogênese em pastagens pode ser favorecida devido à compactação do solo, redução da porosidade e aumento do pH e matéria orgânica (PAULA et al., 2014). Quanto à abundância destes microrganismos a partir dos números de cópias dos genes *pmoA* e *mcrA*, estudo no sul amazônico identificou maior abundância de ambos os grupos em solos de floresta do que em pastagens (LAMMEL et al., 2015). Sobre quem são os metanotróficos em solos de floresta amazônica em regeneração, foram detectadas prevalência de *Methylocystis spp.* e USC α , associadas à oxidação de CH₄ de alta afinidade em solos de terra firme (LIMA; MUNIZ; DUMONT, 2014). Este último grupo teve um isolado caracterizado recentemente e identificado como *Methylocapsa gorgona* (TVEIT et al., 2019), mas já era reconhecido como importante na oxidação de metano atmosférico em solos de terra firme (KNIEF; LIPSKI; DUNFIELD, 2003). Por ser uma identificação recente, não consta nos bancos de dados especializados em sequências de 16S *rRNA* SILVA-ARB versão 138 de 2019 (QUAST et al., 2013) ou RDP versão 11 de 2016 (COLE et al., 2014).

Em estudo com solos de floresta e pastagem no oeste amazônico, foram observadas redução da abundância relativa de metanotróficas em pastagens, bem como dos genes marcadores de metanotrofia e aumento da abundância relativa do principal marcador molecular de arqueias metanogênicas (*mcrA*) (MEYER et al.,

2017). Metanotróficas de tipo II (alfa-proteobactéria) predominam em solos de floresta, identificadas como: *Methylocapsa spp.*, *Methylocella spp.*, *Methylovirgula sp.*, *Methylocystis spp.*, *Methylopila sp.*, *Methylosinus spp.*, *Pleomorphonas sp.* De tipo I (gama-proteobactéria), foram identificadas sem mudança significativa entre solos de floresta e pastagem: *Methylobacter spp.*, *Methylohalobius sp.*, *Methylomicrobium spp.*, *Mithylomonas sp.*, *Methylothermus spp.*, *Methylocaldum spp.*, *Methylococcus spp.* Além delas, *Methylacidiphilum spp.* e *Crenotrix sp.* (MEYER et al., 2017). As arqueias metanogênicas identificadas foram *Methanomicrobium spp.*, *Methanobrevibacter spp.*, *Methanosphaera sp.*, *Methanothermobacter spp.*, *Methanocaldococcus sp.*, *Methanococcus spp.*, *Methanocella sp.*, *Methanocorpusculum sp.*, *Methanoculleus spp.*, *Methanofollis sp.*, *Methanospirillum sp.*, *Methanopyrus sp.*, *Methanosaeta spp.*, *Methanococcoides sp.*, *Methanolobus sp.*, *Methanosarcina spp* (MEYER et al., 2017). Venturini (2019) observou resultados similares no leste amazônico, não detectando as arqueias metanogênicas *Methanomicrobium sp.*, *Methanofollis sp.*, *Methanopyrus sp.*, *Methanosaeta sp.* e *Methanolobus sp.*, e somando às observações *Methanothermus sp.*, *Methanothermococcus sp.*, *Methanocaldococcus sp.*, *Methanoplanus sp.*, *Methanoregula sp.*, *Methanosphaerula sp.*, *Methanotherrix sp.*, *Methanohalobium sp.*, *Methanohalophilus sp.*, além de ter observado menos grupos de bactérias metanotróficas, sendo elas *Methylocella sp.*, *Methylosinus sp.*, *Methylobacter sp.*, *Methylococcus sp.*, *Methylacidiphilum sp.* Estes estudos basearam-se em dados de metagenoma do solo, e os bancos de dados utilizados ainda não incluíam no momento da análise informação taxonômica anotada como USCα, possível razão deste grupo não ter sido identificado.

Outros dois estudos exploraram essas comunidades no oeste e leste amazônico simultaneamente, a partir de sequenciamento massivo de DNA; em um deles foi identificado que a abundância relativa e a diversidade de arqueias metanogênicas são preditores dos fluxos de metano no solo, e ambos atributos são aumentados em pastagens. Ainda, que mudanças na composição dessas comunidades microbianas com o uso do solo alteram os fluxos de gás (MEYER et al., 2020). O segundo estudo avaliou a microbiota ativa na incorporação e na emissão de metano nos solos utilizando técnica de Sondas de Isótopos Estáveis (SIP) (KROEGER et al., 2020). Detectaram um aumento na abundância relativa e diversidade de microrganismos metanogênicos em pastagens (acetoclásticos e

hidrogenotróficos), mas sem alteração das metanotróficas ativas como um todo entre os usos do solo, e sim de grupos específicos. Por fim, observaram que metanotróficos com *pmmo* predominam sobre *smmo* em 94% dos solos avaliados (KROEGER et al., 2020).

2.4 Metano e pH do solo

Em pastagens estabelecidas em áreas antes sob floresta na região amazônica é comum uma queda de produtividade após poucos anos do desmatamento, atribuída à acidificação do solo e às pequenas reservas de nutrientes no solo, toxicidade de Alumínio e redução da porosidade, aeração e infiltração de água (DE MORAES et al., 1996; MULLER et al., 2001). Não havendo práticas adequadas de manejo, estas pastagens sofrem degradação. Estima-se que de 50-70% das pastagens na região apresentem algum nível de degradação (DIAS-FILHO, 2017). Com isto, além da perda de biodiversidade com o desmatamento, perdem-se os ganhos econômicos da pecuária. A calagem é uma prática agrícola utilizada para aumentar fertilidade do solo e corrigir sua acidez para níveis de pH que favoreçam a cultura de interesse a ser instalada. Ocorre por incorporação ao solo de materiais ricos em Cálcio e Magnésio para aumento do pH, neutralização de alumínio, fornecimento de Cálcio e Magnésio e alteração da disponibilidade de nutrientes (MALAVOLTA, 1981). Além de ser uma prática cada vez mais utilizada em solos agrícolas amazônicos para aumento da fertilidade, esta prática também impacta a ciclagem de metano no solo (KUNHIKRISHNAN et al., 2016).

O estabelecimento de pastagens em áreas de floresta na Amazônia é comumente precedido por queimadas (FEARNSIDE; BARBOSA, 1998); este processo leva a um aumento do pH da área, com consequente impacto sobre a comunidade microbiana do solo, por ser este um dos principais reguladores dessa comunidade (FIERER; JACKSON, 2006). Essa elevação do pH se dá por incorporação ao solo das cinzas da queima, que tem característica alcalina, eleva o conteúdo de bases trocáveis (Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^+) e dos teores de Fósforo disponível no solo, além de neutralizar o Alumínio trocável (DE ANDRADE, 2010). A elevação do pH também afeta o balanço entre metanogênese e metanotrofia, que é sensível à mudança de pH do solo (LE MER; ROGER, 2001; LIU et al., 2007).

A oxidação de metano por microrganismos metanotróficos é a única via biológica de assimilação deste gás de efeito estufa e o pH é uma força de controle da assimilação de metano pelo solo (HÜTSCH; WEBSTER; POWLSON, 1994). Este efeito do pH pode ser direto ou indireto, via redução da nitrificação e consequente aumento das concentrações de NH_4^+ , competidor com o CH_4 no sítio enzimático da metano mono-oxigenase, ou pela mobilização de Al^{3+} , que reduz atividade metanotrófica no solo (STIEHL-BRAUN et al., 2011). Apesar do pH ótimo da maioria das metanotróficas e metanogênicas cultiváveis ser neutro (entre 6,8-7,0) (GARCIA; PATEL; OLLIVIER, 2000; WHITTENBURY; DAVIES; DAVEY, 1970), a larga faixa de pHs onde oxidação e produção de metano acontece no solo sugere a presença de uma comunidade diversa atuando no processo (GARCIA; PATEL; OLLIVIER, 2000; SAARI; RINNAN; MARTIKAINEN, 2004).

O efeito da correção de acidez do solo sobre os fluxos de metano ainda é pouco compreendido, com estudos em campo em locais distintos do globo demonstrando resultados contrastantes, dada a complexidade do ciclo do metano, envolvendo química, física e biologia do solo (KUNHIKRISHNAN et al., 2016). Em solos de floresta boreal, a oxidação deste gás acontece entre pHs 3 e 8, com ótimo entre 4 e 7 (SAARI; RINNAN; MARTIKAINEN, 2004). Também em solos de floresta temperada foi observado um efeito do pH do solo na distribuição de metanotróficas, onde grupos de gama-proteobactéria foram detectados mais frequentemente em solos com $\text{pH} > 6,0$ do que em solos ácidos e o oposto foi observado para grupos de alfa-proteobactéria (KNIEF; LIPSKI; DUNFIELD, 2003). A calagem de solos em regiões temperadas pode levar a aumento ou redução do consumo de metano (BORKEN; BRUMME, 1997; BUTTERBACH-BAHL; PAPEN, 2002). Em áreas agrícolas com trigo a calagem levou a aumento de consumo de metano pelo solo (HÜTSCH; WEBSTER; POWLSON, 1994). O aumento do consumo após calagem foi observado em solos de semiárido sob trigo-tremoceiro e de triticale no mediterrâneo (BARTON; MURPHY; BUTTERBACH-BAHL, 2013; GARCÍA-MARCO et al., 2016). Quanto aos solos tropicais, em avaliação pontual de fluxos de gases de efeito estufa de solos anteriormente sob soja no Brasil, não se observou efeito da correção de acidez sobre os fluxos de metano (LAMMEL et al., 2018). Da mesma forma, em experimento de campo em Porto Rico, não foram observadas diferenças significativas entre os fluxos de metano de solos que passaram por calagem após serem acidificados (MOSIER; DELGADO; KELLER, 1998).

2.5 Metano e rizosfera

O Brasil possuía em 2017 mais de 150 mi de hectares de pastagens, sendo 33 mi de hectares na região amazônica (IBGE, 2017). Ao menos até 2006 a espécie de capim *Brachiaria brizantha* cv. Marandu (atual *Urochloa brizantha* cv. Marandu) era a principal variedade utilizada em pastagens no país (KARIA; DUARTE; ARAÚJO, 2006). Apesar desta ser uma espécie de gramínea tão amplamente utilizada, pouco se sabe sobre sua rizosfera. A rizosfera das plantas é um microambiente com condições diferenciadas do solo, em que o pH pode ser até 2 unidades mais ácido ou mais básico do que seu entorno, há diferenças na concentração de oxigênio e na umidade e é enriquecida em moléculas liberadas pela planta, como açúcares e ácidos orgânicos (PHILIPPOT et al., 2013). Estes fatores afetam a ciclagem do metano no solo, tanto por fornecer substrato orgânico para metanogênese, como por favorecer a oxidação de metano na rizosfera, que pode oxidar até 90% do metano produzido em solos alagados de arroz (FRENZEL; ROTHFUSS; CONRAD, 1992).

Trabalhos focados em compreender o efeito da rizosfera na comunidade microbiana associada à ciclagem do metano concentram-se principalmente em culturas de arroz, uma das maiores fontes antropogênicas de emissão de metano (PHILIPPOT et al., 2009). Em plantas de arroz o córtex nas porções mais antigas das raízes normalmente apresenta espaços porosos preenchidos por ar, que formam um caminho para difusão do oxigênio a partir das folhas até o sistema radicular. Parte deste oxigênio é utilizado na respiração celular dos tecidos, mas parte pode ser perdida e utilizada na rizosfera para oxidação de metano por bactérias metanotróficas (BONT; LEE; BOULDIN, 1978). Em solos alagados com plantação de arroz, metanotróficas de tipo II predominam no solo sem cobertura de plantas, metanotróficas de tipo I e II são encontradas na rizosfera, mas as de tipo I aparentam ser mais ativas (MA; CONRAD; LU, 2013). Nessa região há aumento da comunidade de metanotróficas portadoras de pMMO (HAN et al., 2016; MA; CONRAD; LU, 2013; WU; MA; LU, 2009), que utilizam da via RUMP para assimilação.

Quanto a como a rizosfera de plantas em solos de terra firme impacta a microbiota associada ao metano, há pouca pesquisa realizada (PRAEG; WAGNER; ILLMER, 2017). Resultados em região de clima temperado apontam que a cobertura vegetal sobre o solo, a composição de espécies, o tipo de solo e a temperatura são

fatores que influenciam a rizosfera no processo de ciclagem de metano (PRAEG; WAGNER; ILLMER, 2017). Em solos com gramíneas a presença de algumas espécies pode não alterar os fluxos de metano, enquanto outras podem reduzir o sequestro e em solos de floresta uma mesma espécie pode promover sequestro de metano sob uma temperatura e ser indiferente em outra (PRAEG; WAGNER; ILLMER, 2017). Apesar desta variação nos fluxos de metano, não foram detectadas no estudo alterações na abundância absoluta de bactérias metanotróficas, o que indica a importância de também avaliar a atividade dos microrganismos em estudos de rizosfera. Ainda neste estudo foi observado aumento da abundância relativa de arqueias metanogênicas na rizosfera de gramínea e forrageira em solos anteriormente sob gramínea. Em outro estudo com gramíneas, também em clima temperado, não foram observadas arqueias metanogênicas na rizosfera de gramínea, mas um predomínio de Crenarchaeota (NICOL; GLOVER; PROSSER, 2003). A pouca informação disponível sobre o tema mostra que a rizosfera de gramíneas é um ambiente complexo em suas interações com a ciclagem do metano, tanto funcionalmente quanto na dinâmica da microbiota.

2.6 Técnicas de estudo em biogeoquímica do metano

O desmatamento na região amazônica com fins de estabelecimento de pastagens e pecuária gera preocupações não somente do ponto de vista da perda de biodiversidade, mas também das consequências da mudança do uso do solo nas emissões de gases de efeito estufa e impactos nas mudanças climáticas globais. Mensurar as consequências desse processo de conversão sobre os fluxos de metano no solo, bem como buscar e mensurar estratégias de manejo que visem mitigação exige uso de abordagem interdisciplinar que considere as múltiplas dimensões da biogeoquímica ambiental. Para atender esta complexidade são necessárias técnicas que permitem caracterizar as características físicas e químicas do solo e atmosférica, quantificar alterações nos fluxos de CH₄ e na abundância de microrganismos chave ao processo, identificar estes microrganismos e avaliar sua atividade em situações de manejo diferenciadas.

Os fluxos de gás metano no solo podem ser avaliados diretamente *in situ* ou remotamente após coleta de amostras de gás. Utilizando ambos os métodos, é necessária a utilização de câmaras que restringem a difusão dos gases entre solo e

atmosfera em uma área determinada. Estas câmaras podem ser de materiais como PVC (Policloreto de Vinila), e devem ter seu volume conhecido, podem ser fechadas e controladas automaticamente ou manualmente. No momento das avaliações de fluxo, o local de inserção das câmaras no solo deve ser escolhido de forma a representar a área em estudo, excluindo materiais como excrementos em pastagens ou grandes raízes em florestas. Se as câmaras forem utilizadas para coleta de amostras de gás, devem ser definidos os intervalos de tempo entre as coletas de gás para posterior cálculo de fluxos (variação na concentração em determinado intervalo de tempo) (HUTCHINSON; LIVINGSTON, 1993). Se as medidas são feitas *in situ*, o tempo total de observação deve ser delimitado. Em ambas situações deve-se considerar o ponto de saturação da câmara com gases emitidos do solo como limite para definir os tempos máximos de avaliação, pois a partir daí a câmara passa a interferir no fluxo de gás do solo. Devem ser levados em conta na interpretação dos resultados perturbações físicas do manuseio da câmara, como variações na temperatura, pressão e concentração (HUTCHINSON; LIVINGSTON, 1993). A coleta das amostras de gás pode ser feita com o auxílio de seringas de polipropileno e a armazenagem do gás até o momento da leitura pode ser feita em frascos de vidro previamente evacuados (ROCHETTE; BERTRAND, 2007), fechados com tampa de borracha butílica. Neste caso, agulhas e torneiras de três vias plásticas podem ser utilizadas na inserção e retirada do gás dos frascos.

A concentração de metano nas amostras pode ser mensurada por cromatografia gasosa, que consiste num sistema com gás carreador inerte, coluna cromatográfica, detectores (*Flame Induced Detector* – FID, no caso do CH₄) e computador para processamento de dados. Para isto o sistema deve ser calibrado com gases padrão de forma que a faixa de concentração das amostras lidas seja contemplada. Além da cromatografia gasosa, há tecnologias para mensurar concentrações de metano baseadas em laser, que permitem medidas *in situ* em tempo real. Estas tecnologias têm potencial de substituir as baseadas em cromatografia gasosa (GC-FID) por sua versatilidade e acurácia (WILKINSON et al., 2018). Para seu uso em medidas de fluxo no solo a câmara fechada é acoplada ao equipamento por uma mangueira de entrada, que fará o gás ser aspirado e conduzido por uma cavidade com espelhos sob baixo vácuo (WILKINSON et al., 2018). Ali o gás será exposto a laser em frequência específica da absorção do CH₄, e após passar pela amostra o laser é lido num detector, e a informação armazenada em computador interno

(WILKINSON et al., 2018). O gás segue bombeado por uma mangueira de saída que é redirecionada à câmara, tudo em um circuito fechado. Com isso os fluxos do gás no solo são mensurados de forma não destrutiva e contínua, com menor intervenção do observador (WILKINSON et al., 2018). Este tipo de equipamento não necessita de calibração com gases especiais a cada uso, o que facilita sua portabilidade.

A abundância de microrganismos específicos no solo é um parâmetro relevante para o entendimento dos processos biogeoquímicos, já que os microrganismos participam de processos essenciais nos ciclos, como fixação de nitrogênio ou síntese de metano. Sua quantificação pode ser feita por métodos dependentes de cultivo, por contagem de colônias e estimativas de abundância, ou por métodos independentes de cultivo, como pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Esta técnica surgiu do aprimoramento da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) convencional, que consiste da reprodução *in vitro* do processo de replicação do DNA, utilizando de enzima *Taq* DNA polimerase II na replicação. A RT-qPCR permite uma quantificação precisa do número de cópias de determinado gene numa amostra de DNA, sem inserir viés dos métodos dependentes de cultivo. Sua principal limitação está na restrição dos oligonucleotídeos iniciadores, que idealmente devem ser capazes de amplificar toda a diversidade existente para o gene em estudo, mas que na prática é algo muito difícil de se atingir. A realização da técnica de RT-qPCR depende de equipamentos específicos de alta sensibilidade a sinais de fluorescência. Pode ser utilizada com sondas de oligonucleotídeos sequência-específicas que carregam uma molécula fluorescente repórter (R) na extremidade 5' e um *quencher* (Q) na extremidade 3'. Quando as duas moléculas estão acopladas ao oligonucleotídeo, há inibição da emissão de fluorescência por R; no momento da extensão pela polimerase, há remoção de Q e então emissão de fluorescência por R (SMITH; OSBORN, 2008). Como a emissão de fluorescência se dá no momento da replicação da fita de DNA, o sinal é proporcional ao número de moléculas na amostra e então o método permite quantificação. É possível a utilização de moléculas fluorescentes intercalantes de DNA como SYBR® Green, que emitem fluorescência quando em contato com dupla fita de DNA. Como a cada ciclo da PCR novas duplas fita são geradas, o sinal aumenta linearmente em relação à concentração de DNA (SMITH; OSBORN, 2008). Ambos os métodos são utilizados em ecologia molecular, sendo o último dependente de intercalantes mais comum pelo menor custo. As duas formas exigem um conjunto de oligonucleotídeos para a região do DNA de interesse

e também uma curva de calibração para quantificação absoluta. Esta é feita a partir de amostra de DNA puro, como de um isolado ou de sequência sintetizada artificialmente, sobre a qual se conheça a concentração inicial e tamanho do fragmento em estudo, de forma que o número de cópias gênicas possa ser estimado. Esta amostra passa por diluição seriada, gerando uma curva de ciclo de detecção x número de cópias gênicas e partindo desta referência o número de cópias nas amostras desconhecidas é determinado.

A atividade de grupos específicos de microrganismos no ambiente é um parâmetro importante no entendimento da biogeoquímica ambiental, que não está diretamente correlacionada ao DNA presente (CARINI et al., 2016), mas pode ser acessada pela técnica de SIP (Sondas de Isótopos Estáveis). Esta técnica utiliza informação de biomoléculas que tiveram sua composição isotópica alterada após os microrganismos que as originaram incorporarem um substrato enriquecido em isótopos estáveis pesados. Apesar do uso de isótopos estáveis em estudos de biologia molecular ocorrer há décadas, com exemplos como o da descoberta de Meselson e Stahl da replicação semi-conservativa do DNA (MESELSON; STAHL, 1958), seu uso em ecologia microbiana é mais recente (BOSCHKER et al., 1998; HINRICHS et al., 1999; RADAJEWSKI et al., 2000). A realização desta técnica requer uma incubação de amostra com substrato enriquecido no isótopo pesado escolhido e seu controle, com composição natural (^{13}C , ^{15}N e ^{18}O são os mais comuns). Em princípio qualquer substrato pode ser utilizado, com exemplos como celulose (LÓPEZ-MONDÉJAR et al., 2018), hidrocarbonetos aromáticos (RODGERS-VIEIRA et al., 2015), metano (CAI et al., 2016) ou resíduos de esgoto (SAIA et al., 2019). Este último constituiu a primeira pesquisa publicada em periódico científico internacional utilizando a técnica e conduzido por brasileiros. Também foi realizada pesquisa no país focando estudo da comunidade rizosférica de cana-de-açúcar ativa na incorporação de carbono exsudado pela planta após exposta a $^{13}\text{CO}_2$ (da COSTA 2012). Além deste, dois estudos focaram o sequestro de $^{13}\text{CH}_4$ por microrganismos em amostras ambientais, um com amostras de manguezal (LINHARES, 2011) e outra com amostras de solos de floresta amazônica, pastagens em cronosequência e floresta secundária (TESSARO, 2012). Após incubação e confirmação de incorporação do substrato, as biomoléculas de interesse (DNA, RNA, proteínas ou lipídeos) são extraídas da amostra complexa. Essa extração contém tanto as biomoléculas provenientes dos microrganismos que incorporaram o substrato (isótopos pesados),

como os que já estão no ambiente (isótopos leves). A separação dos dois grupos de moléculas se dá por ultracentrifugação e explora as diferenças de densidade de flutuação (*buoyant density*) existentes entre elas, que levarão as moléculas mais densas para a base do recipiente. Após a separação o conteúdo é fracionado e então as frações analisadas separadamente (NEUFELD et al., 2007). As biomoléculas enriquecidas em isótopos pesados podem seguir processadas por qualquer técnica de interesse, como por exemplo sequenciamento de alto rendimento/ massivo de DNA.

O sequenciamento de alto rendimento de DNA é uma tecnologia recente, de pouco mais de uma década, também chamada de Sequenciamento de Nova Geração (NGS). Por permitir em uma única análise o sequenciamento de milhões de sequências curtas de DNA em um espaço de tempo de horas a dias, tornou acessível o sequenciamento de genomas de procariotos e eucariotos a laboratórios de pesquisa médios e pequenos. Com os novos avanços na área, o tamanho e número de sequências geradas tem aumentada, e o custo reduzido. O sequenciamento do primeiro genoma humano em 2001 custou US\$3 bi e atualmente a mesma informação gerada pode ser obtida por US\$1.000,00 (HAYDEN, 2014). Aplicada em microbiologia ambiental, essa tecnologia permite discriminar o perfil taxonômico de uma comunidade microbiana em uma amostra complexa (ROESCH et al., 2007) ou mesmo acessar toda a diversidade genética ali presente (VENTER et al., 2004), chamada metagenômica. O perfil taxonômico dos microrganismos pode ser conhecido pelo sequenciamento massivo de fragmentos de DNA amplificados previamente por PCR de genes conservados filogeneticamente como o 16S *rRNA* (WOESE; FOX, 1977). No entanto, a diversidade de qualquer gene numa amostra ambiental pode ser acessada por esta técnica, respeitados os requisitos de qualidade, como o tamanho das sequências alvo, qualidade dos oligonucleotídeos iniciadores (como tamanho, temperatura de separação das fitas e complementaridade entre os iniciadores), e restrições sobre sequências repetitivas. Para realização da técnica é necessária a extração prévia do DNA nas amostras e critérios de qualidade e quantidade que dependem da plataforma e procedimento de preparo de biblioteca escolhidos. Para sequenciamento de sequências amplificadas em plataforma MiSeq® Illumina, por exemplo, a pureza mínima medida em espectrofotômetro deve estar entre 1,8 e 2,0 (razão 260nm/280nm) e as concentrações mínimas variam na ordem de 1 a 50 ng/μL, dependendo de qual procedimento de preparo de biblioteca, com não mais

que 20 µL por amostra necessários. O preparo de biblioteca gênica é necessário para incorporar através de PCRs às sequências de DNA de cada amostra sequências adaptadoras e sequências identificadoras da amostra. Os adaptadores permitem à sequência ser ancorada à *flow cell*, permitindo sua posição fixa para posterior detecção da fluorescência emitida na incorporação de cada nucleotídeo nos ciclos que seguem. Ao fim as sequências são separadas por amostra utilizando a informação das sequências de identificação (*demultiplex*) e são processadas para remoção dos adaptadores utilizando ferramentas computacionais. Sua qualidade é avaliada, e podem seguir para identificação taxonômica ou sendo agrupadas em OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais), ou trabalhadas como ASVs (Variantes de Sequências Amplificadas; tradução livre) (CALLAHAN; MCMURDIE; HOLMES, 2017). Esta última permite utilizar as sequências individualmente nos procedimentos seguintes, sem assumir um parâmetro fixo de agrupamento (clusterização) (como 97% de similaridade, comum para OTUs), garantindo uma resolução mais próxima da realidade na comunidade microbiana. A identificação taxonômica que se segue pode ser feita por métodos de clusterização que comparam cada sequência a um banco de dados especializado e atribuem a estas uma identificação junto a um índice de confiança.

Referências

ALVARES, C. A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, p. 711-728, 2013.

ANGEL, R.; CLAUS, P.; CONRAD, R. Methanogenic archaea are globally ubiquitous in aerated soils and become active under wet anoxic conditions. **The ISME Journal**, v. 6, n. 4, p. 847–862, 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ismej2011141>>. Acesso em: 2 nov. 2019.

BAANI, M.; LIESACK, W. Two isozymes of particulate methane monooxygenase with different methane oxidation kinetics are found in *Methylocystis* sp. strain SC2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 105, n. 29, p. 10203–10208, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2481331/>>. Acesso em: 30 out. 2016.

BARTON, L.; MURPHY, D. V.; BUTTERBACH-BAHL, K. Influence of crop rotation and liming on greenhouse gas emissions from a semi-arid soil. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 167, p. 23–32, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167880913000066>>. Acesso em: 9 maio 2017.

BIŽIĆ, M. et al. Aquatic and terrestrial cyanobacteria produce methane. **Science Advances**, v. 6, n. 3, p. eaax5343, 2020. Disponível em: <<http://advances.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/sciadv.aax5343>>. Acesso em: 23 jan. 2020.

BONT, J. A. M. DE; LEE, K. K.; BOULDIN, D. F. *Bacterial Oxidation of Methane in a Rice Paddy*. **Ecological Bulletins**, v. 26, p. 91-96, 1978. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/20112667>>. Acesso em: 24 jan. 2020.

BORKEN, W.; BRUMME, R. Liming practice in temperate forest ecosystems and the effects on CO₂, N₂O and CH₄ fluxes. **Soil Use and Management**, v. 13, p. 251–257, 1997. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1475-2743.1997.tb00596.x>>.

BOSCHKER, H. T. S. et al. Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by ¹³C-labelling of biomarkers. **Nature**, v. 392, n. 6678, p. 801–804, 1998.

BUSTAMANTE, M. M. C. et al. Estimating greenhouse gas emissions from cattle raising in Brazil. **Climatic Change**, v. 115, n. 3–4, p. 559–577, 2012.

BUTTERBACH-BAHL, K.; PAPEN, H. Four years continuous record of CH₄ exchange between the atmosphere and untreated and limed soil of a N-saturated spruce and beech forest ecosystem in Germany. **Plant and Soil**, v. 240, n. 1, p. 77–90, 2002. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/A:1015856617553>>. Acesso em: 7 maio 2020.

CAI, Y. et al. Conventional methanotrophs are responsible for atmospheric methane oxidation in paddy soils. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2016.

CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. **The ISME Journal**, v. 11, n. 12, p. 2639–2643, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/ismej.2017.119>>. Acesso em: 21 nov. 2017.

CARINI, P. et al. Relic DNA is abundant in soil and obscures estimates of soil microbial diversity. **Nature Microbiology**, v. 2, p. 16242, 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nmicrobiol2016242>>. Acesso em: 19 mar. 2020.

COLE, J. R. et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. D633–D642, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3965039/>>.

CONRAD, R. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. **Environmental Microbiology Reports**, v. 1, n. 5, p. 285–292, 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1758-2229.2009.00038.x/abstract>>. Acesso em: 12 out. 2016.

DA COSTA, D. P. **Descrição da comunidade microbiana associada à rizosfera de cana-de-açúcar**. 2012.103 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

DE ANDRADE, C. M. S. **Calagem em pastagens cultivadas na Amazônia**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2010, 29 p. (Documentos, 118). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/acre/busca-de-publicacoes/-/publicacao/878829/calagem-em-pastagens-cultivadas-na-amazonia>>. Acesso em: 13 maio 2020.

DE CARVALHO, T. S. et al. Land use intensification in the humid tropics increased both alpha and beta diversity of soil bacteria. **Ecology**, v. 97, n. 10, p. 2760–2771, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ecy.1513>>. Acesso em: 15 fev. 2020.

DE MORAES, J. F. L. et al. Soil properties under Amazon forest and changes due to pasture installation in Rondônia, Brazil. **Geoderma**, v. 70, n. 1, p. 63–81, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016706195000720>>. Acesso em: 12 out. 2016.

DIAS-FILHO, M. B. **Degradação de pastagens**: o que é e como evitar. Brasília, DF: Embrapa Amazônia Oriental, 2017, 19 p. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1070416/1/TC1117CartilhaPastagemV04.pdf>>. Acesso em: 21 jan. 2020.

FEARNSIDE, P. M.; BARBOSA, R. I. Soil carbon changes from conversion of forest to pasture in Brazilian Amazonia. **Forest Ecology and Management**, v. 108, n. 1–2, p. 147–166, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378112798002229>>. Acesso em: 1 nov. 2015.

FERNANDES, S. A. P. et al. Seasonal variation of soil chemical properties and CO₂ and CH₄ fluxes in unfertilized and P-fertilized pastures in an Ultisol of the Brazilian Amazon. **Geoderma**, v. 107, n. 3–4, p. 227–241, 2002.

FIERER, N.; JACKSON, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 103, n. 3, p. 626–631, 2006. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/103/3/626>>. Acesso em: 14 jun. 2016.

FRENZEL, P.; ROTHFUSS, F.; CONRAD, R. Oxygen profiles and methane turnover in a flooded rice microcosm. **Biology and Fertility of Soils**, v. 14, n. 2, p. 84–89, 1992.

GARCÍA-MARCO, S. et al. No tillage and liming reduce greenhouse gas emissions from poorly drained agricultural soils in Mediterranean regions. **Science of the Total Environment**, v. 566, p. 512–520, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969716310476>>. Acesso em: 5 maio 2017.

GARCIA, J. L.; PATEL, B. K. C.; OLLIVIER, B. Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. **Anaerobe**, v.6, n. 4, p. 205–26, 2000.

GOREAU, T. J.; DE MELLO, W. Z. Tropical deforestation: Some effects on atmospheric chemistry. **Ambio**, v. 17, n. 4, p. 275–281, 1988. Disponível em: <<https://www.osti.gov/etdeweb/biblio/6655174>>. Acesso em: 5 maio 2018.

HAN, X. et al. Mitigating methane emission from paddy soil with rice-straw biochar amendment under projected climate change. **Scientific Reports**, v. 6, p. 24731, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27090814>>.

HANSON, R. S.; HANSON, T. E. Methanotrophic bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 439–471, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC239451/>>. Acesso em: 27 abr. 2016.

HAYDEN, E. C. The \$ 1,000 genome. **Nature**, v. 507, p. 294-295, 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/507294a>>. Acesso em: 18 maio 2020.

HENCKEL, T.; ROSLEV, P.; CONRAD, R. Effects of O₂ and CH₄ on presence and activity of the indigenous methanotrophic community in rice field soil. **Environmental Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 666–679, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11214799>>.

HILGER, H.; HUMER, M. Biotic landfill cover treatments for mitigating methane emissions. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 84, p. 71-84, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1023/A:1022878830252>>. Acesso em: 10 maio 2020.

HINRICHS, K. U. et al. Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. **Nature**, v. 398, n. 6730, p. 802–805, 1999.

HUTCHINSON, G. L.; LIVINGSTON, G. P. Use of chamber systems to measure trace gas fluxes. In: HARPER, L. A.; MOSIER, A. R.; DUXBURY, J. M.; ROLSTON, D. E. (Ed.). **Agricultural ecosystem effects on trace gases and global climate change**. Madison: ASA; CSSA; SSSA, 1994. chap. 4, p. 63–78. (Special Publication, 55). Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.2134/asaspecpub55.c4>>. Acesso em: 14 maio 2020.

HÜTSCH, B. W.; WEBSTER, C. P.; POWLSON, D. S. Methane oxidation in soil as affected by land use, soil pH and N fertilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n. 12, p. 1613–1622, 1994. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0038071794903131>>. Acesso em: 10 maio 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Censo Agropecuário de 2017**. Rio de Janeiro, RJ: IBGE, 2017. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3096/agro_2017_resultados_definitivos.pdf>. Acesso em: 19 abril 2020.

IPCC. **Climate change 2013: the physical science basis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2013.

JESUS, E. DA C. et al. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **The ISME Journal**, v. 3, n. 9, p. 1004–1011, 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/ismej/journal/v3/n9/abs/ismej200947a.html>>. Acesso em: 12 out. 2016.

KALLISTOVA, A. Y. et al. Methane formation and oxidation by prokaryotes. **Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 671–691, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1134/S0026261717060091>>.

KARIA, C. T.; DUARTE, J. B.; ARAÚJO, A. C. G. **Desenvolvimento de cultivares do gênero *Brachiaria* (trin.) Griseb. no Brasil**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. 58 p. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/570263/1/doc163.pdf>>.

KELLER, M. et al. Soil–atmosphere exchange of nitrous oxide, nitric oxide, methane, and carbon dioxide in logged and undisturbed forest in the Tapajos National Forest, Brazil. **Earth Interactions**, v. 9, n. 23, p. 1–28, 2005. Disponível em: <<http://journals.ametsoc.org/doi/10.1175/EI125.1>>. Acesso em: 11 maio 2020.

KELLER, M.; KAPLAN, W. A.; WOFSY, S. C. Emissions of N₂O, CH₄ and CO₂ from tropical forest soils, **Journal of Geophysical Research**, v. 91, n. D11, p. 11791, 1986.

KEPPLER, F. et al. Methane emissions from terrestrial plants under aerobic conditions. **Nature**, v. 439, n. 7073, p. 187–191, 2006.

KNIEF, C. Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic Bacteria evaluated based on *pmoA* as molecular marker. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1346, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4678205/>>. Acesso em: 3 out. 2016.

KNIEF, C.; LIPSKI, A.; DUNFIELD, P. F. Diversity and activity of methanotrophic Bacteria in different upland soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6703–6714, 2003.

KROEGER, M. E. et al. Rainforest-to-pasture conversion stimulates soil methanogenesis across the Brazilian Amazon. **bioRxiv**, 2020. doi: 10.1101/2020.03.08.982587.

KUNHIKRISHNAN, A. et al. Functional relationships of soil acidification, liming, and greenhouse gas flux. **Advances in Agronomy**, v. 139, p. 1–71, 2016.

KUSSMAUL, M.; WILIMZIG, M.; BOCK, E. Methanotrophs and methanogens in masonry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 4530–4532, 1998.

LAMMEL, D. R. et al. Direct and indirect effects of a pH gradient bring insights into the mechanisms driving prokaryotic community structures. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 106, 2018.

LAMMEL, D. R. et al. Specific microbial gene abundances and soil parameters contribute to C, N, and greenhouse gas process rates after land use change in Southern Amazonian Soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1057, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26500618>>. Acesso em: 25 set. 2017.

LE MER, J.; ROGER, P. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review. **European Journal of Soil Biology**, v. 37, n. 1, p. 25–50, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1164556301010676>>. Acesso em: 25 maio 2016.

LIMA, A. B.; MUNIZ, A. W.; DUMONT, M. G. Activity and abundance of methane-oxidizing bacteria in secondary forest and manioc plantations of Amazonian Dark Earth and their adjacent soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 550, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4205850/>>. Acesso em: 10 set. 2016.

LINHARES, D. do C. **Estudo da comunidade metanotrófica em amostras do manguezal de Bertioga, Estado de São Paulo, através da técnica de marcação de ácidos nucleicos com isótopos estáveis (SIP-DNA)**. 2011. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

LIU, C. et al. Winter-grazing reduces methane uptake by soils of a typical semi-arid steppe in Inner Mongolia, China. **Atmospheric Environment**, v. 41, n. 28, p. 5948–5958, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1352231007002610>>. Acesso em: 12 out. 2016.

LÓPEZ-MONDÉJAR, R. et al. Decomposer food web in a deciduous forest shows high share of generalist microorganisms and importance of microbial biomass recycling. **ISME Journal**, v. 12, n. 7, p. 1768–1778, 2018.

MA, K.; CONRAD, R.; LU, Y. Dry/Wet cycles change the activity and population dynamics of methanotrophs in rice field soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 16, p. 4932–4939, 2013. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/79/16/4932>>. Acesso em: 12 out. 2016.

MALAVOLTA, E. Corretivos cálcicos, magnesianos e calco-magnesianos. In: MALAVOLTA, E. (Ed.). **Manual de química agrícola: adubos e adubação**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1981. cap. 5, p. 232-245.

MARGULIS, S. **Causes of deforestation of the Brazilian Amazon**. Washington, DC: The World Bank, 2003. (World Bank Working Papers). Disponível em: <<http://elibrary.worldbank.org/doi/book/10.1596/0-8213-5691-7>>. Acesso em: 15 fev. 2020.

MENDES, L. W. et al. Soil-Borne microbiome: linking diversity to function. **Microbial Ecology**, v. 70, n. 1, p. 255–265, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00248-014-0559-2>>. Acesso em: 12 out. 2016.

MESELSON, M.; STAHL, F. W. The replication of DNA in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 44, n. 7, p. 671–682, 1958.

MEYER, K. M. et al. Belowground changes to community structure alter methane-cycling dynamics in Amazonia. **bioRxiv**, 2020. doi: 10.1101/2020.03.10.984807v1. Acesso em: 10 maio 2020.

MEYER, K. M. et al. Conversion of Amazon rainforest to agriculture alters community traits of methane-cycling organisms. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 6, p. 1547–1556, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/mec.14011>>. Acesso em: 21 mar. 2017.

MORTON, D. C. et al. Cropland expansion changes deforestation dynamics in the southern Brazilian Amazon. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 103, n. 39, p. 14637–14641, 2006.

MOSIER, A. R.; DELGADO, J. A.; KELLER, M. Methane and nitrous oxide fluxes in an acid Oxisol in western Puerto Rico: effects of tillage, liming and fertilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 14, p. 2087–2098, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071798000856>>. Acesso em: 17 jul. 2016.

MULLER, M. M. L. et al. Degradação de pastagens na região amazônica: propriedades físicas do solo e crescimento de raízes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 11, p. 1409–1418, 2001.

NAKAMURA, F. M. **Microcosms and the role of active microbiota on methane cycle in soils under Forest and Pasture of Eastern Amazon**. 2019. 117 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

NAVARRETE, A. A. et al. Differential response of Acidobacteria subgroups to Forest-to-Pasture conversion and their biogeographic patterns in the Western Brazilian Amazon. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1443, 2015. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.01443/full>>. Acesso em: 30 jun. 2016.

NAZARIES, L. et al. Methane, microbes and models: Fundamental understanding of the soil methane cycle for future predictions. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 9, p. 2395–2417, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/1462-2920.12149>>. Acesso em: 19 fev. 2020.

NEUFELD, J. D. et al. DNA stable-isotope probing. **Nature Protocols**, v. 2, n. 4, p. 860–866, 2007.

NICOL, G. W.; GLOVER, L. A.; PROSSER, J. I. The impact of grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 152–162, 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1462-2920.2003.00399.x>>. Acesso em: 13 maio 2020.

PARK, D.; LEE, J. Biological conversion of methane to methanol. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 5, p. 977–987, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s11814-013-0060-5>>. Acesso em: 26 ago. 2016.

PAULA, F. S. et al. Land use change alters functional gene diversity, composition and abundance in Amazon forest soil microbial communities. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 12, p. 2988–2999, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/mec.12786>>.

PHILIPPOT, L. et al. Biochemical cycling in the rhizosphere having an impact on global change. **Plant and Soil**, v. 321, p. 61-81, 2009. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-008-9796-9>>. Acesso em: 19 fev. 2020.

PHILIPPOT, L. et al. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 789–799, 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v11/n11/abs/nrmicro3109.html>>. Acesso em: 13 fev. 2015.

PRAEG, N.; WAGNER, A. O.; ILLMER, P. Plant species, temperature, and bedrock affect net methane flux out of grassland and forest soils. **Plant and Soil**, v. 410, n. 1–2, p. 193–206, 2017.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. D590–D596, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3531112/>>.

RADAJEWSKI, S. et al. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. **Nature**, v. 403, n. 6770, p. 646–649, 2000.

ROCHETTE, P.; BERTRAND, N. Soil-surface gas emissions. In: CARTER, M. R.; GREGORICH, E. G. (Org.). **Soil sampling and methods of analysis**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 853.

RODGERS-VIEIRA, E. A. et al. Identification of anthraquinone-degrading bacteria in soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 11, p. 3775–3781, 2015.

RODRIGUES, J. L. M. et al. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 110, n. 3, p. 988–993, 2013. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/110/3/988>>. Acesso em: 2 nov. 2015.

ROESCH, L. F. W. et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME Journal**, v. 1, n. 4, p. 283–290, 2007.

SAARI, A.; RINNAN, R.; MARTIKAINEN, P. J. Methane oxidation in boreal forest soils: kinetics and sensitivity to pH and ammonium. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 7, p. 1037–1046, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071704000781>>. Acesso em: 12 out. 2016.

SAIA, F. T. et al. Sulfide-driven denitrification: detecting active microorganisms in fed-batch enrichment cultures by DNA stable isotope probing. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 5, p. 5309–5321, 2019.

SEMRAU, J. D.; DISPIRITO, A. A.; YOON, S. Methanotrophs and copper. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 4, p. 496–531, 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6976.2010.00212.x/abstract>>. Acesso em: 16 ago. 2016.

SERRANO-SILVA, N. et al. Methanogenesis and methanotrophy in soil: a review. **Pedosphere**, v. 24, n. 3, p. 291–307, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1002016014600163>>. Acesso em: 19 jul. 2016.

SMITH, C. J.; OSBORN, A. M. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 67, n. 1, p. 6–20, 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsec/article-abstract/67/1/6/518537>>. Acesso em: 14 maio 2020.

STEINKAMP, R.; BUTTERBACH-BAHL, K.; PAPEN, H. Methane oxidation by soils of an N limited and N fertilized spruce forest in the Black Forest, Germany. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 145–153, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071700001243>>. Acesso em: 26 ago. 2016.

STEUDLER, P. A. et al. Consequence of forest-to-pasture conversion on CH₄ fluxes in the Brazilian Amazon Basin. **Journal of Geophysical Research: Atmospheres**, v. 101, n. D13, p. 18547–18554, 1996. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1029/96JD01551>>. Acesso em: 25 set. 2017.

STIEHL-BRAUN, P. A. et al. Effects of N fertilizers and liming on the micro-scale distribution of soil methane assimilation in the long-term Park Grass experiment at Rothamsted. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1034–1041, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071711000344>>. Acesso em: 18 jul. 2016.

TATE, K. R. Soil methane oxidation and land-use change – from process to mitigation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 80, p. 260–272, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071714003575>>. Acesso em: 12 maio 2016.

TESSARO, S. **Estudo da comunidade de bactérias metanotróficas em uma cronossequência de solos da Amazônia**. 2012. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

TVEIT, A. T. et al. Widespread soil bacterium that oxidizes atmospheric methane. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 116, n. 17, p. 8515–8524, 2019.

VENTER, J. C. et al. Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. **Science**, v. 304, n. 5667, p. 66–74, 2 abr. 2004.

VENTURINI, A. M. **Forest-to-pasture conversion in the Eastern Amazon: impacts on the soil methane microbial communities**. 2019. 103 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

VERCHOT, L. V. et al. Land-use change and biogeochemical controls of methane fluxes in soils of eastern Amazonia. **Ecosystems**, v. 3, n. 1, p. 41–56, 2000.

WHITTENBURY, R.; DAVIES, S. L.; DAVEY, J. F. Exospores and cysts formed by methane-utilizing Bacteria. **Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 219–226, 1970. Disponível em: <<http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-61-2-219>>. Acesso em: 12 out. 2016.

WILKINSON, J. et al. Measuring CO₂ and CH₄ with a portable gas analyzer: closed-loop operation, optimization and assessment. **PLoS One**, v. 13, n. 4, p. e019397, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193973>>. Acesso em: 14 maio 2020.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 74, n. 11, p. 5088–5090, 1977. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/74/11/5088>>. Acesso em: 19 nov. 2014.

WU, L.; MA, K.; LU, Y. Rice roots select for type I methanotrophs in rice field soil. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, n. 6, p. 421–428, 2009.

3. RIZOSFERA DE BRAQUIÁRIA REDUZ ABUNDÂNCIA DE ARQUÉIAS METANOGÊNICAS E CONTRIBUI COM O SEQUESTRO DE METANO EM SOLOS DE PASTAGEM NA AMAZÔNIA

Resumo

O estabelecimento de pastagens para pecuária extensiva é a principal razão para o desmatamento na região amazônica. Esta mudança na cobertura vegetal do solo, de floresta para pastagem, altera a ciclagem do gás metano no solo, levando solos que sob floresta sequestravam metano da atmosfera a se tornarem emissores sob gramíneas, num balanço anual de fluxos do gás. O potencial do manejo de pastagens sobre os fluxos de metano no solo permanece desconhecido. Neste trabalho avaliou-se como o manejo dado a estas pastagens pode afetar este processo, considerando a microbiota da rizosfera de *U. brizantha* cv. Marandu e a correção da acidez do solo por calagem. Em experimentos com vasos em casa de vegetação, sob umidade controlada, solos com e sem cobertura de pastagem e com e sem correção de acidez tiveram seus fluxos de metano avaliados por espectroscopia a laser em tempo real. Além disto, a microbiota associada ao processo no solo foi avaliada por quantificação de cópias de genes marcadores de oxidação (*pmoA* e *mmoX*) e produção de metano (*mcrA*) e sequenciamento de alto rendimento de porção do gene *16S rRNA*, para identificação destes microrganismos. Além dos experimentos com solos do leste e oeste amazônico, estudo de campo foi realizado. Observou-se que a presença de gramínea aumenta o sequestro de metano nestes solos em até 35%. Também, que a calagem de pastagens pode reduzir o sequestro de metano no solo sob concentrações atmosféricas do gás. Além disto, a comunidade produtora de metano na rizosfera destas gramíneas é reduzida em até 10x, sendo composta por arqueias metanogênicas dos gêneros *Methanosarcina* sp., *Methanocella* sp., *Methanobacterium* sp. e Rice Cluster I. Demonstrou-se que o aumento do pH de solos de floresta, similar ao observado na mudança floresta-pastagem após processo de queima e incorporação de cinzas ao solo, é capaz de reduzir o sequestro de metano nestes solos, podendo torná-los emissores em um curto período de tempo. No entanto, a correção de acidez por calagem nestes solos não elevou a abundância de arqueias metanogênicas. Estes resultados demonstram a importância do manejo em pastagens, conservando cobertura de gramínea, como forma de mitigar impactos desta prática sobre emissão de metano pelo solo.

Palavras-chave: mudanças climáticas, agricultura tropical, ecologia microbiana, UGGA, qiime2, conservação do solo

GRASS RHIZOSPHERE REDUCES METHANOGENIC ARCHAEA AND CONTRIBUTES TO METHANE SINK IN AMAZON PASTURE SOILS

Abstract

Cattle ranching is the largest driver of deforestation in the Amazon region. The conversion of forest into pasture affects the methane cycling in soil, changing it from sink to source of atmospheric methane, in a year-based fluxes balance. It remains unknown if management practices could reduce the impact of land-use in CH₄ cycling. In this work, we evaluate how management of pasture can affect this process, at the rhizosphere of *Urochloa brizantha* cv. Marandu and with liming to decrease the soil acidity. In greenhouse moisture-controlled experiments, we evaluated the methane fluxes in soils from forest and pasture, with and without grass coverage, and with and without acidity correction. In addition, we assessed the microbial community structure through high throughput sequencing of the 16S *rRNA* gene, and the methane cycling microbiota by the quantification of marker genes related to methane oxidation (*pmoA* and *mmoX*) and production (*mcrA*). Two experiments with soils from eastern and western Amazon were performed, and a field study was carried out. In general, we observed a sink of methane in pasture soils, with grass coverage increasing methane oxidation by up to 35%. Interestingly, the methane-producing community in the rhizosphere of this grass is reduced by up to 10-fold and is composed of methanogenic archaea from the genera *Methanosarcina* sp., *Methanocella* sp., *Methanobacterium* sp., and Rice Cluster I. Further, we demonstrated that the methane sink capacity of forest soils is reduced by liming, even turning them to methane sources. In these soils, we have not noticed an increase in the methanogens. These results demonstrate the potential of pasture management, keeping grass coverage on soil, as a way to reduce the impacts of soil methane emissions, and also the possible consequences of liming these soils on methane fluxes.

Keyword: climate change, tropical agriculture, microbial ecology, UGGA, qiime2, soil conservation

3.1 Introdução

O desmatamento na região amazônica tem como principal finalidade o estabelecimento de pastagens para pecuária extensiva (MARGULIS, 2003; MORTON et al., 2006). Em 2017 o Brasil possuía mais de 150 mi de hectares de pastagens, sendo pelo menos 33 mi de hectares na região amazônica (IBGE, 2017). Ao menos até 2006 a espécie de capim *Brachiaria brizantha* cv. Marandu (atual *Urochloa brizantha*) era a mais plantada em pastagens no país (KARIA; DUARTE; ARAÚJO, 2006). Dentre os GEE (Gases de Efeito Estufa) emitidos pela atividade pecuária, a emissão de metano (CH_4) pelo solo é um dos fatores que necessita melhor investigação, por ser sensível a alterações no manejo do solo e assim um alvo para remediação de emissões de GEE. Os impactos desta conversão do uso do solo são perceptíveis observando-se os fluxos do gás, em que pastagens na Amazônia ocidental podem gerar emissões de $270 \text{ mg C-CH}_4/\text{m}^2$, enquanto solos de floresta podem sequestrar até $470 \text{ mg C-CH}_4/\text{m}^2$ (STEUDLER et al., 1996).

O gás CH_4 é 86 vezes mais potente que o CO_2 em reter calor na atmosfera, num horizonte de 20 anos (IPCC, 2013), e suas emissões estão conectadas principalmente a atividades humanas como pecuária, agricultura irrigada e decomposição em aterros (IPCC, 2013). A ciclagem do metano no solo é um sistema intimamente relacionado à microbiota deste ambiente. A principal fonte biogênica deste gás são arqueias metanogênicas, e pode ser oxidado por bactérias metanotróficas. O balanço entre bactérias metanotróficas e arqueias metanogênicas é relacionado às condições ambientais (umidade, temperatura e pH) e sensível a alterações de manejo agrícola (LE MER; ROGER, 2001; LIU et al., 2007; TIAN et al., 2015).

Bactérias metanotróficas no solo são gram-negativas, sendo classificadas entre gama-proteobactérias e alfa-proteobactérias no filo Proteobactéria, ou em Verrucomicrobia e candidatos no filo candidato NC10 (HANSON; HANSON, 1996; KNIEF, 2015). A etapa inicial da incorporação do metano se dá por sua conversão a metanol, que é mediada pela enzima metano mono-oxigenase (MMO). Esta enzima existente em formas particulada, ancorada à membrana celular (pMMO), e solúvel no citoplasma (sMMO) e é codificada por *operons* conservados, estudados respectivamente pelos genes marcadores *pmoA* e *mmoX* (HANSON; HANSON, 1996; KNIEF, 2015). As arqueias metanogênicas são classificadas em seis ordens no filo

Euryarcheota: *Methanomicrobiales*, *Methanocellales*, *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales*, *Methanococcales* e *Methanopyrales* (ANGEL; CLAUS; CONRAD, 2012a), com candidatos no filo Bathyarchaeota (KALLISTOVA et al., 2017). A metanogênese das arqueias é o último processo em uma sequência de passos que se inicia com a hidrólise de polímeros, fermentação e termina com produção de CH₄, através da ação da enzima metil coenzima M redutase, que tem o gene *mcrA* como marcador para estudos (SERRANO-SILVA et al., 2014). Recentemente foi demonstrada a capacidade de produção de metano por cianobactérias e plantas, no entanto acredita-se que este é um subproduto formado nas reações em cadeia do processo fotossintético (BIŽIĆ et al., 2020; KEPPLER et al., 2006).

As relações entre mudanças no uso do solo e transformações da comunidade microbiana não são bem compreendidas (NAZARIES et al., 2013; TATE, 2015), mas impactam significativamente a diversidade microbiana na região amazônica (DE CARVALHO et al., 2016; JESUS et al., 2009; MENDES et al., 2015; NAVARRETE et al., 2015; NAVARRETE et al., 2011; RODRIGUES et al., 2013), influenciando a estrutura da comunidade microbiana associada ao ciclo do metano, principalmente na composição das metanotróficas, mas também em aumento de arqueias metanogênicas, considerando o marcador molecular *mcrA* (MEYER et al., 2017).

Manejar uma área de pastagem pode influenciar a dinâmica do carbono no solo, de forma que áreas bem manejadas podem estocar carbono através do sistema radicular das gramíneas, levando o carbono a áreas no solo mais profundas e de menor decomposição (FEARNSIDE; BARBOSA, 1998). Áreas mal manejadas, por outro lado, podem facilitar a liberação de carbono, com pouco desenvolvimento das gramíneas e raízes mais superficiais. O manejo adequado de uma área de pastagem pode envolver diversas práticas, como a correção de acidez do solo e a manutenção contínua de cobertura de gramínea para proteção contra erosão. Estas práticas são importantes dada a alta acidez comum em solos amazônicos e a alta pluviosidade e elevadas temperaturas, fatores associados à erosão.

O efeito da correção de acidez do solo sobre os fluxos de metano ainda é pouco compreendido, com estudos em campo em locais distintos do globo demonstrando resultados contrastantes, dada a complexidade do ciclo do metano, envolvendo química, física e biologia do solo (KUNHIKRISHNAN et al., 2016). Em florestas temperadas, a calagem do solo pode levar a aumento ou redução do consumo de metano (BORKEN; BRUMME, 1997; BUTTERBACH-BAHL; ROTHE; PAPEN, 2002).

Em áreas agrícolas com trigo sob condições similares a calagem levou a aumento de consumo de metano pelo solo (HÜTSCH; WEBSTER; POWLSON, 1994). O aumento do consumo após calagem foi observado em solos de semiárido sob trigo-tremoceiro e de tritcale no mediterrâneo (BARTON; MURPHY; BUTTERBACH-BAHL, 2013; GARCÍA-MARCO et al., 2016). Quanto aos solos tropicais, pouco se sabe sobre o tema. Em avaliação pontual de fluxos de gases de efeito estufa de solos anteriormente sob soja no Brasil, não se observou efeito da correção de acidez sobre os fluxos de metano (LAMMEL et al., 2018). Da mesma forma, em experimento de campo em Porto Rico, não foram observadas diferenças significativas entre os fluxos de metano de solos que passaram por calagem após serem acidificados (MOSIER; DELGADO; KELLER, 1998).

A rizosfera das plantas é um microambiente com condições diferenciadas do solo, em que o pH pode ser até 2 unidades mais ácido ou mais básico do que seu entorno, há diferenças na concentração de oxigênio e na umidade e é enriquecida em moléculas liberadas pela planta, como açúcares e ácidos orgânicos (PHILIPPOT et al., 2013). Estes fatores afetam a ciclagem do metano no solo, tanto por fornecer substrato orgânico para metanogênese, como por favorecer a oxidação de metano na rizosfera, que pode oxidar até 90% do metano produzido em solos alagados de arroz (FRENZEL; ROTHFUSS; CONRAD, 1992). Apesar de seu papel reconhecido em solos alagados de plantações de arroz, pouco se conhece sobre o impacto da rizosfera na ciclagem de metano em solos de terra firme, por estes solos serem comumente tidos como sumidouro de metano, não fonte (PHILIPPOT et al., 2009). Compreender como a rizosfera de pastagens tropicais afeta a ciclagem de metano no solo, à medida que são importantes fontes de metano atmosférico, pode trazer novos caminhos para uma pecuária de menor impacto nas emissões de gases de efeito estufa.

Num contexto de aumento do desmatamento na Amazônia para fins de agricultura e pecuária, uso intensivo do solo e índices de degradação de pastagem que vão de 50% a 70% do total das áreas de pastagem na região (DIAS-FILHO, 2017), esta pesquisa avaliou como a correção de acidez do solo e a cobertura de gramínea na pastagem, em contraponto a um solo descoberto, afetam a ciclagem de metano no solo, focando a comunidade microbiana no solo e na rizosfera de *Urochloa brizantha* cv. Marandu.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Local de amostragem

Os estudos se deram partindo de solos da Amazônia ocidental, na Fazenda Nova Vida – Ariquemes/RO (10°10'49.5"S, 62°49'23.9"W), e oriental, na Floresta Nacional do Tapajós e proximidades – Belterra e Santarém/PA (3°07'53.8"S, 54°57'24.2"W), com coletas realizadas em abril de 2017 e agosto de 2019, respectivamente. Os experimentos 1 (solos de Ariquemes/RO) e 2 (solos de Belterra e Santarém/PA) foram conduzidos em condições controladas em casa de vegetação, na sede do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Universidade de São Paulo (22°42'27.7"S, 47°38'41.0"W).

A Amazônia ocidental tem sido estudada quanto a impactos da conversão de floresta para pastagens, com ampla literatura científica caracterizando as respostas ecossistêmicas à conversão (DE MORAES et al., 1996; HERPIN et al., 2002; REINERS et al., 1994) por ser uma região já com alto grau de exploração. A região da Fazenda Nova Vida possui fragmentos de floresta primária em pequenas propriedades e pastagens de diferentes idades. A área de pastagem amostrada foi estabelecida em 1972, sendo manejada por rotação periódica do gado, fogo apenas no controle de eventuais pragas, remoção mecânica de espécies arbóreas invasoras e ao menos um registro de realização de calagem, há 15 anos do momento da coleta, conforme informações dos administradores.

A Amazônia oriental representa áreas de exploração mais recente, ainda sob menor exploração. A Floresta Nacional do Tapajós foi amostrada como modelo de área de conservação e os solos de pastagem em pequenas propriedades de Belterra/PA. As áreas de pastagem utilizadas neste estudo foram estabelecidas entre 1989-1994 e comportavam gado no momento da coleta, apresentavam sinais esparsos de degradação, sem histórico de uso de calagem, e com queimas sem periodicidade definida apenas para controle plantas invasoras, conforme informações dos proprietários.

Para coleta dos solos utilizados em experimentos, em cada expedição foram selecionadas uma área sob cada uso do solo, Floresta Primária e Pastagem sob *Urochloa brizantha* cv. Marandu. Cinco pontos foram estabelecidos na camada 0-10 cm, separados por 50 m de distância em linha reta e amostras de solo coletadas

e transportadas a fresco para análises químicas e experimentação. Os 5 pontos de cada área foram combinados e homogeneizados, e só então distribuídos nos vasos.

3.2.2 Experimentos em mesocosmos

Para a realização dos experimentos 1 (oeste amazônico) e 2 (leste amazônico), vasos de barro com capacidade de 10 L foram utilizados, com solos previamente homogeneizados e peneirados a 5 mm, formando camada de 10 cm com 5 kg de solo por vaso. O ajuste de pH se deu com adição de CaCO_3 (poder relativo de neutralização total equivalente de 100%) a fim de que todos atingissem pH $\sim 6,5$ (água), calculado para 70-85 % da saturação por bases. A umidade de todos foi então padronizada em ~ 70 % da capacidade de retenção de água dos vasos e corrigida a cada dois a quatro dias, tomando como referência a variação de peso após secagem dos solos por 48 h a 75 °C. Após adição de CaCO_3 , os solos ficaram 40 dias em repouso nos vasos. Quanto ao experimento 1, passado este período, as primeiras amostras de solo foram coletadas, mas somente após outros 100 dias as gramíneas foram semeadas com *Urochloa brizantha* cv. Marandu e as medidas de fluxo iniciadas e continuadas por 110 dias. Quanto ao experimento 2, a semeadura e medidas de fluxo se iniciaram imediatamente após os 40 dias e prosseguiram por mais 40 dias, junto às medidas de fluxo de CH_4 . No experimento 1 a coleta do solo rizosférico aconteceu após a planta atingir ~ 35 cm, no experimento 2 ao fim dos 40 dias. O solo rizosférico foi definido como o solo aderido à raiz da planta, não desagregando espontaneamente com movimento intenso das raízes, sendo removido com auxílio de pincel. Não foram realizadas análises moleculares com solos do experimento 2. Todos os estudos foram conduzidos com 4 réplicas biológicas (4 vasos), com solos homogeneizados do campo. Os tratamentos, para ambos os solos de floresta e pastagem, foram: solo com pH natural; solo com calagem; solo com gramínea; solo com calagem e gramínea.

3.2.3 Coleta e determinação de fluxos em campo

Visando avaliar os fluxos de metano em solos sob *Urochloa brizantha* cv. Marandu e sem cobertura de gramínea em campo, foram estudadas duas áreas de pastagem de Belterra/PA, no fim da estação chuvosa (julho – agosto de 2019). Em cada área foram estabelecidos quatro pontos sob planta nos vértices de um

quadrado de 100 m de lado, mais um ponto central. Em um raio de 10 m de cada um dos pontos, manchas de solo sem cobertura de gramínea e com sinais de compactação do solo (indicativo de erosão) também foram selecionados. Após avaliados os fluxos, o bloco de solo 0-10 cm sob a câmara foi coletado e acondicionado em plástico, separado no mesmo dia com auxílio de pincéis o solo rizosférico (aderido à raiz da planta e não desagregando espontaneamente com movimento) do solo adjacente às raízes (não rizosférico). Além destes os solos (0-10 cm) das áreas sem cobertura de gramínea (bulk) também foram acondicionados a -20°C para análises moleculares.

3.2.4 Determinação de fluxos gases de efeito estufa

Todas as avaliações de fluxo (experimentos e campo) se deram por meio de câmaras estáticas cilíndricas. As câmaras consistiam de um cilindro metálico como base e uma tampa de PVC com duas saídas com conectores de encaixe rápido para mangueiras 8 mm. As tampas e as bases possuíam 20 cm de diâmetro e quando combinadas e fixadas ao solo possuíam volume aproximado de 6 L. As bases possuíam superfície adaptada para encaixe com as tampas, e a vedação entre tampa e base se deu por adição de água. As bases foram fixadas no mínimo em profundidade média de 5 cm de solo e niveladas de forma a ficarem firmes no solo e sustentarem a água na vedação. Após fechadas, as câmaras foram conectadas por mangueiras ao equipamento e mantidas fechadas por 10 minutos (10 s de intervalo entre as medidas). O equipamento utilizado foi um analisador de gases por laser (UGGA, Los Gatos Research, San Jose, CA, EUA) e os fluxos calculados por modelo de regressão linear (IPCC, 2007). As mesmas câmaras foram utilizadas em vasos com gramínea, sendo as folhas acomodadas dentro da câmara.

3.2.5 Caracterização das propriedades químicas das amostras de solo

Cerca de 600 g de solo foram enviadas para o Laboratório de Análises Químicas do Departamento de Ciência do Solo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), para a análise das suas propriedades químicas, utilizando protocolos em Raij et al. (2001). No laboratório foi realizada a química para fins de fertilidade do solo, que consiste na determinação do pH em CaCl₂; Fósforo, Potássio,

Cálcio e Magnésio, pela extração em resina trocadora de íons; Alumínio pela extração de Cloreto de Potássio 1 mol/L; acidez potencial estimada pelo pH SMP; matéria orgânica (g/kg) pelo método de dicromato/titulométrico; Boro pela extração com água quente; Cobre, Ferro, Manganês e Zinco extraídos pelo extrator DTPA-TEA (pH 7,3); e dos cálculos SB (soma de bases), CTC (capacidade de troca de cátions), V% (saturação por bases) e m% (saturação em Alumínio).

3.2.6 Extração de DNA

O DNA total do solo foi extraído com o *PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) a partir de 250 mg de solo, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, exceto que após adição de C1 o tempo de agitação foi de 15 minutos e de centrifugação de 3 min (VENTURINI et al., 2020). A quantidade e qualidade das amostras de DNA foram analisadas em espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) com densidade ótica de 260 nm, assim como conferidas em gel de agarose 1%, corado com *Sybr gold* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) submetido a um campo elétrico de 100 V por aproximadamente 30 minutos e foto documentado. O DNA total extraído das amostras foi armazenado em freezer a -20 °C.

3.2.7 Abundância de produtores e consumidores de metano

A técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) foi utilizada para quantificar os números de cópias dos genes associados à ciclagem do metano *mcrA*, *pmoA* e *mmoX* (Tabela 1) a partir das amostras de DNA total do solo. Para cada gene foi construída uma curva padrão entre 10 a 10⁷ cópias do gene de interesse, obtido previamente pela técnica de PCR a partir de isolados *Methanolinea mesofila* (DSMZ 23604), para o gene *mcrA*, e *Methylosinus sporium* (DSMZ 17706), para os genes *pmoA* e *mmoX*, ambos obtidos junto ao DSMZ (Deutsch Collection of Microorganism and Cell Cultures). A técnica foi realizada em triplicata para cada amostra no equipamento *StepOne Plus* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), com um volume final de 10 µL, contendo 5 µL do SYBR Green ROX qPCR (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), 1 µL de cada *primer* (5 pmols), 1 µL de DNA

(ajustado para 10 ng/ μ L), 0,8 μ L de albumina bovina (20 mg/ mL) (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA) e 1,2 μ L de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada.

Tabela 1 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para qPCR dos genes *mcrA*, *pmoA* e *mmoX*, condições de amplificação e referências

Gene	Iniciador	Sequência (5'-3')	Ciclagem	Referência
mcrA	mlas-F	GGYGGTGTMGGDTTCA CMCARTA	95°C por 10' - 45 ciclos de 95°C por 30" e 60°C por 45" - 72°C por 30"	Angel, Claus e Conrad (2012)
	mcrA-R	CGTTCATBGCCTAGTTV GGRTAGT		Steinberg e Regan (2008)
pmoA	A189F	GGNGACTGGGACTTCT GG	95°C por 10' - 45 ciclos de 95°C por 30" e 58°C por 30" - 72°C por 45"	Holmes et al. (1999)
	MB661r	CCGGMGCAACGTCYTT ACC		Costello e Lidstrom (1999)
mmoX	mmoX1	CGGTCCGCTGTGGAAG GGCATGAAGCGCGT	95°C por 10' - 45 ciclos de 95°C por 10" e 66°C por 20" - 72°C por 30"	Miguez et al. (1997)
	mmoX2	GGCTCGACCTTGAAC TGGAGCCATACTCG		

Com o fim de não inserir viés na análise entre placas e corridas, a quantificação dos genes se deu com auxílio do software LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003), a partir do qual os dados brutos de amplificação de cada amostra foram usados para calcular eficiências individuais de reação, e limites de detecção estabelecidos para cada grupo de réplicas técnicas. Os dados gerados em unidades de fluorescência arbitrária foram convertidos a número de cópias dos genes utilizando interpolação linear entre as quantidades conhecidas na curva padrão (mínimo de 5 pontos) e as medidas de fluorescência observadas, sendo utilizadas as curvas de cada placa como referência para as respectivas amostras.

3.2.8 Sequenciamento de porção do gene 16S *rRNA* com MiSeq

Para acessar a composição da comunidade microbiana foi utilizada tecnologia de sequenciamento a partir da plataforma MiSeq® Illumina, com kit de 600c e *primers* 515F (PARADA et al., 2016) e 806R (APPRILL et al., 2015) para região V4 do gene 16S *rRNA* (CAPORASO et al., 2011) no Centro de Genômica Funcional da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Essa escolha se deve à quantidade de *reads*

geradas, considerando o ambiente diverso que é o solo, e o tamanho dos *reads paired-end* (média 300 pb), que permitiu classificação de metanotróficas em nível de gênero, com índice de confiança maior que 80%, como convém para compreender as distinções conhecidas da forma de metanotrofia utilizada. No preparo da biblioteca gênica, as condições foram: 95 °C por 3 minutos e 25 ciclos de: 95 °C por 30 segundos, 50 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e extensão final a 72 °C por 5 minutos. As concentrações de DNA nas amostras foram ajustadas para 10 ng/μL utilizando espectrofotômetro Nanodrop 2000c e as reações de PCR com *buffer* 10x – 2,5 μL, MgCl 50 mM – 1 μL, dNTPs 10mM – 1 μL, *Forward Primer* 10μM – 0,5 μL, *Reverse Primer* 10μL – 0,5 μL, *Taq Platinum* 5 U/μL – 0,5 μL PCR e água para PCR – 14 μL, num volume total de 25 μL por reação. Após a PCR, foi feita purificação do DNA com *beads AMPure XP* (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA) e verificação em gel de agarose. A segunda PCR foi feita de forma similar, porém para adicionar os adaptadores, seguida por outra purificação com *beads AMPure XP* e verificação em gel de agarose. O *pool* dos *amplicons* (para cada *primer*) foi feito a partir de volumes iguais dos *amplicons* normalizados utilizando quantificação por qPCR com o *kit* KAPA de quantificação de bibliotecas Illumina (Roche, Basileia, Suíça). O processamento computacional desses dados foi realizado utilizando QIIME2 (BOLYEN et al., 2019) versão 2017.11 para experimento 1 e 2019.10 para amostras de campo, com controle de qualidade dos dados utilizando ferramenta DADA2 (CALLAHAN; MCMURDIE; HOLMES, 2017), sem clusterização em OTUs, e identificação taxonômica das sequências utilizando q2-feature-classifier (BOKULICH et al., 2018) utilizando banco de dados do SILVA versão 128 99% (QUAST et al., 2013). A eficiência da profundidade de sequenciamento aplicada foi avaliada por análise da curva de rarefação com o número de ASVs observadas utilizando ferramentas implementadas na plataforma QIIME2 (BOLYEN et al., 2019).

3.2.9 Análises filogenéticas

Buscando reconhecer se as sequências identificadas no estudo como Beijerinckiaceae estão agrupadas junto aos gêneros metanotróficos ou não metanotróficos nesta família, foram geradas árvores filogenéticas entre sequências identificadas e as sequências disponíveis em banco de dados. Para isto, foram realizados dois sequenciamentos das amostras neste estudo, com dois conjuntos de

iniciadores para 16S *rRNA*, um para a região V4: 515F (PARADA; NEEDHAM; FUHRMAN, 2016) e 806R (APPRILL et al., 2015) e outro para a região V3/V4: 341F e 805R (HERLEMANN et al., 2011). A utilização de dois conjuntos de *primers* buscou aumentar a informação de sequência disponível do gene 16S *rRNA*, para melhorar os resultados de análise filogenética. O protocolo de preparo de biblioteca, sequenciamento e a análise para o segundo par de iniciadores foi o mesmo utilizado para o primeiro conjunto de *primers*, exceto na temperatura de anelamento, em 55°C. As sequências foram alinhadas e agrupadas em árvores utilizando software CLC Genomics Workbench 20.0 (QIAGEN, Aarhus, Denmark) e parâmetros *default*, por modelo de máxima verossimilhança (função PHYML) e algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) e assumindo frequências de substituição comum às bases (KIMURA, 1980), testados ao fim em simulação com 1.000 *bootstraps*. As sequências de referência da família Beijerinckiaceae foram obtidas no banco de dados curado RDP versão 11 (COLE et al., 2014), somente as maiores que 1.200 pb de boa qualidade e referências de microrganismos tipo, sendo cortadas em tamanho de acordo com os conjuntos de *primers*. A única sequência do gene 16S *rRNA* disponível para uma bactéria metanotrófica USC α também foi utilizada (PRATSCHER et al., 2018).

3.2.10 Análises estatísticas

Os resultados dos fluxos do gás obtidos foram calculados pela alteração da concentração do gás no interior das câmaras de acordo com o tempo após o fechamento da tampa. Os fluxos acumulados do gás foram calculados pelas médias entre duas mensurações e projeção desta média aos dias intermediários, com a soma dos resultados obtidos ao longo de todo o período de estudo caracterizando o fluxo acumulado total. Análise de redundância (RDA) foi aplicada combinando os dados normalizados (Box-Cox) da comunidade microbiana (abundância e composição) com os dados também normalizados (Box-Cox) da caracterização química do solo, utilizando software CANOCO 5.0 (SMILAUER; LEPS, 2014) com parâmetros *default*. Análises de Componentes Principais (PCA) partindo dos dados de composição e abundância relativa da comunidade microbiana no nível de gênero (excluídas sequências não identificadas), foram realizadas em software STAMP v. 2.1.3 (PARKS et al., 2014). A seguir, Análise Permutacional de Variância (PERMANOVA) (one-way)

foi aplicada às mesmas matrizes para testar a separação dos agrupamentos, no *software* Past v. 3.5 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001), com índice de similaridade de Bray-curtis. Todas as análises comparativas entre grupos que seguiram foram realizadas por análise de variância (ANOVA) e teste *post hoc* de Tukey HSD (Honestly Significant Difference) bicaudal, a menos que especificado o contrário, utilizando pacote *agricolae* v. 1.2-8 pelo software R Studio (R Core Team, 2013). Dados diferentes de 1,5x o intervalo interquartil da distribuição foram definidos como *outliers*.

Para os dados resultantes do sequenciamento em larga escala foi utilizada, no ambiente QIIME2 2019.10, a ferramenta DEICODE (MARTINO et al., 2019), que parte de matrizes de complementação e Análises Aitchison de Componentes Principais (RPCA), útil para identificar mudanças significativas na comunidade a partir de dados de abundância relativa. A seguir, a ferramenta QURRO (FEDARKO et al., 2019) foi utilizada para avaliar a comunidade associada à ciclagem do metano, por razões a partir de dados transformados da abundância (logarítmo natural), utilizando o mínimo de 10 ocorrências do *taxon*.

3.3 Resultados

Em experimentos em casa de vegetação, solos de pastagem e de floresta amazônica foram submetidos a correção de acidez e presença/ ausência de cobertura de gramínea *Urochloa brizantha* cv. Marandu. O experimento 1 foi realizado com solos do oeste amazônico (Ariquemes/RO) e o segundo com solos do leste amazônico (Santarém/PA). A correção de acidez ocorreu dentro do esperado, com aumento do Cálcio, redução da saturação por Alumínio e pH final em ~6,0 (CaCl₂), equivalente a 6,5 (água), sendo este último um dos principais fatores de separação entre os solos (Tabela S1, Figura S1). No primeiro experimento, há sequestro de metano nos dois tipos de solo, sendo maior sequestro em solos de floresta (Figura 1). No segundo, há emissão em solo de pastagem e sequestro em solo de floresta (Figura S2). No experimento 1 o solo de floresta com a presença de planta é o que apresenta maior sequestro de metano, em valores próximos ao do solo naturalmente ácido de uma floresta e menor do que no solo com correção de acidez (Figura 1-b; p=0,059). No experimento 2 a tendência é similar. Os solos de pastagem consomem em média 35% mais metano (Figura 1-a; p=0,001) ou tendem a emitir menos (Figura S1-a) quando tem uma cobertura de braquiária, quando o fluxo acumulado é comparado ao de um

solo bulk. Este resultado aponta um papel da gramínea sobre o solo como forma de redução de emissões de metano ou mesmo de sequestro do gás. A calagem de solos de pastagem no experimento 1 levou à redução no sequestro de metano (Figura 1-a; $p=0,001$) e a calagem de solo floresta no experimento 2 levou a uma mudança de sequestro para emissão (Figura S1-b; $p=0,052$).

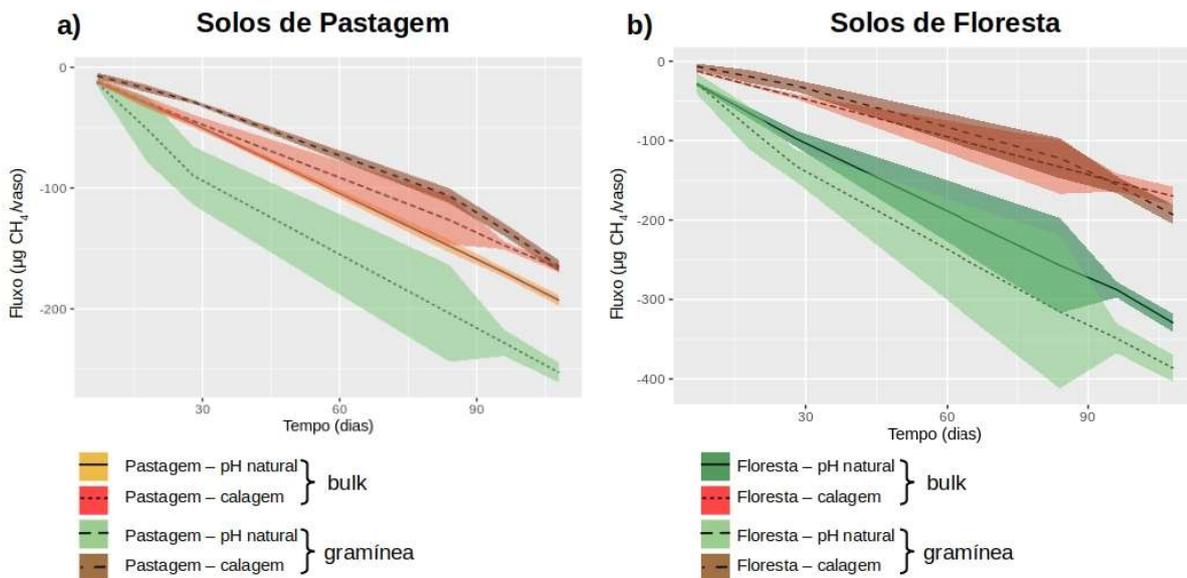


Figura 1 - fluxo acumulado de CH_4 em experimento com solos de a) pastagem e b) floresta de Ariquemes/RO (2017), com e sem correção de acidez e com e sem cobertura de braquiária. Linhas centrais indicam a média e áreas sombreadas o desvio padrão. Fluxos avaliados aos 7, 18, 28, 84, 96 e 108 dias após transposição das plântulas de *U. brizantha* cv. Marandu

A observação de que a cobertura com gramínea melhora o consumo de metano no solo de pastagem ou mesmo reduz suas emissões levou a teste desta ideia em campo. Para isto, foram realizadas leituras *in situ* dos fluxos de CH_4 em pastagens de Belterra/PA na estação chuvosa, em pontos com e sem cobertura de gramínea. Não foram observadas diferenças significativas, mas a tendência é a mesma observada nos dois experimentos (Figura S3; $p=0,112$).

As análises moleculares que seguiram foram realizadas somente quanto ao experimento 1 e ao estudo de campo. A microbiota responsável pela ciclagem de metano foi avaliada por técnica de qPCR, a partir do DNA presente no solo, utilizando o número de cópias dos genes *pmoA* e *mcrA* como marcadores para consumidores e produtores de metano, respectivamente (Figura 2). O gene *mmoX* também foi avaliado, oferecendo informações sobre metanotróficas que possuem a enzima

metano mono-oxigenase em sua forma solúvel. Pôde-se observar que houve uma homogeneização com o tempo da comunidade metanotrófica no intervalo de tempo do experimento (entre 40 e 250 dias), possivelmente devido às condições controladas de umidade (~70% da capacidade de retenção) (Figura 2). Esta homogeneização não foi observada quanto aos produtores de metano, que se encontram em níveis muito baixos (próximos a zero) em solos de floresta (Figura 2). Quanto aos portadores do gene *mmoX*, não houve resposta significativa a nenhuma das condições avaliadas, de mudança do uso do solo, correção de acidez ou rizosfera de braquiária (Figura S4). A correção de acidez aponta uma tendência a redução de metanotróficas nos solos de floresta, com ($p=0,339$) ou sem gramínea ($p=0,162$) (Figura 2-a). Os solos de pastagem apresentam entre 100 e 1.000 vezes mais arqueias metanogênicas do que em florestas durante todo o experimento, não mudando com a correção de acidez, mas com tendência a redução aos 250 dias ($p=0,056$). A rizosfera de gramínea em solos de pastagem é reduzida em média em 13 vezes na abundância de arqueias metanogênicas (Figura 2-b; $p=0,025$), em relação a um solo sem cobertura de gramínea (bulk). Não foram observadas mudanças significativas na abundância de metanotróficas (Figura 2-a; $p=0,263$). A redução de arqueias metanogênicas na rizosfera de braquiária, em contraponto a um solo sem cobertura de gramínea (bulk), não foi observada em estudo de campo (Figura S5; $p=0,186$).

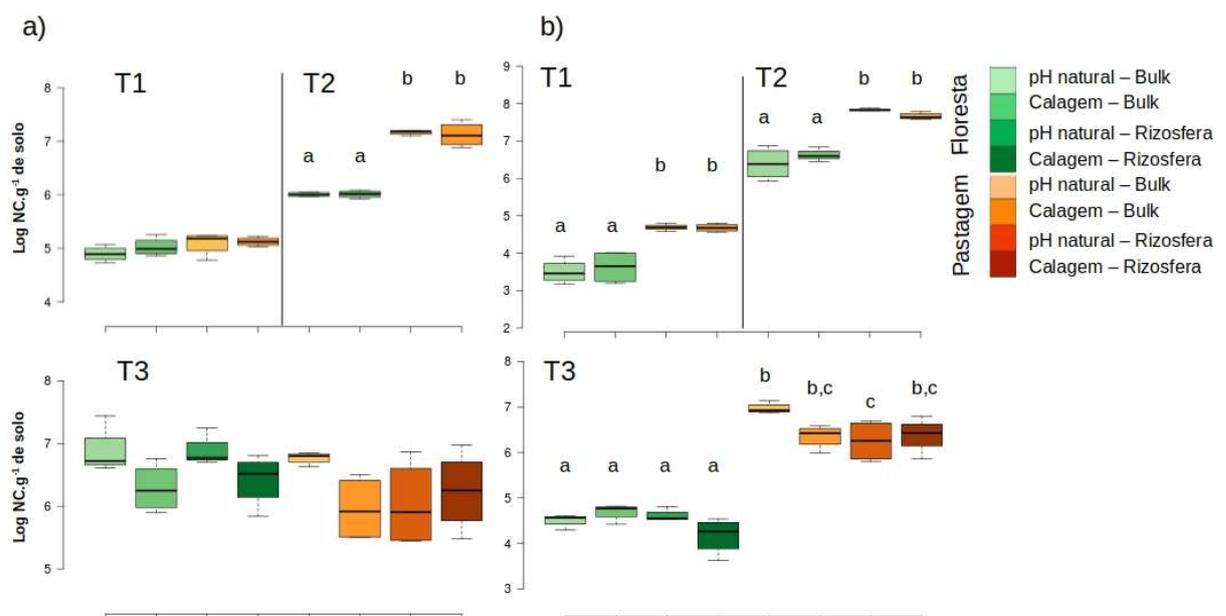


Figura 2 - quantificação de cópias dos genes a) *pmoA* e b) *mcrA* em distintos momentos após início do experimento 1. T1 = 40 dias, T2 = 130 dias e T3 = 250 dias. Letras indicam mudanças significativas (Tukey HSD; $p < 0,05$). NC = número de cópias

Para investigar os efeitos da correção de acidez e da rizosfera de gramínea sobre grupos específicos de microrganismos, foi realizado sequenciamento massivo de DNA de fragmentos amplificados do gene 16S *rRNA*. Os resultados mostraram uma profundidade de sequenciamento adequada, com saturação das curvas de rarefação abaixo da profundidade de sequenciamento mínima tanto para o experimento 1 (Tabela S2, Figura S6-a) quanto para o estudo de campo (Tabela S3, Figura S6-b). Além disso, destaca duas comunidades distintas nos solos de floresta e pastagem sem correção de acidez (Figura 3-a; PERMANOVA, $p=0,0330$) e indicam um efeito da correção da acidez sobre a comunidade em solos de floresta (Figura 3-b; PERMANOVA, $p=0,0274$) e pastagem (Figura 3-b; PERMANOVA, $p=0,0291$). A rizosfera de *Urochloa brizantha* cv. Marandu congrega uma comunidade distinta daquela de seus solos de origem, porém com diferenciação menos intensa em solos de floresta (Figura 3-c; PERMANOVA, $p=0,0283$) e pastagem (Figura 3-c; PERMANOVA, $p=0,0295$). Considerando somente a comunidade de arqueias, também há diferenciação entre as comunidades nos solos de floresta e pastagem (Figura 3-d; PERMANOVA, $p=0,0277$). A correção de acidez não modifica significativamente a comunidade em solos de floresta, mas sim de pastagem (Figura 3-e; PERMANOVA, $p=0,029$). Já as rizosferas são diferenciadas em relação aos solos bulk de floresta (Figura 3-f; PERMANOVA, $p=0,0302$) e de pastagem (Figura 3-f; PERMANOVA, $p=0,2820$). A correção de acidez do solo torna a comunidade na rizosfera em solo de floresta similar ao bulk, mas não o faz em solos de pastagem (Figura 3; PERMANOVA, $p=0,0287$).

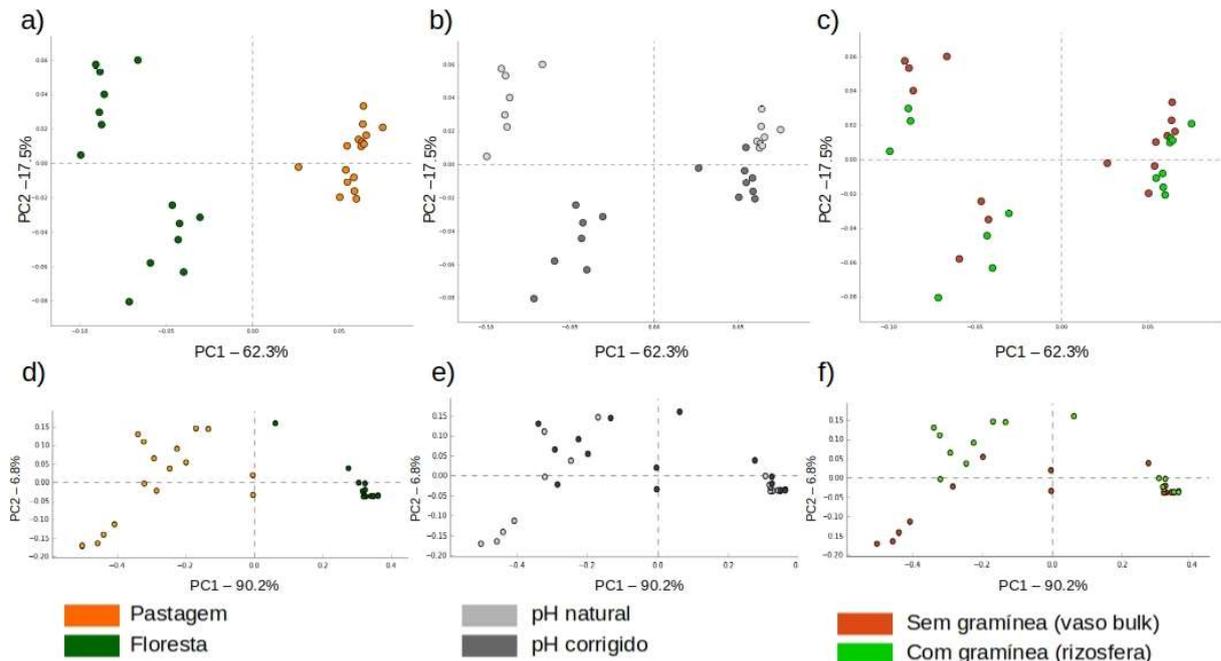


Figura 3 - Análise de Componentes Principais (PCA) no nível de gênero da comunidade procariótica (a, b, c) e de Archaea somente (d, e, f) de solos do experimento 1 (Ariquemes/RO), desconsideradas seqüências sem classificação. Figura destaca efeitos do uso do solo (a, d), correção de acidez (b, e) e da rizosfera de *Urochloa brizantha* cv. Marandu (c, f) aos 250 dias de experimento

Considerando somente a comunidade associada à ciclagem de metano no solo em nossa análise (identificada com mínimo de 90% de confiança), filtrando os grupos reconhecidos como metanotróficos (KNIEF, 2015) e metanogênicos (ANGEL; CLAUS; CONRAD, 2012b) e analisando as alterações numa escala logarítmica, observou-se resultados similares aos obtidos na quantificação absoluta (Figura 4). Houve baixo número de metanogênicos em solos de floresta e abundância similar de metanotróficas entre os solos (Figura 4). O aumento de metanogênicos em solos de floresta com a correção de acidez não foi significativo, havendo redução significativa de metanotróficas somente quando na combinação dos tratamentos de correção de acidez e cobertura de gramínea (Figura 4, $p=0,024$). As metanotróficas em solos de pastagem não sofreram alteração com a correção de acidez ou a presença de gramínea, tal qual observado na quantificação de cópias de *pmoA* (Figura 2). No entanto, as metanogênicas são reduzidas em rizosfera de braquiária, com ($p=0,017$) ou sem ($p=0,007$) a correção de acidez (Figura 4). Este último resultado foi similar ao observado em campo, que ainda que não significativo, aponta uma tendência à redução de arqueias metanogênicas de distintos grupos na rizosfera de braquiária (Figura S7).

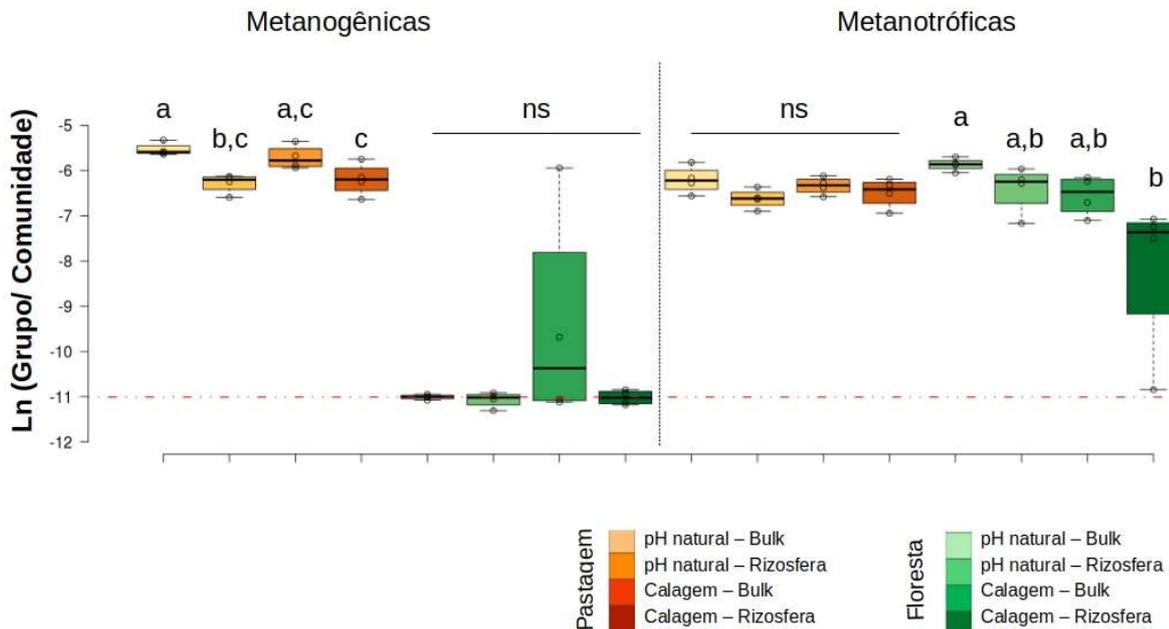


Figura 4 - mudanças na abundância relativa entre grupos de metanogênicas e metanotróficas em relação a toda a comunidade procariótica aos 250 dias do experimento 1. Linha pontilhada indica valor que marcaria limite de corte de 10 contagens para aquele grupo. Quanto mais negativo o número, menor a abundância em relação à comunidade total. Letras indicam mudanças significativas (Tukey HSD; $p < 0,05$). ns = não significativo

Para compreender quem são os grupos taxonômicos associados à ciclagem de metano nestes solos, uma análise detalhada foi realizada de todos os grupos que apresentaram sequências dos gêneros conhecidos por atuar na ciclagem de metano (ANGEL; CLAUS; CONRAD, 2012b; KNIEF, 2015) (Figuras 5 e 6). Solos de floresta apresentaram uma abundância baixa de arqueias metanogênicas do gênero *Methanosarcina spp.* A família Beijerinckiaceae se destaca nestes solos, não sendo possível uma identificação taxonômica de gêneros com o banco de dados curado SILVA versão 128 (QUAST et al., 2013). Nova identificação filogenética foi realizada, comparando todas as sequências anotadas no experimento como Beijerinckiaceae, cinco variantes de sequências amplificadas (ASVs) com o conjunto 341F/805R e oito ASVs com 515F/806R. Nesta análise foram usadas como referência somente as sequências do gene 16S *rRNA* conhecidas desta família em banco de dados curado, e os resultados indicam que são próximas aos gêneros metanotróficos *Methylocella spp.* e USC α , com mais de 90% de confiança (Figuras S8 e S9). As sequências sem identificação de gênero desta família são reduzidas em solos de floresta com correção

de acidez (Figura 6). Também são encontradas nos solos de pastagem, reduzidas na rizosfera e pouco sensíveis à correção de acidez do solo (Figura 6). Outro gênero de metanotróficas presente em pastagens e não detectado em solos de floresta foi o gênero *Methylocystis spp.*, não sendo alterado pela correção de acidez ou na rizosfera de gramínea.

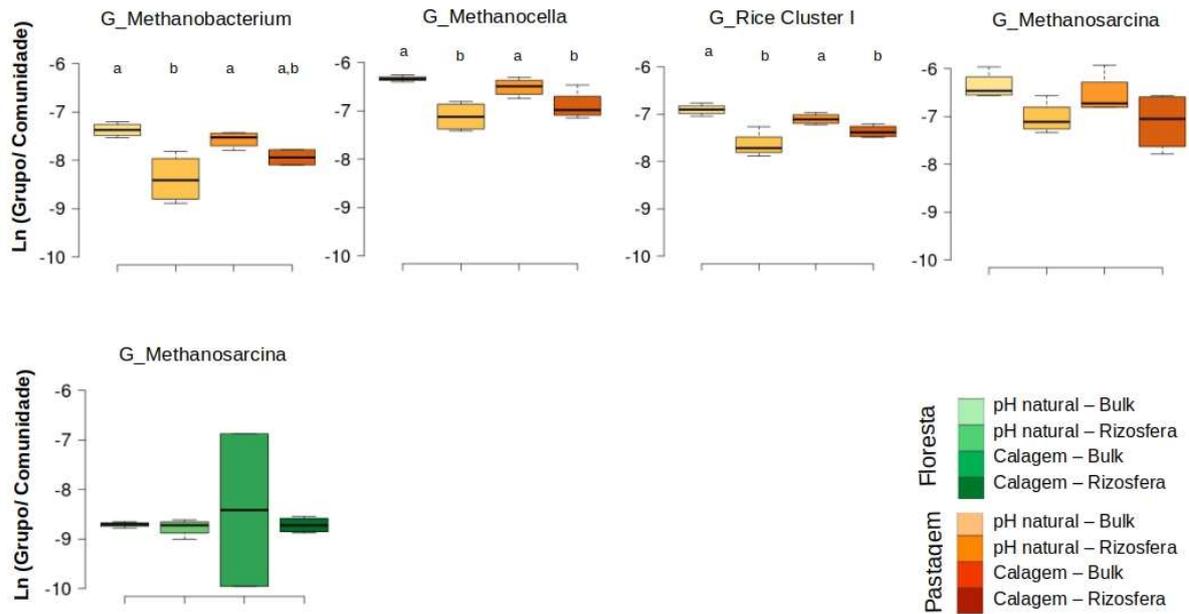


Figura 5 - razão entre todos os microrganismos metanogênicos identificados por gênero (G) em relação ao total da comunidade procariótica aos 250 dias do experimento 1. Quanto mais negativos os números, menor a abundância. Letras indicam diferenças significativas (Tukey HSD; $p < 0,05$)

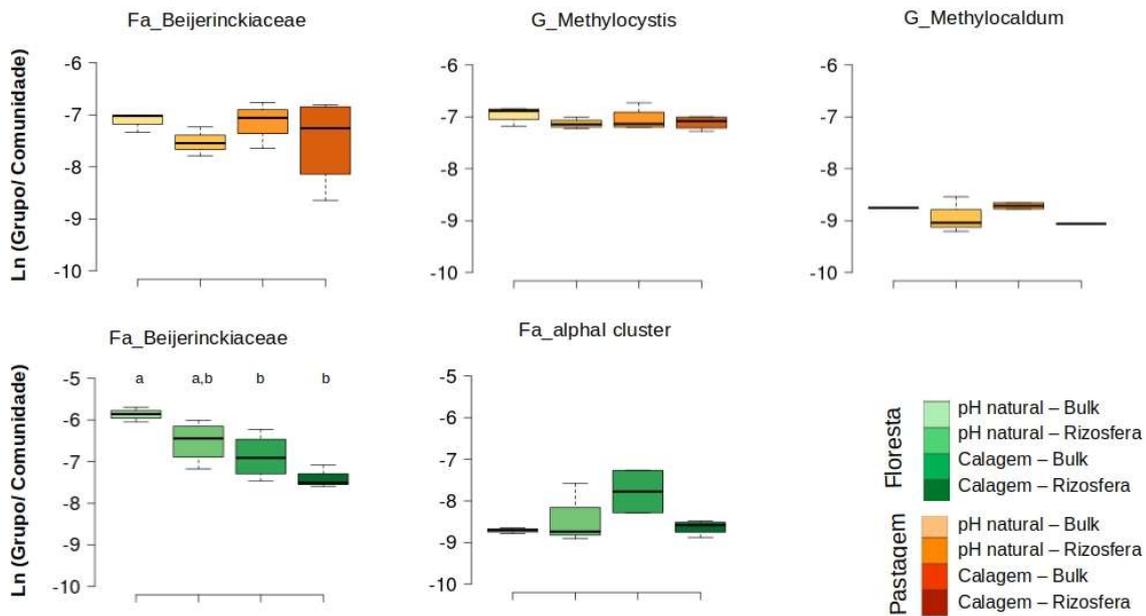


Figura 6 - razão entre todos os microrganismos metanotróficos identificados por gênero (G) em relação ao total da comunidade procariótica aos 250 dias do experimento 1. Quanto mais negativos os números, menor a abundância. Letras indicam diferenças significativas (Tukey HSD; $p < 0,05$)

3.4 Discussão

O desmatamento da floresta amazônica seguido do uso do solo para estabelecimento de pastagens afeta a ciclagem de metano no solo. Solos que antes sob floresta sequestravam metano da atmosfera passam a ser emissores sob pastagens, apesar de serem capazes de sequestro de metano durante parte do ano (FERNANDES et al., 2002). Nesta pesquisa corroboramos com os resultados já observados anteriormente (FERNANDES et al., 2002; GOREAU; DE MELLO, 1988; STEUDLER et al., 1996), ainda que os valores obtidos em experimentos não possam ser comparados diretamente com os observados em campo, por se limitarem a uma camada superficial de 10 cm de solo. Nossos resultados seguem a mesma tendência do observado por Steudler et al. (1996), em que florestas consomem mais metano, com uma diferença de 2,74x o fluxo em pastagens. Em nossos experimentos esses valores foram de 0,6x considerando florestas e pastagens de Ariquemes/RO e 4,28x em solos de Belterra/PA. Esta diferença entre as áreas pode estar associada à conservação das áreas de floresta que originaram estes solos, sendo fragmentos em pequenas propriedades nos solos do experimento 1 (Ariquemes/RO) e de uma floresta

contígua em área de conservação no experimento 2 (Belterra-Santarém/PA), à medida que a fragmentação de florestas pode estar associada com aumento de emissões de gases de efeito estufa pelo solo (LAURANCE; LAURANCE; DELAMONICA, 1998). Outro ponto é que as pastagens em Ariquemes/RO têm histórico de manejo visando conservação do solo, e os solos de pastagem de Belterra/PA apresentavam sinais de degradação. Como o manejo afeta o estoque de carbono no solo (FEARNSIDE; BARBOSA, 1998), espera-se que também afete a ciclagem de metano no solo.

A conversão do uso do solo de floresta a pastagem altera a química e física do solo, e afeta os microrganismos produtores e consumidores de metano. Em estudo de campo, com amostragem única, na mesma região em Ariquemes/RO, foi demonstrada redução em abundância nas bactérias metanotróficas e aumento de metanogênicas, além de mudanças na composição das comunidades, à qual se atribuiu ao menos em parte explicação das mudanças nos fluxos de gás (MEYER et al., 2017). Os resultados desta pesquisa, em condições de umidade controlada, não detectaram mudanças significativas na abundância de metanotróficas, nem considerando o número de cópias gênicas de *pmoA* e *mmoX*, nem mudanças na abundância relativa em sequenciamento de amplicons.

Solos de pastagem na região amazônica apresentam uma comunidade microbiana distinta da observada em solos de floresta (DE CARVALHO et al., 2016; JESUS et al., 2009; RODRIGUES et al., 2013), e isto é atribuído em parte à acidez reduzida no processo de estabelecimento de pastagens, em que solos de floresta amazônica apresentam pH numa faixa de 3,5-4,5 (DEMATTE; DEMATTE, 1993). O pH é um dos principais determinantes da comunidade microbiana no solo (FIERER; JACKSON, 2006), e aumentá-lo por calagem é uma estratégia para aumento de fertilidade e redução de toxidez do solo. O processo de calagem se torna necessário no manejo, pois há uma tendência de acidificação de solos de pastagem com o tempo, com pHs chegando a valores próximos aos observados em áreas de floresta (DE MORAES et al., 1996). Além disto, as áreas degradadas e em degradação, que podem somar mais de 50% das áreas de pastagem na Amazônia (DIAS-FILHO, 2017), também tendem a necessitar de correção de acidez para sua restauração. A informação na literatura científica é restrita quanto ao papel da acidez sobre a ciclagem de metano em solos tropicais. Foi demonstrado nesta pesquisa que a correção de acidez e a rizosfera levam os solos a formar comunidades distintas, ainda

que na combinação dos dois fatores, a correção de acidez seja o fator que prevalece. Sabe-se que o pH ótimo de crescimento da maioria das metanotróficas e metanogênicas cultiváveis é neutro (LE MER; ROGER, 2001; WHITTENBURY; DAVIES; DAVEY, 1970), mas a oxidação de metano é observada em ambientes naturais com larga faixa de pH, sendo o pH uma variável explicativa importante para a distribuição de metanotróficas (KNIEF; LIPSKI; DUNFIELD, 2003; KOLB, 2009; NAZARIES et al., 2013). Os resultados da pesquisa apontam que a correção de acidez para valores de pH em torno de 6,5 tem efeitos distintos se feita em solos de pastagem ou floresta, possivelmente pelo solo de floresta ter sofrido uma correção mais intensa de pH, saindo de 3,5-5 para 6,5, enquanto que nos solos de pastagem a alteração foi de 4,5-5,5 para 6,5. Nos solos de floresta houve redução do consumo de metano no experimento 1 e emissão no experimento 2 após correção de acidez, porém não houve diferenças significativas nos solos de pastagem. Assim, a correção de acidez pode não gerar impactos nas emissões de metano nos solos de pastagem e manter o pH destes solos em valores adequados para a produtividade de biomassa de gramínea e em valores menores que 6,5, com gramíneas tolerantes à acidez, pode ser o mais efetivo em reduzir as emissões de metano em pastagens. Quanto ao efeito nos solos de floresta, demonstrou-se que a redução de acidez, sozinha, já é capaz de levar um solo de floresta de dreno a emissor de metano. Essa mudança nos fluxos não foi perceptível na abundância de metanotróficas ou metanogênicas por qPCR, apesar de uma redução na abundância relativa de metanotróficas que segue a correção de acidez.

A identificação de microrganismos baseada em sequências curtas de DNA do gene 16S rRNA, como as geradas neste estudo, é limitada à informação evolutiva disponível ali, de forma que nem sempre é possível identificar os microrganismos ao nível de gênero, ficando a identificação restrita a táxons superiores. Como a capacidade de oxidar metano é variável no nível de gênero na família Beijerinckiaceae, identificar as sequências ao nível de família não é suficiente para inferir que são metanotróficas. Esta família, que além de bacterias metanotróficas também congrega microrganismos generalistas capazes de utilizar múltiplas fontes de carbono como fonte energética, se mostrou mais abundante em solos de floresta do que de pastagens. Assim, identificar se são metanotróficas ou não é uma questão relevante no entendimento da ciclagem de metano na conversão de floresta a pastagem. Os resultados demonstram que as sequências de Beijerinckiaceae

observadas em solos de floresta são parte de um agrupamento que congrega as metanotróficas desta família e gêneros que tiveram perda secundária da capacidade metanotrófica (TAMAS et al., 2014). Este agrupamento foi observado a partir dos dois conjuntos de dados com alta sustentação (>90% em 1.000 bootstraps) e congrega também a metanotrófica USC α , fatos somados que indicam que as sequências detectadas neste estudo são de Beijerinckiaceae metanotróficas.

A redução da capacidade oxidativa dos solos de floresta com correção de acidez pode ser devida à menor disponibilidade dos cofatores Fe e Cu sob pH corrigido, necessários à atividade da metano mono-oxigenase (SEMRAU et al., 1995), enzima responsável pelo passo crucial de captação do gás metano e sua conversão a metanol. A redução de atividade desta enzima impacta diretamente no consumo de metano.

Há grande variabilidade nos dados de fluxo de metano que levaram à conclusão de solos de pastagens como emissores de metano, sendo este um resultado de balanço final, o que significa que em partes do ano, e mesmo entre diferentes pastagens, há pontos de sequestro de metano no solo (FERNANDES et al., 2002; STEUDLER et al., 1996). Esta variação está associada a umidades intermediárias no solo, sendo que a umidade é fator determinante para os fluxos de metano (VERCHOT et al., 2000). Por isso, utilizou-se nos experimentos umidade intermediária em 70% da capacidade de retenção em vaso. Outro fator que pode explicar a variabilidade dos fluxos em pastagem é a cobertura do solo por gramínea, fator que está associado ao manejo da pastagem. O manejo dado à pastagem pode influenciar os fluxos de gases do solo, à medida que influencia seu estoque de carbono (FEARNSIDE; BARBOSA, 1998), porém a forma que este manejo pode afetar a comunidade microbiana permanece uma questão em aberto. Como o manejo é feito visando a produtividade de gramínea, e maior biomassa aérea está associado a maior biomassa de raízes, espera-se que a maior área de raízes em pastagem possa criar mais ambiente de interação com a microbiota do solo, e maior atividade de rizosfera. O papel da rizosfera sobre a ciclagem do metano em solos de terra firme ainda é pouco conhecido, e diferentes espécies podem influenciar o solo aumentando sequestro ou produção de metano, dependendo do tipo de solo ou das condições edáficas (PRAEG; WAGNER; ILLMER, 2017). No experimento 1 observou-se que tanto os de floresta quanto os de pastagem com cobertura de gramínea sequestram mais metano do que os com correção da acidez. Os valores de sequestro são similares aos de solo descoberto de

floresta e tendem a ser maiores que os de pastagem sem correção de acidez. Quanto ao experimento 2, observou-se a mesma tendência do experimento 1 nos solos de floresta, porém não significativa. Como a duração do experimento 2 foi menor, é possível que não tenha havido tempo o bastante para a diferenciação intensa observada no experimento 1.

Os resultados apresentados aqui demonstram que a acidez do solo é um fator importante para o sequestro de metano, à medida que a correção de acidez reduz este consumo. O efeito da correção da acidez não é intenso nos solos de pastagem, sendo a presença da planta mais efetiva. Isto demonstra que a correção de acidez em pastagens, se combinada à manutenção da cobertura de braquiária, traria pouco ou nenhum impacto nas emissões de metano sob concentrações atmosféricas do gás, ao mesmo tempo que melhora a qualidade do solo e produtividade.

3.5 Conclusão

Os resultados obtidos apontam que o manejo de pastagens pode mitigar o impacto das emissões de metano por solos na região amazônica, pela manutenção de cobertura de *U. brizantha* cv. Marandu sobre o solo. A rizosfera de *Urochloa brizantha* cv. Marandu é capaz de selecionar uma microbiota que é reduzida em até 10x em arqueias metanogênicas, principalmente as do gênero *Methanobacterium* spp., *Methanocella* spp., *Rice Cluster I* e *Methanosarcina* spp. Além disto, demonstrou-se que a correção de acidez em solos de pastagem pode reduzir o sequestro de metano nestes solos, sob concentrações atmosféricas de metano. Em solos ácidos de floresta, a correção de acidez realizada reduziu em mais de 50% o sequestro de metano pelo solo, chegando a inverter o sentido do fluxo (de dreno a emissor). Não foram observadas alterações significativas na abundância absoluta de microrganismos metanotróficos e metanogênicos seguindo a correção de acidez. Estudos em campo com outras faixas de correção de acidez, considerando a sazonalidade das chuvas e exposição dos solos a condições favoráveis à metanogênese (concentrações mais altas de metano) são necessários para recomendações mais específicas aos produtores.

Referências

- ANGEL, R.; CLAUS, P.; CONRAD, R. Methanogenic archaea are globally ubiquitous in aerated soils and become active under wet anoxic conditions. **The ISME Journal**, v. 6, n. 4, p. 847–862, 2012a. Disponível em: <<http://www.nature.com/ismej/journal/v6/n4/abs/ismej2011141a.html>>. Acesso em: 12 out. 2016.
- APPRILL, A. et al. Minor revision to V4 region SSU *rRNA* 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 75, n. 2, p. 129–137, 2015. Disponível em: <<http://www.int-res.com/abstracts/ame/v75/n2/p129-137/>>. Acesso em: 15 fev. 2020.
- BARTON, L.; MURPHY, D. V.; BUTTERBACH-BAHL, K. Influence of crop rotation and liming on greenhouse gas emissions from a semi-arid soil. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 167, p. 23–32, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167880913000066>>. Acesso em: 9 maio 2017.
- BIŽIĆ, M. et al. Aquatic and terrestrial cyanobacteria produce methane. **Science Advances**, v. 6, n. 3, p. 5343, 2020. Disponível em: <<http://advances.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/sciadv.aax5343>>. Acesso em: 23 jan. 2020.
- BOKULICH, N. A. et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2 q2-feature-classifier plugin. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 90, 2018.
- BOLYEN, E. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, v. 37, p. 852–857, 2019.
- BORKEN, W.; BRUMME, R. Liming practice in temperate forest ecosystems and the effects on CO₂, N₂O and CH₄ fluxes. **Soil Use and Management**, v. 13, p. 251–257, 1997. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1475-2743.1997.tb00596.x>>.
- BUTTERBACH-BAHL, K.; ROTHE, A.; PAPEN, H. Effect of tree distance on N₂O and CH₄ fluxes from soils in temperate forest ecosystems. **Plant and Soil**, v. 240, n. 1, p. 91–103, 2002.
- CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. **The ISME Journal**, v. 11, n. 12, p. 2639–2643, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/ismej.2017.119>>. Acesso em: 21 nov. 2017.
- CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S *rRNA* diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 108, n. 1, p. 4516–4522, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20534432>>. Acesso em: 20 abr. 2018.

COLE, J. R. et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput *rRNA* analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. D633–D642, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3965039/>>.

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**, v. 65, n. 11, p. 5066–5074, 1999. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/65/11/5066>>. Acesso em: 12 out. 2016.

DE CARVALHO, T. S. et al. Land use intensification in the humid tropics increased both alpha and beta diversity of soil bacteria. **Ecology**, v. 97, n. 10, p. 2760–2771, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ecy.1513>>. Acesso em: 15 fev. 2020.

DE MORAES, J. F. L. et al. Soil properties under Amazon forest and changes due to pasture installation in Rondônia, Brazil. **Geoderma**, v. 70, n. 1, p. 63–81, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0016706195000720>>. Acesso em: 12 out. 2016.

DEMATTE, J. L. I.; DEMATTE, J. A. M. Comparações entre as propriedades químicas de solos das regiões da floresta Amazônica e do cerrado do Brasil central. **Scientia Agricola**, v. 50, n. 2, p. 272-286, 1993.

DIAS-FILHO, M. B. **Degradação de pastagens: o que é e como evitar**. Brasília, DF: Embrapa Amazônia Oriental, 2017, 19 p. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1070416/1/TC1117CartilhaPastagemV04.pdf>>. Acesso em: 21 jan. 2020.

FEARNSIDE, P. M.; BARBOSA, R. I. Soil carbon changes from conversion of forest to pasture in Brazilian Amazonia. **Forest Ecology and Management**, v. 108, n. 1–2, p. 147–166, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378112798002229>>. Acesso em: 1 nov. 2015.

FEDARKO, M. W. et al. Visualizing omic feature rankings and log-ratios using Qurro. **bioRxiv**, 2019. doi: 10.1101/2019.12.17.880047v1.full. Acesso em: 15 fev. 2020.

FERNANDES, S. A. P. et al. Seasonal variation of soil chemical properties and CO₂ and CH₄ fluxes in unfertilized and P-fertilized pastures in an Ultisol of the Brazilian Amazon. **Geoderma**, v. 107, n. 3–4, p. 227–241, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016706101001501>>. Acesso em: 3 out. 2017.

FIERER, N.; JACKSON, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 103, n. 3, p. 626–631, 2006. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/103/3/626>>. Acesso em: 14 jun. 2016.

FRENZEL, P.; ROTHFUSS, F.; CONRAD, R. Oxygen profiles and methane turnover in a flooded rice microcosm. **Biology and Fertility of Soils**, v. 14, n. 2, p. 84–89, 1992.

GARCÍA-MARCO, S. et al. No tillage and liming reduce greenhouse gas emissions from poorly drained agricultural soils in Mediterranean regions. **Science of the Total Environment**, v. 566, p. 512–520, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969716310476>>. Acesso em: 5 maio 2017.

GOREAU, T. J.; DE MELLO, W. Z. Tropical deforestation: Some effects on atmospheric chemistry. **Ambio**, v. 17, n. 4, p. 275-281, 1988. Disponível em: <<https://www.osti.gov/etdweb/biblio/6655174>>. Acesso em: 5 maio 2018.

HAMMER, O; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, 2001.

HANSON, R. S.; HANSON, T. E. Methanotrophic bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 439–471, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC239451/>>. Acesso em: 27 abr. 2016.

HERLEMANN, D. P. et al. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. **The ISME journal**, v. 5, n. 10, p. 1571–1579, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21472016>>. Acesso em: 3 dez. 2018.

HERPIN, U. et al. Biogeochemical dynamics following land use change from forest to pasture in a humid tropical area (Rondônia, Brazil): a multi-element approach by means of XRF-spectroscopy. **Science of the Total Environment**, v. 286, n. 1–3, p. 97–109, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969701009676>>. Acesso em: 12 out. 2016.

HOLMES, A. J. et al. Characterization of methanotrophic bacterial populations in soils showing atmospheric methane uptake. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3312–3318, 1999. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/65/8/3312>>. Acesso em: 12 out. 2016.

HÜTSCH, B. W.; WEBSTER, C. P.; POWLSON, D. S. Methane oxidation in soil as affected by land use, soil pH and N fertilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n. 12, p. 1613–1622, 1994. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0038071794903131>>. Acesso em: 10 maio 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Censo Agropecuário de 2017**. Rio de Janeiro, RJ: IBGE, 2017. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3096/agro_2017_resultados_definitivos.pdf>. Acesso em: 19 abril 2020.

IPCC. **Climate change 2013: the physical science basis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2013.

IPCC. **Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

JESUS, E. DA C. et al. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **The ISME Journal**, v. 3, n. 9, p. 1004–1011, 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/ismej/journal/v3/n9/abs/ismej200947a.html>>. Acesso em: 12 out. 2016.

KALLISTOVA, A. Y. et al. Methane formation and oxidation by prokaryotes. **Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 671–691, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1134/S0026261717060091>>.

KARIA, C. T.; DUARTE, J. B.; ARAÚJO, A. C. G. Desenvolvimento de cultivares do gênero *Brachiaria* (trin.) Griseb. no Brasil. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. 58 p. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/570263/1/doc163.pdf>>.

KEPPLER, F. et al. Methane emissions from terrestrial plants under aerobic conditions. **Nature**, v. 439, n. 7073, p. 187–191, 2006.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111–120, 1980.

KIRSCHKE, S. et al. Three decades of global methane sources and sinks. **Nature Geoscience**, v. 6, p. 813–823, 2013.

KNIEF, C. Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic Bacteria evaluated based on *pmoA* as molecular marker. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1346, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4678205/>>. Acesso em: 3 out. 2016.

KNIEF, C.; LIPSKI, A.; DUNFIELD, P. F. Diversity and activity of methanotrophic Bacteria in different upland soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6703–6714, 2003.

KOLB, S. The quest for atmospheric methane oxidizers in forest soils. **Environmental Microbiology Reports**, v. 1, n. 5, p. 336–346, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1758-2229.2009.00047.x>>. Acesso em: 12 dez. 2019.

KUNHIKRISHNAN, A. et al. Functional relationships of soil acidification, liming, and greenhouse gas flux. **Advances in Agronomy**, v. 139, p. 1–71, 2016.

LAMMEL, D. R. et al. Direct and indirect effects of a pH gradient bring insights into the mechanisms driving prokaryotic community structures. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 106, 2018.

LAURANCE, W. F.; LAURANCE, S. G.; DELAMONICA, P. Tropical forest fragmentation and greenhouse gas emissions. **Forest Ecology and Management**, v. 110, n. 1–3, p. 173–180, 1998.

LE MER, J.; ROGER, P. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: a review. **European Journal of Soil Biology**, v. 37, n. 1, p. 25–50, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1164556301010676>>. Acesso em: 25 maio 2016.

LIU, C. et al. Winter-grazing reduces methane uptake by soils of a typical semi-arid steppe in Inner Mongolia, China. **Atmospheric Environment**, v. 41, n. 28, p. 5948–5958, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1352231007002610>>. Acesso em: 12 out. 2016.

MARGULIS, S. **Causes of deforestation of the Brazilian Amazon**. Washington, DC: The World Bank, 2003. (World Bank Working Papers). Disponível em: <<http://elibrary.worldbank.org/doi/book/10.1596/0-8213-5691-7>>. Acesso em: 15 fev. 2020.

MARTINO, C. et al. A Novel Sparse Compositional Technique Reveals Microbial Perturbations. **mSystems**, v. 4, e00016-19, 2019. doi: 10.1128/mSystems.00016-19.

MENDES, L. W. et al. Soil-Borne microbiome: linking diversity to function. **Microbial Ecology**, v. 70, n. 1, p. 255–265, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00248-014-0559-2>>. Acesso em: 12 out. 2016.

MEYER, K. M. et al. Conversion of Amazon rainforest to agriculture alters community traits of methane-cycling organisms. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 6, p. 1547–1556, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/mec.14011>>. Acesso em: 21 mar. 2017.

MIGUEZ, C. B. et al. Detection and isolation of methanotrophic Bacteria possessing soluble methane monooxygenase (sMMO) genes using the Polymerase Chain Reaction (PCR). **Microbial Ecology**, v. 33, n. 1, p. 21–31, 1997. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s002489900004>>. Acesso em: 12 out. 2016.

MORTON, D. C. et al. Cropland expansion changes deforestation dynamics in the southern Brazilian Amazon. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 103, n. 39, p. 14637–14641, 2006.

MOSIER, A. R.; DELGADO, J. A.; KELLER, M. Methane and nitrous oxide fluxes in an acid Oxisol in western Puerto Rico: effects of tillage, liming and fertilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 14, p. 2087–2098, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071798000856>>. Acesso em: 17 jul. 2016.

NAVARRETE, A. A. et al. Soil microbiome responses to the short-term effects of Amazonian deforestation. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 10, p. 2433–2448, 2015. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mec.13172/abstract>>. Acesso em: 12 out. 2016.

NAVARRETE, A. A. et al. Land-use systems affect Archaeal community structure and functional diversity in western Amazon soils. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 5, p. 1527–1540, 2011.

NAZARIES, L. et al. Methane, microbes and models: fundamental understanding of the soil methane cycle for future predictions. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 9, p. 2395-2417, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/1462-2920.12149>>. Acesso em: 19 fev. 2020.

PARADA, A. E.; NEEDHAM, D. M.; FUHRMAN, J. A. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1403–1414, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1462-2920.13023>>. Acesso em: 15 fev. 2020.

PARKS, D. H. et al. STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, v. 30, n. 21, p. 3123-3124, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>>. Acesso em: 19 fev. 2020.

PHILIPPOT, L. et al. Biochemical cycling in the rhizosphere having an impact on global change. **Plant and Soil**, v. 321, p. 61-81, 2009. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-008-9796-9>>. Acesso em: 19 fev. 2020.

PHILIPPOT, L. et al. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 789–799, 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v11/n11/abs/nrmicro3109.html>>. Acesso em: 13 fev. 2015.

PRAEG, N.; WAGNER, A. O.; ILLMER, P. Plant species, temperature, and bedrock affect net methane flux out of grassland and forest soils. **Plant and Soil**, v. 410, n. 1–2, p. 193–206, 2017.

PRATSCHER, J. et al. Unravelling the identity, metabolic potential and global biogeography of the atmospheric methane-oxidizing upland soil cluster α . **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 1016-1029, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.14036>>.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. D590–D596, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3531112/>>.

RAIJ, B. et al. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2001.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 1, p. 62–66, 2003.

REINERS, W. A. et al. Tropical rain forest conversion to pasture: changes in vegetation and soil properties. **Ecological Applications**, v. 4, n. 2, p. 363–377, 1994. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2307/1941940/abstract>>. Acesso em: 12 out. 2016.

RODRIGUES, J. L. M. et al. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 110, n. 3, p. 988–993, 2013. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/110/3/988>>. Acesso em: 2 nov. 2015.

SEMRAU, J. D. et al. Particulate methane monooxygenase genes in methanotrophs. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 11, p. 3071–3079, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC176995/>>.

SERRANO-SILVA, N. et al. Methanogenesis and methanotrophy in soil: a review. **Pedosphere**, v. 24, n. 3, p. 291–307, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1002016014600163>>. Acesso em: 19 jul. 2016.

SMILAUER, P.; LEPS, J. **Multivariate analysis of ecological data using Canoco 5**. Cambridge: Cambridge University Press, 2014.

STEINBERG, L. M.; REGAN, J. M. Phylogenetic comparison of the methanogenic communities from an acidic, oligotrophic fen and an anaerobic digester treating municipal wastewater sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6663–6671, 2008. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/74/21/6663>>. Acesso em: 12 out. 2016.

STEUDLER, P. A. et al. Consequence of forest-to-pasture conversion on CH₄ fluxes in the Brazilian Amazon Basin. **Journal of Geophysical Research: Atmospheres**, v. 101, n. D13, p. 18547–18554, 1996. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1029/96JD01551>>. Acesso em: 25 set. 2017.

TAMAS, I. et al. The (d)evolution of methanotrophy in the Beijerinckiaceae—a comparative genomics analysis. **The ISME Journal**, v. 8, n. 2, p. 369–382, 2014.

TATE, K. R. Soil methane oxidation and land-use change – from process to mitigation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 80, p. 260–272, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071714003575>>. Acesso em: 12 maio 2016.

TIAN, H. et al. Global methane and nitrous oxide emissions from terrestrial ecosystems due to multiple environmental changes. **Ecosystem Health and Sustainability**, v. 1, n. 1, p. 1–20, 2015. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1890/EHS14-0015.1/abstract>>. Acesso em: 26 ago. 2016.

VENTURINI, A. M. et al. Robust DNA protocols for tropical soils. **Heliyon**, v. 6, n. 5, e03830, 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405844020306757>>. Acesso em: 15 maio 2020.

VERCHOT, L. V. et al. Land-Use change and biogeochemical controls of methane fluxes in soils of eastern Amazonia. **Ecosystems**, v. 3, n. 1, p. 41–56, 2000. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s100210000009>>. Acesso em: 9 ago. 2016.

WHITTENBURY, R.; DAVIES, S. L.; DAVEY, J. F. Exospores and cysts formed by methane-utilizing Bacteria. **Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 219–226, 1970. Disponível em: <<http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-61-2-219>>. Acesso em: 12 out. 2016.

4. CALAGEM DE SOLOS DE PASTAGEM NA REGIÃO AMAZÔNICA ESTIMULA A OXIDAÇÃO DE METANO DE BAIXA AFINIDADE COM AÇÃO DE METANOTRÓFICAS TIPO I E II

Resumo

Na região amazônica, pastagens são o principal uso da terra após desmatamento. Esta conversão de uso afeta a comunidade microbiana associada à ciclagem de metano no solo, mudando o papel dos solos de dreno de metano atmosférico para fonte. A acidez típica dos solos de floresta é reduzida no processo de conversão, tornando-os mais férteis, porém com o tempo os solos voltam a sofrer acidificação, que resulta em muitos casos em degradação do solo. O manejo dos solos com calagem se torna necessário para recuperação destes solos, porém seu impacto na ciclagem de metano é pouco conhecido. Neste trabalho foi investigado o papel da acidez do solo sobre a oxidação de metano em situação de estímulo à baixa afinidade (alta concentração de metano). Para isto, solos ácidos de floresta (pH_{H2O} 4,1) e pastagem (pH_{H2O} 4,8) do leste amazônico foram submetidos a experimento com calagem a pH_{H2O} 5,8 e posteriormente incubados por 24 dias sob umidade e temperatura constantes e sob ~10.000 ppm de ¹³CH₄. O DNA total do solo foi extraído e a técnica de SIP-DNA (Sonda de Isótopos Estáveis) utilizada, além da avaliação da abundância de bactérias metanotróficas (quantificação de *pmoA*) e composição da comunidade por sequenciamento de alto rendimento do gene 16S *rRNA*. Observou-se que a correção de acidez estimulou o sequestro de metano em ambos os solos e que a abundância de metanotróficas ativas dobrou nos solos de pastagem. Além disto, foram identificadas metanotróficas *Methylocaldum sp.* (tipo I) e *Beijerinckaceae* (tipo II) como grupos ativos na oxidação de metano em solos de pastagem com correção de acidez. Em solos de floresta com correção de acidez, Nitrososphaeraceae, *Lysobacter sp.* e *Acidothermus sp.* foram identificados como ativos em incorporar ¹³C. O enriquecimento de Nitrososphaeraceae oxidadoras de amônia pode estar associado à capacidade de amônia mono-oxigenases também oxidar metano, e os demais grupos podem estar enriquecidos por simbiose utilizando o metanol gerado na oxidação do metano ou substratos secundários como o formato. A correção de acidez em solos amazônicos, além de aumentar a fertilidade dos solos e auxiliar na recuperação de solos degradados, tem potencial de contribuir com a oxidação de metano em situações de alta concentração do gás, mitigando impacto das emissões de gases de efeito estufa resultantes da mudança de uso do solo.

Palavras-chave: mudanças climáticas, ecologia microbiana, qiime2, Illumina MiSeq

MANAGE PASTURE SOILS BY LIMING IN THE AMAZON REGION PROMOTES LOW-AFFINITY METHANE OXIDATION DRIVEN BY TYPE I AND II METHANOTROPHS

Abstract

In the Amazon region, pastures are the main land use after deforestation. This land use change affects the soil methane cycling microbial community, changing the soils from sink of atmospheric methane to sources. The acidity of the forest soils is reduced in the conversion process, making them more fertile, but over time the soils again turn to acidic, which in many cases results in soil degradation. Liming becomes necessary to recovery these lands, but its impacts on the soil methane cycling is unknown. In this research, we investigated the role of soil acidity on methane oxidation under high concentrations of the gas. For this, forest soils (pH_{H2O} 4.1) and pastures (pH_{H2O} 4.8) from the eastern Amazon region were subjected to liming experiments (pH_{H2O} 5.8) and incubated for 24 days under constant temperature and under ~10,000 ppm of ¹³CH₄. Total soil DNA was extracted and studied by SIP-DNA (Stable Isotopic Probing), methanotrophic abundance quantification (*pmoA* gene) and community composition by high throughput sequencing of 16S *rRNA*. We observed that the acidity correction stimulated the methane sinking in both soils and that the abundance of active methanotrophs doubled in pasture soils. Methanotrophs *Methylocaldum* sp. (type I) and Beijerinckaceae (type II) were identified as active in limed pasture soils. In forest soils with acidity correction, *Nitrososphaeraceae*, *Lysobacter* sp. and *Acidothermus* sp. were identified as ¹³C enriched taxa. The *Nitrososphaeraceae ammonia oxidizers* enrichment can be associated to the capacity of ammonia monooxygenases to perform methane oxidation, and the other groups can be improved by syntrophy using the methanol product of methane oxidation or secondary substrates such as a formate. The liming of pasture soils in Amazonia, in addition to contribute to the soil fertility and to the recovery of degraded areas, has the potential to improve the oxidation of methane in situations of high concentration of this gas, mitigating the impact of greenhouse gases emissions from changes of land-use.

Keyword: climate change, microbial ecology, qiime2, Illumina MiSeq

4.1 Introdução

O gás metano (CH_4) é 86 vezes mais potente que o dióxido de carbono em reter calor na atmosfera num horizonte de 20 anos (IPCC, 2013), e suas emissões estão ligadas principalmente a atividades humanas como pecuária, agricultura irrigada e decomposição em aterros (IPCC, 2013). Solos de florestas tropicais atuam na ciclagem do metano (CH_4) em nível global, desempenhando papel como dreno do metano atmosférico (KELLER; KAPLAN; WOFYSY, 1986). No entanto, o desmatamento seguido do estabelecimento de pastagens, converte esses solos a emissores (FERNANDES et al., 2002; GOREAU; DE MELLO, 1988; MEYER et al., 2020; STEUDLER et al., 1996). O processo de estabelecimento de pastagens em áreas de floresta na Amazônia é comumente precedido por queimadas e realizado sem uso de fertilizantes e este processo leva a um aumento do pH do solo (FEARNSIDE; BARBOSA, 1998; FRITZE et al., 1994). Após anos de uso do solo como pastagem há uma tendência deste pH reduzir novamente chegando a valores próximos aos observados em áreas de floresta (DE MORAES et al., 1996). Manejar o solo para correção de acidez, além de ser uma prática cada vez mais utilizada em solos agrícolas amazônicos para aumento da fertilidade, também pode impactar a ciclagem do metano (KUNHIKRISHNAN et al., 2016).

O metano atmosférico tem origem principalmente biológica (70-80%); arquéias metanogênicas são a principal fonte, produzindo o metano por vias anaeróbias e este pode ser novamente incorporado à matéria orgânica, por bactérias metanotróficas (LE MER; ROGER, 2001). Além do metano que deixa de ser emitido à atmosfera por ser consumido por metanotróficas, 5% do metano atmosférico é removido por ação destas bactérias (IPCC, 2013). Bactérias metanotróficas são ubíquas, encontradas em todo tipo de solos, oceanos, e ambientes extremos (CONRAD, 2009; KUSSMAUL; WILIMZIG; BOCK, 1998). São gram-negativas e classificadas nos filos Proteobactéria, nas classes gama-proteobactéria (tipo I) e alfa-proteobactéria (tipo II), que abrigam as metanotróficas mais abundantes e melhor conhecidas (KNIEF, 2015; PARK; LEE, 2013; SEMRAU; DISPIRITO; YOON, 2010), e em Verrucomicrobia (OP DEN CAMP et al., 2009). A separação em tipos (I e II) se baseia na via bioquímica utilizada para assimilação do carbono a partir do formaldeído, em etapa intermediária da fixação do metano. Metanotróficas do tipo I são gama-proteobactéria que assimilam formaldeído pela via ribulose monofosfato, enquanto tipo II são alfa-proteobactéria que utilizam a

via das serinas. Tipicamente, metanotróficas de tipo I e tipo II são capazes de fixar metano sob altas concentrações (baixa afinidade) enquanto alfa-proteobactéria são capazes de atuar sob baixas concentrações (alta afinidade) (CAI et al., 2016; DUNFIELD et al., 1999). A etapa inicial da incorporação do metano se dá por sua conversão a metanol. Esta etapa é mediada pela enzima mono-oxigenase, que é codificada por genes conservados e que têm sido utilizados como marcadores ambientais: *pmoA* (constituente da subunidade beta da pMMO) e *mmoX* (constituente da subunidade alfa da sMMO) (HANSON; HANSON, 1996; KNIEF, 2015).

Mudanças do uso do solo de floresta amazônica para pastagem alteraram a estrutura da comunidade bacteriana como um todo, sendo o aumento do pH nesses solos uma das razões (JESUS et al., 2009; RODRIGUES et al., 2013). Considerando a resposta das comunidades metanotróficas e metanogênicas à mudança do uso do solo, foram observadas redução da abundância relativa de metanotróficas, bem como dos genes marcadores de metanotrofia e aumento do principal marcador molecular de arqueias metanogênicas (*mcrA*) (MEYER et al., 2017; PAULA et al., 2014). Apesar do pH ótimo da maioria das metanotróficas cultiváveis ser neutro (entre 6,8-7,0) (WHITTENBURY; DAVIES; DAVEY, 1970), a larga faixa de pHs onde a oxidação de metano acontece em florestas sugere a presença de uma comunidade diversa atuando no processo (SAARI; RINNAN; MARTIKAINEN, 2004). Também em solos de floresta temperada, o efeito do pH na distribuição de metanotróficas é determinante, onde grupos de gama-proteobactéria são mais frequentemente em solos com pH>6,0 do que em solos ácidos e o oposto para grupos de alfa-proteobactéria (KNIEF; LIPSKI; DUNFIELD, 2003).

A atividade microbiana é uma propriedade importante para o entendimento de processos biogeoquímicos, mas não é simples de acessar, dada a complexidade de interações entre os microrganismos no ambiente. Utilizando técnicas de biologia molecular é possível avaliar moléculas de DNA de microrganismos associados a substratos enriquecidos isotopicamente, após fracionamento por densidade (SIP). Assim, utilizando esta técnica é possível identificar microrganismos que, em meio a comunidade e não isoladamente, incorporam determinado substrato, tornando-o parte de sua biomassa (RADAJEWSKI et al., 2000). Além de identificar quem são, pode-se também quantificar sua abundância a partir de análise do DNA. Para realizar esta técnica, é necessário submeter as amostras a altas concentrações do substrato, de forma que a marcação molecular seja detectável no espaço de tempo do estudo

(NEUFELD et al., 2007). Estas concentrações idealmente devem ser próximas às concentrações a que os microrganismos estão expostos em seu ambiente natural, o que torna o processo complexo para o metabolismo do metano no solo (NEUFELD et al., 2007), já que o solo pode estar sob concentrações que variam de 1,8 ppm (atmosférica) a 14.000 ppm (aterros) (GEBERT; PERNER, 2015). Venturini (2019) observou que solos de pastagem do leste amazônico podem emitir até 6 µg de C-CH₄ por grama de solo se incubados sob saturação de umidade (100%) por 30 dias. Utilizou incubação com potes de fechamento hermético de 1,5 L com 350 g de solo a 25 °C, o que equivale a uma média diária de 46.667 ppm de CH₄. Estes resultados indicam alto potencial de produção de metano por estes solos em condições de saturação de umidade. Sabendo que a oxidação de metano é realizada na natureza por grupos de microrganismos que apresentam alta ou baixa afinidade pelo metano, esta é uma variável importante a ser considerada, já que a incubação por si pode favorecer determinados grupos.

Este trabalho buscou avaliar a atividade metanotrófica de baixa afinidade em solos ácidos de floresta e pastagem na região amazônica, e como respondem à correção de acidez por calagem, identificando quem são os microrganismos ativos.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Descrição dos sítios

Os estudos se deram partindo de solos da Amazônia oriental, na Floresta Nacional do Tapajós e proximidades – Belterra e Santarém/PA (52°25'48"S 54°43'12"W), com coletas realizadas em outubro de 2017 e abril de 2018, respectivamente nas estações seca e chuvosa. A Floresta Nacional do Tapajós é uma área de conservação. A pastagem utilizada foi estabelecida entre 1989-1994, comportando gado no momento da coleta, apresentava sinais esparsos de degradação, sem histórico de uso de calagem, e com queimas sem periodicidade definida apenas para controle plantas invasoras, conforme informações do proprietário. Cinco pontos foram estabelecidos para coleta de solo na camada 0-10cm, separados por 50 m de distância em linha reta. As amostras de solo foram coletadas e transportadas a fresco para análises químicas e experimentação.

4.2.2 Incubação preliminar sob distintas concentrações de $^{12}\text{CH}_4$

Microcosmos foram estabelecidos a partir de solos da coleta de 2017, com solos homogêneos e peneirados a 5 mm. Estes microcosmos foram montados em frascos herméticos de 1,65 L contendo 400 g (peso seco) de solo peneirado (0,5 cm) formando camada de 10 cm, com solos de Floresta Primária e Pastagem acondicionados a 25 °C em estufas BOD, com cinco réplicas. A umidade foi corrigida e mantida constante a 70-80% da capacidade de retenção de água destes solos. Atmosferas artificiais foram estabelecidas a partir da adição de gás $^{12}\text{CH}_4$ de alta pureza (99,5 % - White Martins, Danbury, CN, EUA) com auxílio de seringas de polipropileno nos frascos hermeticamente fechados, gerando concentrações finais aproximadas de metano de 2 (controle atmosférico), 200, 2.000 e 20.000 ppm de $^{12}\text{CH}_4$, com valores de concentração verificados por cromatografia gasosa. O consumo foi avaliado em intervalos semanais, seguido da reposição do $^{12}\text{CH}_4$ consumido.

4.2.3 Correção de acidez

O experimento com correção de acidez foi estabelecido a partir da coleta de 2018 em casa de vegetação na sede do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Universidade de São Paulo (22°42'27.7"S, 47°38'41.0"W), processados de forma similar à descrita no item anterior, porém com correção de acidez e utilizando vasos de 10 L, com aproximadamente 5 kg de solo formando camada de 10 cm. O ajuste de pH se deu com adição de CaCO_3 (PRNT equivalente de 100%) a fim de que todos atingissem pH ~6,0 (água), calculado para 65-75% da Saturação de Bases. A umidade de todos os solos foi padronizada no início do experimento em ~70% da capacidade de retenção de água dos vasos e corrigida a cada dois a quatro dias, tomando como referência a variação de peso após secagem dos solos por 48 h a 75 °C. Após 40 dias da correção de acidez, amostras de solo foram tomadas para preparação da incubação com $^{13}\text{CH}_4$.

4.2.4 Medidas de concentração de CH₄

Para avaliar as concentrações de CH₄, amostras de 5 mL de gás foram extraídas da camada de ar sobre o solo dos microcosmos com auxílio de seringas de polipropileno e injetadas em cromatógrafo gasoso GC SRI 8610C (SRI Instruments, Torrance, CA), equipado com detector FID (Flame Ionization Detector) a 140 °C e com coluna de aço inoxidável e temperatura de forno a 100 °C, previamente calibrado com gases de referência.

4.2.5 Incubação com ¹³CH₄ e fracionamento do DNA

A partir dos resultados da incubação anterior, decidiu-se por utilizar concentrações de ~10.000 ppm na incubação com gás ¹³CH₄ e dos controles ¹²CH₄. Foram utilizados 10 g de solo de floresta e pastagem, com e sem correção de acidez, coletados dos vasos em casa de vegetação, a 70-80% de capacidade de retenção de água em vaso. Para as atmosferas artificiais, foram adicionados 1,4 mL de ¹³CH₄ (99% de pureza - Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, MA, EUA) ou ¹²CH₄ (99,5% de pureza - White Martins, Danbury, CN, EUA) a vidros de 120 mL vedados com tampa de borracha butílica. Os volumes de gás aplicado foram ajustados com auxílio de bolsa plástica evacuada e seringa. A cada microcosmo foram adicionados 20 mL de ar sintético (O₂ + N₂ em concentrações atmosféricas - White Martins, Danbury, CN, EUA) para gerar pressão interna e permitir detecção de possíveis vazamentos. A incubação durou 24 dias, com medidas da variação no consumo de metano e reposição da atmosfera a cada 2-4 dias. As incubações para SIP foram feitas com cinco réplicas, sendo: 5x Floresta-pH natural, 5x Floresta-acidez corrigida, 5x Pastagem-pH natural, 5x Pastagem-pH corrigido, todo o desenho aplicado para incubações com ¹³CH₄ e ¹²CH₄.

A quantidade de ¹³C no ¹³CH₄ aplicada a cada ciclo, de 1,4 mL, se totalmente incorporada à biomassa, permitiria a incorporação aproximada de 50 μmol de ¹³C nas 10 gramas de solo, recomendação mínima de NEUFELD et al. (2007). Como a eficiência de incorporação varia em cada tratamento, 6 ciclos de renovação da atmosfera foram realizados nos 24 dias de experimento.

Para monitorar a incorporação microbiana de isótopos de ¹³C do ¹³CH₄, concentrações de ¹³CO₂ foram avaliadas em dois momentos (14 e 24 dias). A razão

isotópica de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) no dióxido de carbono (CO_2) foi quantificada utilizando um pré-concentrador (PreCon, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas de razões isotópicas (Modelo Delta Plus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) em fluxo contínuo. Uma sub-amostra do gás (de 50-300 μL , dependendo da concentração de CO_2 foi injetada no PreCon onde o gás carreador (Hélio) conduziu a amostra a capilares imersos em nitrogênio líquido para que fosse criogenicamente concentrada. A amostra foi então conduzida por uma coluna cromatográfica de 25 m para separação do CO_2 e N_2O , conforme métodos de análises isotópicas em pequenas amostras de gás (EHLERINGER; COOK, 1998). A composição isotópica do dióxido de carbono ($\delta^{13}\text{C}\text{-CO}_2$) foi expressa em desvio por mil (‰) em relação aos padrões internacionais V-PDB (Vienna PeeDee Belemnite) e a concentração enriquecida calculada a partir da concentração total de CO_2 , medida anteriormente em cromatógrafo gasoso.

4.2.6 Caracterização das propriedades químicas das amostras de solo

Cerca de 600 g de solo foram enviadas para o Laboratório de Análises Químicas do Departamento de Ciência do Solo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), para a análise das suas propriedades físico-químicas, utilizando protocolos em Raij et al. (2001). No laboratório foi realizada a química para fins de fertilidade do solo, que consiste na determinação do pH em CaCl_2 ; Fósforo, Potássio, Cálcio e Magnésio, pela extração em resina trocadora de íons; Alumínio pela extração de Cloreto de Potássio 1 mol/L; acidez potencial acidez potencial estimada pelo pH SMP; matéria orgânica (g/kg) pelo método de dicromato/titulométrico; Boro pela extração com água quente; Cobre, Ferro, Manganês e Zinco extraídos pelo extrator DTPA-TEA (pH 7,3); e dos cálculos Soma de Bases (SB), Capacidade de Troca de Cátions (CTC), V % (saturação por bases) e m % (saturação em alumínio).

4.2.7 Extração de DNA

O DNA total do solo foi extraído com o *PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) a partir de 250 mg de solo, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, exceto que após adição de C1 o tempo de agitação foi de 15 minutos e de centrifugação de 3 min (VENTURINI et al., 2020). A quantidade e

qualidade das amostras de DNA foram analisadas em fluorímetro Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, Walthman, MA, EUA) e espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Walthman, MA, EUA) com densidade ótica de 260 nm. O DNA total extraído das amostras foi armazenado em freezer a - 20 °C.

4.2.8 Fracionamento do DNA por ultracentrifugação

Aos 24 dias da incubação o DNA genômico do solo foi extraído, separado por peso utilizando ultracentrifugação por gradiente de densidade em Cloreto de Césio (1,725 g/mL), e o gradiente resultante fracionado com metodologia adaptada de Neufeld et al. (2007). Para ultracentrifugação, foram utilizados tubos de 2,2 mL lacrados conforme recomendação do fabricante, com 1 µg de DNA em 20 µL (50 ng/µL) e condições de centrifugação de 64.000 rpm a 20 °C por 40 h em ultracentrífuga Beckman Optima TL e rotor TLA-120.2 (Brea, CA, EUA). O fracionamento se deu com auxílio de bomba peristáltica, seringa e aparato de sustentação, coletando 20 frações de 100 µL a partir de furo no fundo do tubo. A densidade nas frações foi avaliada utilizando refratômetro Reichert AR200 (Reichert, Depew, NY, EUA) para verificar formação de gradiente de densidade. A seguir foi realizada a remoção de CsCl e purificação do DNA, por precipitação do DNA com auxílio de poli-acrilamida, lavagens com 2 volumes de polietilenoglicol (6000) e 1 volume de etanol (70%), seguindo o protocolo de Neufeld et al. (2007), exceto no uso de 1µL de acrilamida linear (5 mg/mL) ao invés de glicogênio na etapa de precipitação do DNA. As concentrações de DNA total por fração foram tomadas utilizando fluorímetro Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, Walthman, MA, EUA).

4.2.9 Quantificação de gene marcador para consumo de metano (qPCR)

A técnica de PCR quantitativo foi utilizada para quantificar o número de cópias do gene *pmoA* a partir das amostras de DNA total do solo, utilizando *primers* A189F (5'-GGNGACTGGGACTTCTGG-3'), em Holmes et al. (1995) e MB661R (5'-CCGGMGCAACGTCYTTACC-3'), em Costello e Lidstrom (1999). As condições de reação foram 95 °C por 10 min e 45 ciclos de: 95 °C por 30 s, 58 °C por 30 s e 72 °C por 45 s. Foi construída uma curva padrão entre 10 a 10⁷ cópias, obtida previamente pela técnica de PCR a partir de isolado *Methylosinus sporium*

(DSMZ 17706) adquirido no DSMZ (Deutsch Collection of Microorganism e Cell Cultures, Alemanha). A técnica foi realizada em triplicata para cada amostra no equipamento *StepOne Plus* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), com um volume final de 10 μL , contendo 5 μL do SYBR Green ROX qPCR (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), 1 μL de cada *primer* (5 pmols), 1 μL de DNA (ajustado para 10 ng/ μL), 0,8 μL de albumina bovina (20 mg/mL) (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA) e 1,2 μL de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada.

Com o fim de não inserir viés na análise entre placas e corridas, a quantificação dos genes se deu com auxílio do software LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003), a partir do qual os dados brutos de amplificação de cada amostra foram usados para calcular eficiências individuais de reação, e limites de detecção estabelecidos para cada grupo de réplicas técnicas. Os dados gerados em unidades de fluorescência arbitrária foram convertidos a número de cópias dos genes utilizando interpolação linear entre as quantidades conhecidas na curva padrão (5 pontos) e as medidas de fluorescência observadas, sendo utilizadas as curvas de cada placa como referência para as respectivas amostras.

4.2.10 Sequenciamento de porção do gene 16S rRNA com MiSeq

Para acessar a composição da comunidade microbiana foi utilizada tecnologia de sequenciamento a partir da plataforma MiSeq® Illumina, com kit de 600c e *primers* 515F (PARADA et al., 2016) e 806R (APPRILL et al., 2015) para região V4 do gene 16S rRNA (CAPORASO et al., 2011) no Centro de Genômica Funcional da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Essa escolha se deve à quantidade de *reads* geradas, considerando o ambiente diverso que é o solo, e o tamanho dos *reads paired-end* (média 300pb), que permitiu classificação de metanotróficas em nível de gênero e mesmo espécie, com índice de confiança maior que 80%, como convém para compreender as distinções conhecidas da forma de metanotrofia utilizada. A existência de gene para sMMO, por exemplo, varia no nível de linhagens de tipo II. No preparo da biblioteca gênica, as condições foram: 95 °C por 3 minutos e 25 ciclos de: 95 °C por 30 segundos, 50 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e extensão final a 72 °C por 5 minutos. As concentrações de DNA nas amostras foram ajustadas para 10 ng/ μL utilizando espectrofotômetro Nanodrop 2000c e as reações de PCR com *buffer* 10x – 2,5 μL , MgCl 50 mM – 1 μL , dNTPs 10mM – 1 μL , *Forward Primer*

10 μ M – 0,5 μ L, *Reverse Primer* 10 μ L – 0,5 μ L, *Taq Platinum* 5 U/ μ L – 0,5 μ L PCR e água para PCR – 14 μ L, num volume total de 25 μ L por reação. Após a PCR, foi feita purificação do DNA com *beads AMPure XP* (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA) e verificação em gel de agarose. A segunda PCR foi feita de forma similar, porém para adicionar os adaptadores, seguida por outra purificação com *beads AMPure XP* e verificação em gel de agarose. O *pool* dos *amplicons* (para cada *primer*) foi feito a partir de volumes iguais dos *amplicons* normalizados utilizando quantificação por qPCR com o *kit* KAPA de quantificação de bibliotecas Illumina (Roche, Basileia, Suíça). O processamento computacional desses dados foi realizado utilizando QIIME2 2019.10 (BOLYEN et al., 2019), com controle de qualidade dos dados utilizando ferramenta DADA2 (CALLAHAN; MCMURDIE; HOLMES, 2017), sem clusterização em OTUs, e identificação taxonômica das sequências utilizando q2-feature-classifier (BOKULICH et al., 2018) utilizando banco de dados do SILVA versão 132 99% (QUAST et al., 2013).

4.2.11 Análises filogenéticas

Árvores filogenéticas foram geradas utilizando a informação nas sequências de DNA dos fragmentos do gene 16S *rRNA* em estudo. As sequências foram alinhadas e agrupadas em árvores utilizando software CLC Genomics Workbench 20.0 (QIAGEN, Aarhus, Denmark) e parâmetros *default*, por modelo de máxima verossimilhança (função PHYML) com *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean* (UPGMA) e assumindo frequências de substituição comum às bases (KIMURA, 1980), testados ao fim em simulação com 1.000 *bootstraps*. As sequências de referência da família Beijerinckiaceae foram obtidas no banco de dados curado RDP versão 11 (COLE et al., 2014), somente as maiores que 1.200 pb de boa qualidade e referências de microrganismos tipo, sendo cortadas de acordo com os conjuntos de *primers*. A única sequência do gene 16S *rRNA* disponível para uma bactéria metanotrófica USC α também foi utilizada (PRATSCHER et al., 2018).

4.2.12 Análises estatísticas

Para análise de diferenças significativas com os dados de qPCR e de consumo de CH₄ foi utilizada análise de variância (ANOVA) e teste *post hoc* de Tukey HSD

(Honestly Significant Difference) bicaudal pelo pacote *agricolae* versão 1.2-8 com software R Studio (R Core Team, 2013). Análise de redundância (RDA) foi aplicada combinando os dados da comunidade microbiana (abundância e composição) com os dados da caracterização química do solo utilizando software CANOCO 5.0 (SMILAUER; LEPS, 2014) utilizando parâmetros *default*.

Para os dados resultantes do sequenciamento em larga escala foi utilizada, no ambiente QIIME2 2019.10, a ferramenta ANCOM, que compara abundância relativa de cada ASV (Amplicon Sequence Variant) ou taxa entre dois grupos por razões logarítmicas (MANDAL et al., 2015). ANCOM gera *volcano plots*, que apresentam no eixo X do gráfico a razão logarítmica centralizada e no eixo Y um indicador adimensional W, que representa o número de vezes que a hipótese nula (a abundância média de uma ASV em um grupo é igual à de outro grupo) foi rejeitada para uma dada ASV.

4.2.13 Análise de abundância diferencial entre grupos bacterianos

Com o fim de excluir microrganismos com abundância relativa aumentada na região de DNA de alta densidade por outra razão que não a incorporação de ^{13}C , condições foram estabelecidas (Figura 1). A primeira condição foi que I) a sequência ASV estivesse enriquecida na região de alta densidade da incubação com $^{13}\text{CH}_4$ em relação à região de alta densidade da incubação $^{12}\text{CH}_4$. Esta condição assumia que a concentração inicial de DNA era a mesma em todos os fracionamentos e que o aumento na abundância na incubação ^{13}C em relação a ^{12}C indicava incorporação de ^{13}C . A condição seguinte II) estabelecia que a ASV não podia estar enriquecida em H na incubação ^{12}C . Do contrário seu enriquecimento poderia ter sido devido a outros fatores como conteúdo GC na sequência. Apenas as ASVs que cumpriram as duas condições foram reconhecidas como ativas na incorporação de ^{13}C .

A condição de enriquecimento na fração de alta densidade em relação à de baixa densidade na incubação com $^{13}\text{CH}_4$ foi utilizada como critério complementar. Esta decisão se baseou no fato de que não é possível, através da análise de DNA, separar ASVs provenientes de células vivas, dormentes ou mortas. A incubação teve uma duração curta (24 dias), e seria possível haver mais DNA de células metanotróficas dormentes/mortas na porção leve do que na fração pesada,

enriquecida em ^{13}C , o que poderia gerar um resultado falso negativo de não atividade de incorporação de ^{13}C .

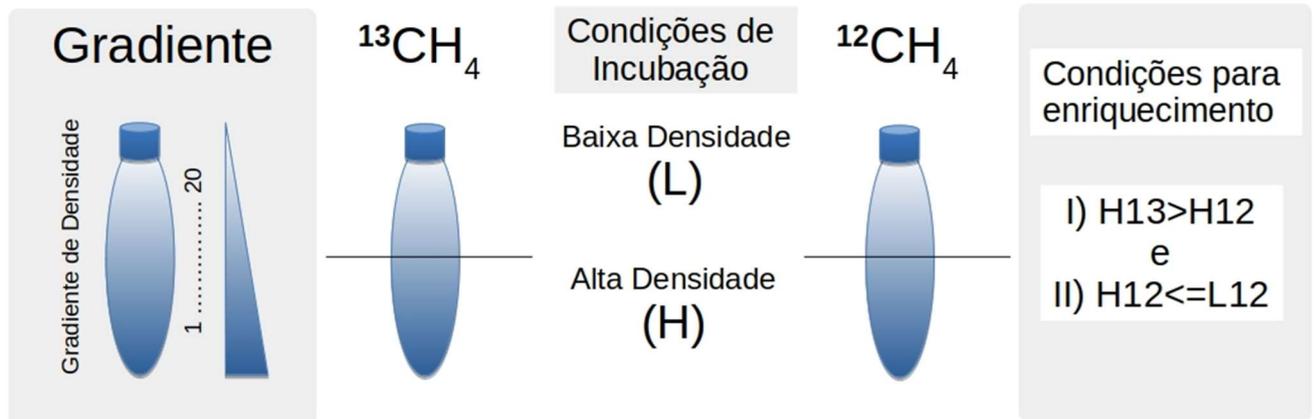


Figura 1 - representação esquemática das condições estabelecidas *a priori* para análise de resultados do experimento com SIP. A abundância relativa das ASVs das diferentes regiões de densidade (baixa ou alta) foi avaliada segundo estes critérios, que quando atendidos permitiram classificar as sequências de DNA como enriquecidas ou não em ^{13}C e, portanto, indicativas de atividade de assimilação de ^{13}C .

Ainda como critério de qualidade do fracionamento foi avaliada a razão GC dos genomas de microrganismos enriquecidos nas frações de alta e baixa densidade. Para isto, as ASVs enriquecidas significativamente nas frações leve e pesada + muito pesada foram agrupadas em suas categorias. Em seguida os genomas completamente sequenciados com afiliação filogenética mais próxima possível a cada ASV foram consultados na base de dados de genomas do NCBI (National Center for Biotechnology Information). A informação de conteúdo GC desses genomas referência foi utilizada como representativa para as ASVs identificadas e então a diferença entre os conjuntos baixa x alta densidade foi comparada por ANCOM.

4.3 Resultados

A resposta de solos de floresta e pastagem amazônicas a diferentes concentrações atmosféricas de metano é uma questão em aberto, importante para o entendimento de como os microrganismos nestes solos podem responder a situações sob altas concentração de metano. Visando compreender como a dinâmica de incorporação de metano sob altas concentrações muda nestes solos em espaço curto de tempo (24 dias), o experimento 1 (preliminar) foi elaborado. Nele observou-se que a capacidade dos solos em sequestrar metano sob concentrações atmosféricas

(~2 ppm) foi reduzida em mais de 20% em 7 dias (Figura 2). A capacidade de incorporar metano sob concentrações de 200 ppm e 2.000 ppm foi similar em ambos os solos e em solo de pastagem, a taxa de consumo médio de metano sob 200 ou 2.000 ppm foi a mesma, entre 35 e 45%, dobrando após 7 dias (Figura 2). Em solos de floresta, houve uma tendência de aumento na ordem de 100% a 200% após 7 dias (Figura 2). O consumo médio de metano nos dois solos foi similar, variando de acordo com as concentrações estudadas e mostrando que houve uma adaptação no solo, exceto quanto à concentração de 20.000 ppm em solo de floresta, que se manteve baixa nos 24 dias (Figura 2).

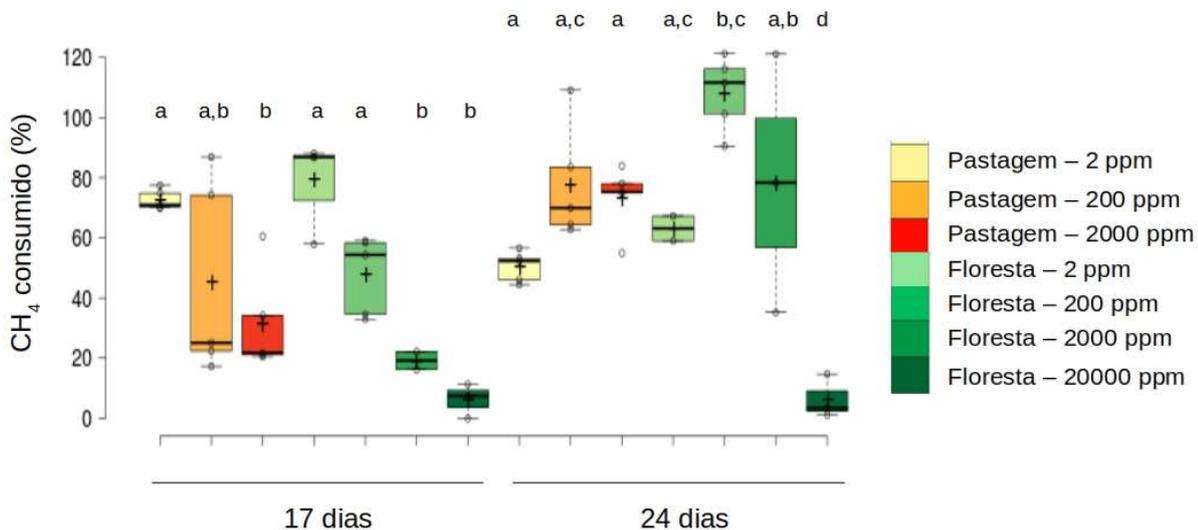


Figura 2 - percentual de $^{12}\text{CH}_4$ oxidado no solo sob diferentes concentrações do gás em solos de Pastagem (P) e Floresta (FP) de Santarém-Belterra/PA em intervalos de quatro dias. “+” indicam médias e letras diferenças significativas entre grupos, nos tempos 17 e 24 dias respectivamente (Tukey HSD; $p < 0,05$). P- 2 ppm, P- 2.000 ppm, FP- 2 ppm e FP- 200 ppm mudaram significativamente entre 17 e 24 dias (Tukey HSD; $p < 0,05$)

Com resultados deste experimento, decidiu-se para a incubação seguinte, com substrato $^{13}\text{CH}_4$, uma concentração de 10.000 ppm, alta o bastante para observar incorporação de ^{13}C ao DNA no período de incubação, e intermediária entre o resultado com consumo satisfatório (2.000 ppm) e insatisfatório (20.000 ppm). Esta segunda incubação se deu com solos corrigidos em acidez por adição de CaCO_3 40 dias antes de seu início. A calagem demonstrou resultados satisfatórios, com redução da acidez potencial e do Alumínio total e aumento do conteúdo de Cálcio e do pH (Tabela S1 e Figura S1).

Utilizando solos de floresta e pastagem ácidos e corrigidos em acidez, a incubação demonstrou uma capacidade crescente de consumo de metano pelo solo em todas as situações, exceto em relação ao início do experimento, em que houve queda entre os dias 9 e 13. No entanto, o consumo foi maior nos dois solos com correção de acidez, sendo que houve consumo de todo o metano aplicado desde o início em solos de pastagem com pH corrigido a 5,8 (Figura 3).

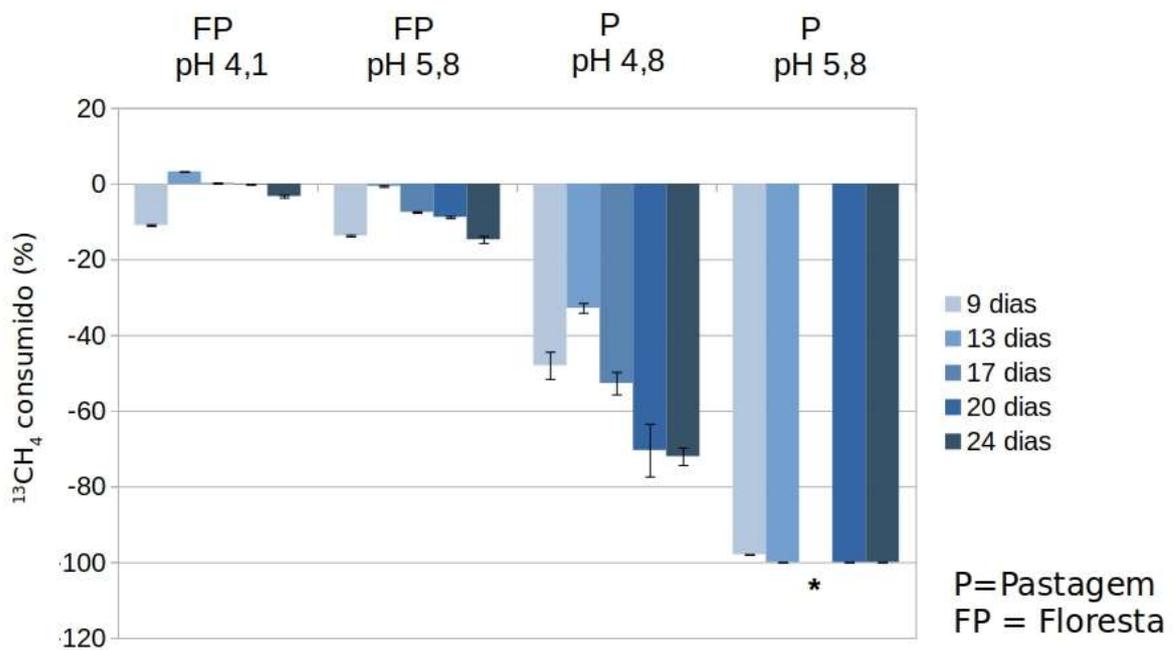


Figura 3 - percentual de oxidação de $^{13}\text{CH}_4$ (~10.000 ppm iniciais) por solos de floresta e pastagem com e sem correção de acidez após ciclos de incubação de 3-4 dias. * ausência de dados. Barras indicam desvio padrão. Valores de pH em água

Buscando estimar quanto do ^{13}C no metano oxidado foi incorporado à biomassa microbiana, a razão de $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ na atmosfera do microcosmo após a incubação foi avaliada e analisada junto aos dados de concentração de $^{13}\text{CH}_4$. Não foram observadas diferenças na emissão de $^{13}\text{CO}_2$ entre os tratamentos com e sem correção de acidez de cada solo (Figura 4), apesar de haver diferença na oxidação de metano (Figura 3). A maior incorporação aconteceu no solo de pastagem com correção de acidez, seguida pelo solo ácido de pastagem e solo de floresta com correção de acidez. Menos de 5% do ^{13}C foi incorporado à biomassa no solo de floresta ácido, contra mais de 70% em solo de pastagem com acidez corrigida (Figura 4).

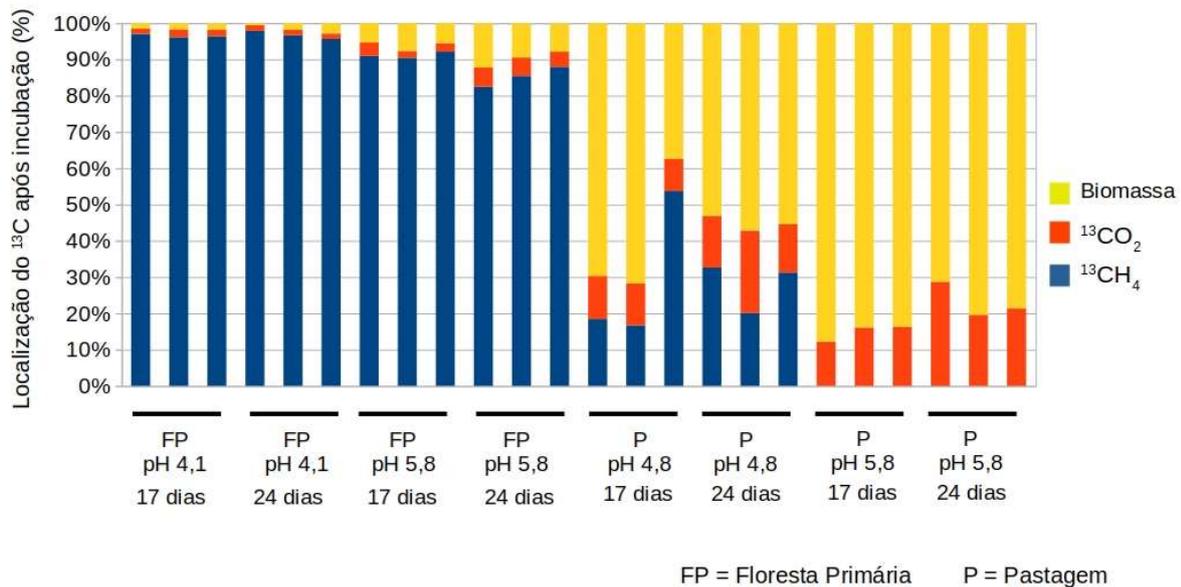


Figura 4 - estimativa do percentual de ^{13}C incorporado à biomassa microbiana no solo partindo da concentração inicial de $^{13}\text{CH}_4$ nos microcosmos e subtraindo as concentrações de $^{13}\text{CH}_4$ e $^{13}\text{CO}_2$ restantes após 4 dias, em dois momentos da incubação (17 e 24 dias)

Após verificação da incorporação de ^{13}C na biomassa microbiana, foi realizada a extração do DNA do solo, separação do DNA por gradiente de densidade e fracionamento. O fracionamento do DNA resultou em três regiões entre as frações, denominadas a partir daqui de muito alta (VH), alta (H) e baixa densidade (L) (Figura 5). A fração número 11 foi definida como divisor das frações de baixa densidade e, quando houve DNA suficiente, uma segunda divisão entre alta e muito alta densidade foi realizada na fração 6. As frações de muito alta densidade foram obtidas somente nos solos de pastagem (Figura S2).

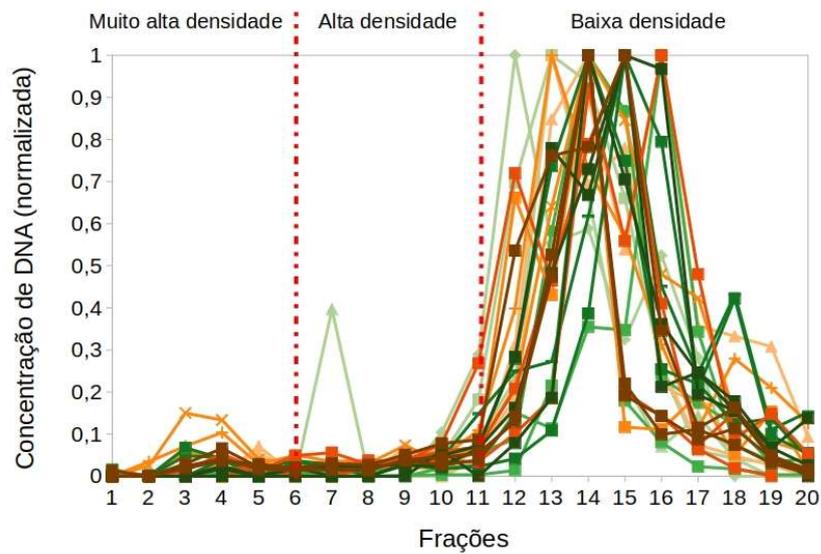


Figura 5 - distribuição do DNA em todas as amostras após fracionamento destacando as regiões por densidade definidas como: muito alta (1-6), alta (7-11) e baixa densidade (12-20). Concentração de DNA normalizada (razão) em relação à maior concentração observada em cada amostra. Tons de laranja são amostras de pastagem e tons de verde de floresta

Quanto ao conteúdo GC estimado nos genomas dos microrganismos enriquecidos nas frações de maior ou menor densidade, observou-se diferenças significativas, sendo que o conteúdo GC na fração de maior densidade foi em média 15% maior (Figura 6).

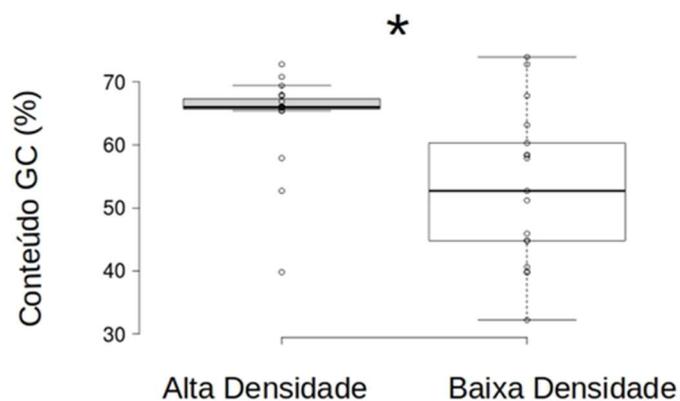


Figura 6 - conteúdo GC de genomas representativos das sequências (ASVs) diferencialmente abundantes nas regiões de alta (H+VH) e baixa densidade (L). Inclui dados de todos os tratamentos (Floresta e Pastagem com pH natural e calagem). * Tukey HSD; $p < 0,01$

A seguir, a abundância de bactérias metanotróficas foi avaliada por quantificação do número de cópias do gene *pmoA* nas frações de alta e baixa densidade entre as incubações com $^{12}\text{CH}_4$ e $^{13}\text{CH}_4$. Não se observou enriquecimento significativo nos solos de floresta com ou sem correção de acidez. Quanto aos solos de pastagem, no entanto, em ambas situações houve enriquecimento, sendo esta maior em solos de pastagem com correção de acidez (Figura 7).

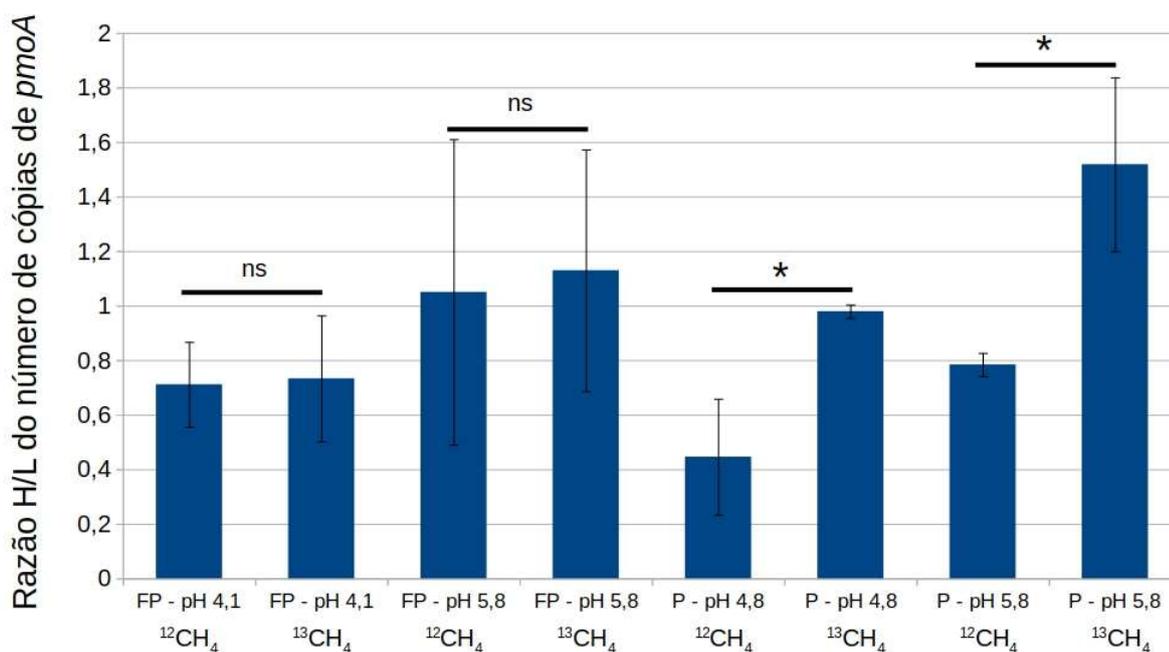


Figura 7 - razão do número de cópias do gene *pmoA* entre as frações de alta densidade (1-11) e baixa densidade (12-20) nas incubações com $^{12}\text{CH}_4$ e $^{13}\text{CH}_4$. * indicam diferenças significativas (Tukey HSD; $p < 0,05$) e ns = não significativo. FP = Floresta e P = Pastagem. Medidas de pH em água

Confirmado o enriquecimento de bactérias metanotróficas após fracionamento, procedeu-se sequenciamento de alto rendimento de fragmento do gene 16S *rRNA* para identificação dos microrganismos. Os resultados de sequenciamento mostraram uma profundidade de sequenciamento adequada, com saturação das curvas de rarefação abaixo da profundidade de sequenciamento mínima (Tabela S2, Figura S3). Detendo a informação taxonômica, foi possível comparar as regiões enriquecidas em DNA com isótopos ^{13}C na incubação $^{13}\text{CH}_4$ (H13) com a região densa na incubação com $^{12}\text{CH}_4$ (H12), que indicou os grupos ativos na incorporação de ^{13}C . A fim de garantir que estes grupos não estariam enriquecidos na região de alta densidade por outras razões que não a incorporação de ^{13}C , os grupos taxonômicos enriquecidos

nesta análise não poderiam ser observados como enriquecidos na região H12 em relação à região L12 (Figura 1). Ao fim, não foram observadas diferenças significativas (H13 x H12) nos solos de floresta, ou no solo de pastagem sem correção de acidez. No entanto, foram detectadas ASVs enriquecidas no solo de pastagem com correção de acidez (H13 x H12), confirmado também que não houve diferenças no controle (L12 x H12) (Figuras 8 e S4). *Methylocaldum spp.* (metanotrófica tipo I) foi um dos microrganismos ativos na incorporação de metano após correção de acidez em solos de pastagem. Outras duas ASVs de microrganismos ativos na oxidação de metano foram identificadas como Beijerinckiaceae (metanotrófica tipo II).

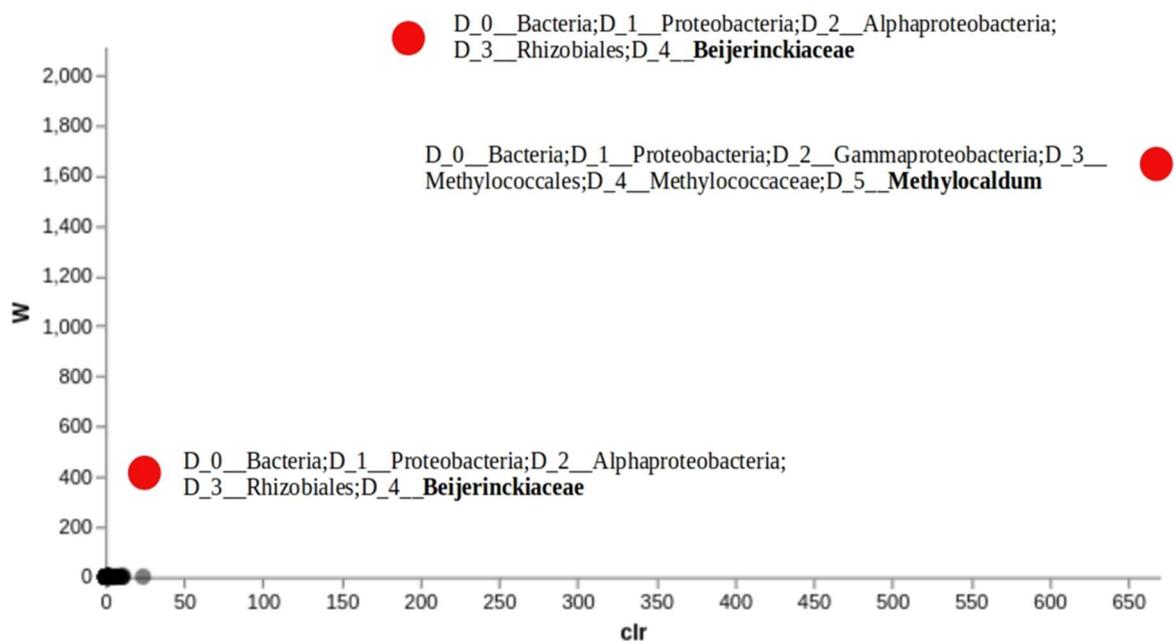


Figura 8 - ASVs nos solos de pastagem com correção de acidez (pH 5,8) nas frações Pesadas + Muito Pesadas (H) nas incubações com $^{12}\text{CH}_4$ vs $^{13}\text{CH}_4$. CLR (Centered Log Ratio) indica quanto um grupo é enriquecido em relação à abundância relativa média da ASV e W quanto essa observação é consistente, em relação às demais ASVs identificadas. Quanto maiores os valores de W e clr, maior e mais consistente a diferença de abundância relativa. ASVs enriquecidas em ^{13}C são destacados em vermelho. Todas as demais ASVs encontram-se na base do gráfico, entre clr 0-50

As ASVs identificadas como Beijerinckiaceae foram submetidas a análise filogenética junto às demais sequências de alta qualidade disponíveis em banco de dados curado para esta família bacteriana. Não houve resolução filogenética para identificar com qual dos gêneros nesta família as duas ASVs apresentam maior proximidade, no entanto foi possível observar que se tratam de um

agrupamento taxonômico muito próximo, provavelmente um mesmo gênero, e que este se encontra junto aos gêneros caracterizados como metanotróficos na família (Figura 9).

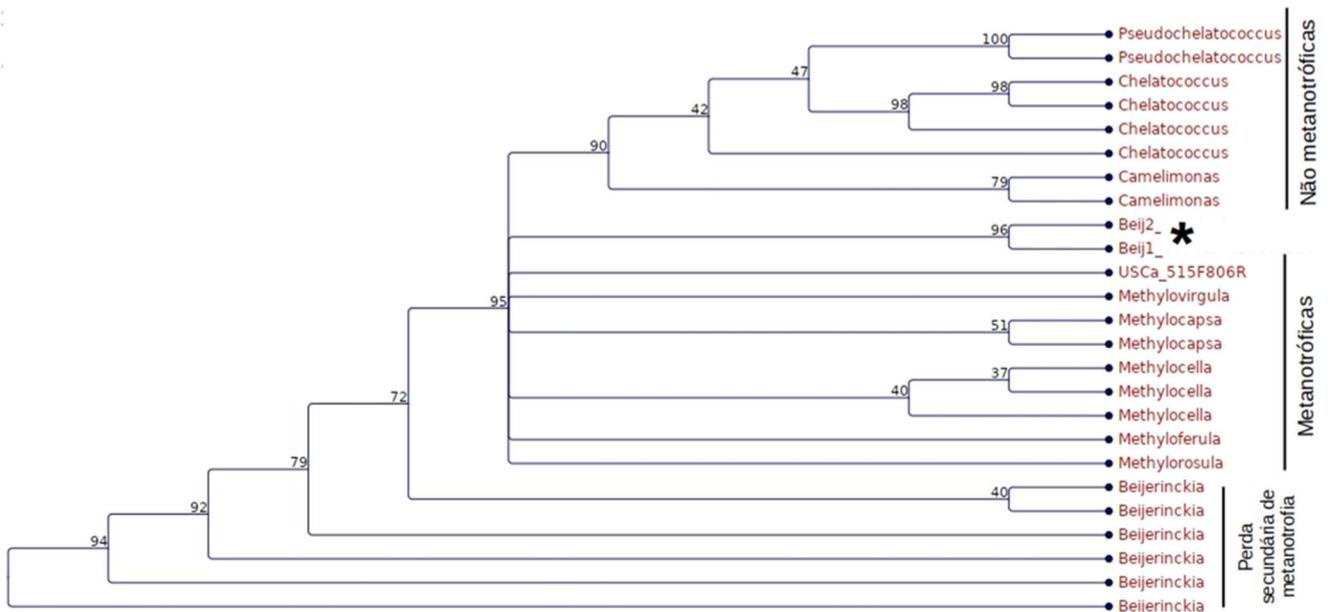


Figura 9 - árvore filogenética construída com fragmentos de sequência do gene 16S *rRNA* (região V4; iniciadores 515F/806R) das ASVs identificadas no estudo com SIP (Beij1 e Beij2) e sequências de referência para a família Beijerinckiaceae obtidas em banco de dados RDP versão 11. Números indicam valor de *bootstrap* após 1000 simulações e nós definidos com sustentação mínima de 35%

A abundância relativa das duas ASVs de Beijerinckiaceae é duas a três vezes maior que de *Methylocaldum spp.* em solos de pastagem com acidez corrigida, e há tendência deste aumento também em solos de pastagem sem correção de acidez, apesar de não significativo em análise ANCOM (Figura 10).

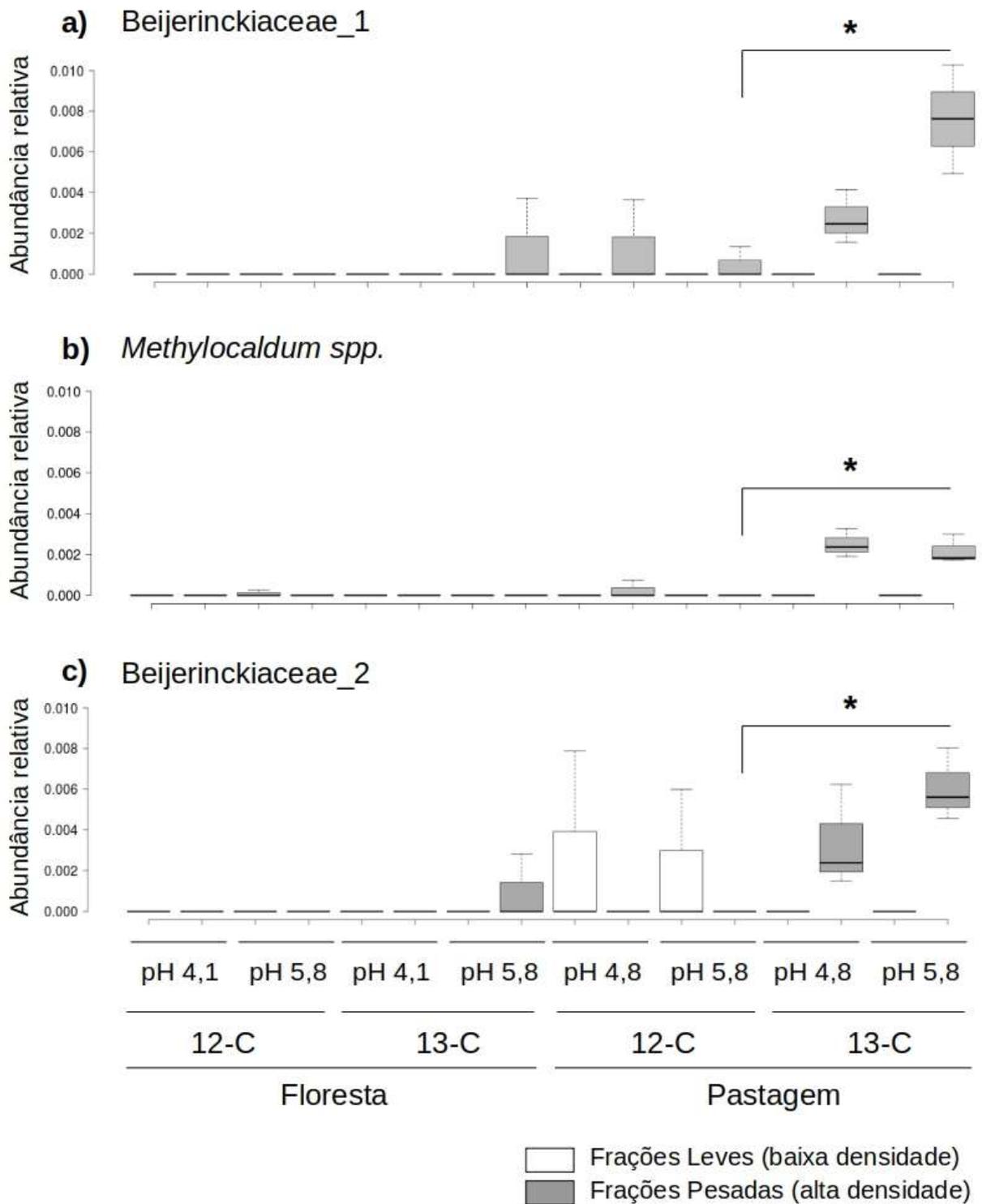


Figura 10 - abundância relativa de ASVs de (a, c) Beijerinckiaceae e (b) *Methylocaldum* spp. entre frações pesadas (H) das incubações com $^{12}\text{CH}_4$ e $^{13}\text{CH}_4$. * indicam diferenças significativas (Tukey HSD; $p < 0,05$)

A seguir as regiões H13 x L13 foram comparadas em solos de floresta com acidez corrigida. Essa análise, ainda que apresente menor poder de detecção, pode trazer informações complementares. Nesta abordagem, quando a abundância de microrganismos ativos não ultrapassa a abundância de células inativas ou mortas já existente no solo, eles não serão detectados. Os resultados mostram três taxons com incorporação direta ou indireta de ^{13}C , que são *Nitrososphaeraceae*, *Lysobacter spp.* e *Acidothermus spp.* (Figura S5). Essas ASVs são significativamente distintas entre H13xL13 em análise de ANCOM, mais abundantes em H13 que L13 e sem alterações na incubação com $^{12}\text{CH}_4$ (H12xL12), além de possuírem *W* maior que 10, no mínimo. A abundância relativa de ASVs de *Nitrososphaeraceae* chegam a ser 5 vezes mais abundantes na região enriquecida em ^{13}C , com menor enriquecimento para *Lysobacter spp.* e *Acidothermus spp.* (Figura S6).

Por fim, um pico inesperado foi observado na distribuição do DNA após fracionamento nas frações muito pesadas (VH) em solos de pastagem com correção de acidez incubados com $^{12}\text{CH}_4$ (Figura S2-d). O DNA fracionado desta região foi sequenciado e as ASVs comparadas com as encontradas na região mais leve das mesmas amostras. Foi observado o enriquecimento significativo de ASVs de *Rudaea sp.* em amostras de solo de pastagem com correção de acidez (Figura S7), sendo este enriquecimento maior do que 5x, e o grupo também presente na incubação com $^{13}\text{CH}_4$, porém distribuído entre as frações definidas por alta e muito alta densidade (Figura S8).

4.4 Discussão

A oxidação de metano no solo pode ocorrer com alta afinidade, capaz de incorporar baixas concentrações do gás, e baixa afinidade, sob altas concentrações (BENDER; CONRAD, 1992). Como um mesmo solo pode ter taxas de consumo variável com a concentração de metano a que está exposto, a utilização de 10.000 ppm realizada neste trabalho pode gerar uma pressão de seleção por uma resposta de baixa afinidade. Em solos de floresta temperada a alta afinidade pode acontecer até 500 ppm e a baixa afinidade até 30.000 ppm (REAY; NEDWELL, 2004). Neste estudo, solos ácidos de floresta tropical foram capazes de oxidar 80% do metano aplicado sob 2.000 ppm, num intervalo de quatro dias e após aclimatados por 24 dias. Pastagens tiveram desempenho similar aos solos de floresta até esta mesma

concentração. Isto indica que a alta afinidade de solos de floresta tropical, já observada em solos de Terra Preta na região Amazônica (LIMA; MUNIZ; DUMONT, 2014), pode saturar em valores maiores que os 500 ppm observados para solos de floresta temperada (REAY; NEDWELL, 2004).

No intervalo entre 14 e 24 dias de incubação, aconteceu uma redução da capacidade de sequestro dos dois solos sob 2 ppm, que pode estar associada a uma situação de inanição de metanotróficas, como observado em estudo de solos de floresta temperada submetido a concentrações tão baixas como 0,03 ppm de metano (SCHNELL; KING, 1995). Isso porque a atmosfera da incubação foi repostada somente no início de cada ciclo de quatro dias, sendo o metano consumido e a comunidade exposta por algum período deste intervalo a concentrações menores que as atmosféricas. Os microrganismos metanotróficos não utilizam outras fontes de Carbono além do metano atmosférico (HANSON; HANSON, 1996; KNIEF, 2015).

Na faixa de incubação de 2.000 ppm após 24 dias de incubação, a taxa de consumo é similar à observada aos 17 dias sob 2 ppm, nos dois tipos de solo. Isso difere do observado em solos de floresta temperada incubados sob 1.000 ppm, em que a taxa pode ser 100 vezes maior do que sob concentrações atmosféricas (SCHNELL; KING, 1995). Sob 20.000 ppm há redução significativa da taxa de consumo em solo de floresta, o que indica que a comunidade que oferece baixa afinidade ao solo tem pouca presença/atividade nestas condições. A incubação com ^{13}C a 10.000 ppm evidenciou que o sequestro em solos de pastagem chega a ser 5x maior do que observado em floresta, um indicador de que as comunidades nos dois tipos de solo podem ter uma ação e/ou composição distintas, quanto a sua afinidade pelo metano. E somado a isto, a correção de acidez em ambos os solos leva a maior capacidade de sequestro de metano, o que indica a presença de uma comunidade metanotrófica de baixa afinidade latente, que pode ser estimulada por correção de acidez.

O efeito da correção de acidez do solo por calagem sobre a ciclagem de metano é pouco compreendido, gerando uma tendência ao aumento da oxidação de metano em solos temperados (KUNHIKRISHNAN et al., 2016), mas com poucos trabalhos disponíveis sobre solos tropicais, e resultados indicando ausência de impacto (LAMMEL et al., 2018; MOSIER; DELGADO; KELLER, 1998). Quanto a solos temperados de florestas e agricultura, há registro tanto de redução (BORKEN; GRÜNDEL; BEESE, 2000; BUTTERBACH-BAHL; ROTHE; PAPEN,

2002), quanto de aumento do consumo de metano (BARTON; MURPHY; BUTTERBACH-BAHL, 2013; GARCÍA-MARCO et al., 2016; HÜTSCH; WEBSTER; POWLSON, 1994). Resultados preliminares desta pesquisa (capítulo 1) demonstram que a calagem de solos da região amazônica pode reduzir o consumo de metano em solos de floresta e pastagem sob concentrações atmosféricas (alta afinidade). Como não foram observadas alterações significativas de abundância de microrganismos associados à ciclagem de metano, tanto de produtores quanto de consumidores (capítulo 1), este estudo com SIP buscou avaliar a atividade dos microrganismos que oxidam metano. Observou-se resposta distinta da vista anteriormente, com aumento do sequestro de metano seguindo a correção de acidez, desta vez, porém sob altas concentrações do gás (baixa afinidade). Os resultados dos experimentos sob alta e baixa concentração de metano são distintos mas compatíveis, já que os mesmos solos podem apresentar dinâmicas distintas sob diferentes concentrações do gás (REAY; NEDWELL, 2004).

Corrigir a acidez de solos de pastagem leva a aumento da capacidade de oxidar metano nas condições do estudo, uma capacidade que é de 5-10 vezes maior do que a de solos ácidos de floresta. Em solos de floresta temperada, a indução máxima de oxidação de metano sob 100.000 ppm tem ótimo de pH próximo a 7,0 (BENDER; CONRAD, 1995), sendo até 3 vezes maior do que sob pH natural. Esse resultado gerou expectativa de que os solos de floresta tropical também poderiam ter resposta similar após correção de acidez, o que não foi observado. Utilizando marcação isotópica, estimou-se que os solos foram capazes de incorporar à biomassa, num mesmo espaço de tempo, 80% do metano aplicado ($^{13}\text{CH}_4$) em pastagem com acidez corrigida e 50% em solos ácidos de pastagem, contra menos de 5% em solos de floresta ácida e 10% após acidez corrigida. Tais resultados demonstram a importância do pH do solo como modulador da atividade metanotrófica, já reconhecida para solos de floresta temperada (AMARAL; REN; KNOWLES, 1998). Nos mesmos solos de floresta temperada, foi observado que o ótimo de consumo sob concentrações atmosféricas se encontra na própria faixa natural de pH, decaindo tanto com aumento quanto com sua redução (AMARAL; REN; KNOWLES, 1998). Isto pode explicar o porquê dos solos de floresta perderem capacidade de oxidação ao aumento do pH sob concentrações atmosféricas (capítulo 1).

A ultracentrifugação seguida de fracionamento do DNA extraído desses solos permitiu identificar uma região de baixa densidade, em que se encontra quase todo o

DNA de ambas incubações ($^{12}\text{CH}_4$ e $^{13}\text{CH}_4$), e uma região com pouco DNA e maior densidade. Em incubações com alta incorporação de ^{13}C no DNA da comunidade, se esperaria um pico de DNA na região de alta densidade das amostras incubadas com ^{13}C , e a ausência deste nas amostras incubadas com ^{12}C . Por exemplo, este pico poderia ser observado em incubações com substratos usados por ampla porção da comunidade microbiana, como ^{13}C -glicose. Mas para substratos de uso por guildas especializadas como ocorre com a ^{13}C -celulose, a incorporação de ^{13}C pode não marcar DNA suficiente para uma detecção fora da margem de erro da fluorimetria. Resultados que ilustram este efeito podem ser vistos em López-Mondéjar et al. (2018). Outro indicador de qualidade do fracionamento está na distribuição do DNA por composição GC dos genomas entre as regiões de alta e baixa densidade. A separação do DNA ambiental por gradiente de densidade gera um gradiente de razão GC/AT e há uma tendência de genomas com maior conteúdo GC serem encontrados na região densa independente da incorporação de isótopos ^{13}C (DUMONT; MURRELL, 2005). Se o fracionamento aconteceu de acordo com o esperado, espera-se que a razão GC nas sequências de DNA na fração mais densa seja mais alta que na fração leve. No entanto, este efeito deve acontecer de forma similar no controle ^{12}C , à medida que o conteúdo GC nas duas situações seria equivalente. Assim, analisando os resultados de ambas incubações é possível excluir os grupos enriquecidos por conteúdo GC ou outros fatores e não por incorporação de ^{13}C . Os resultados do trabalho demonstraram um enriquecimento significativo de microrganismos com conteúdo GC elevado nas frações mais densas, em relação às menos densas.

Ainda quanto à distribuição do DNA total entre as frações por densidade, foi detectado um pico na região mais densa em amostras de pastagem com acidez corrigida, consistente entre as três réplicas. Este pico é inesperado, por ocorrer entre amostras incubadas com $^{12}\text{CH}_4$, e após análise de abundância diferenciada das sequências de DNA, um único gênero de bactérias foi detectado enriquecido, *Rudaea* sp. Este gênero é parte das gama-proteobactéria, família Rhodanobacteraceae. *Rudaea cellulosilytica* é a única espécie caracterizada com isolado, um microrganismo flagelado e capaz de degradar celulose, com pH ótimo de crescimento entre 6 e 8 e conteúdo GC do genoma em 63,8% (PEDRON et al., 2019; WEON et al., 2009). Possivelmente a *Rudaea* sp. identificada neste estudo compartilha características com este isolado, a capacidade de degradar celulose seria uma vantagem no solo de

pastagem, e as condições de pH do solo propícias (6,0) e o alto conteúdo GC a razão para o pico de DNA na região de alta densidade.

O aumento da abundância de metanotróficas ativas aconteceu somente nos solos de pastagem, com e sem correção de acidez. Isto indica que não houve marcação adequada de metanotróficas em solos de floresta, resultado esperado dada a baixa incorporação de ^{13}C à biomassa nestes solos e ausência de aumento na razão H/L do gene *pmoA*. No entanto, esta avaliação de abundância absoluta considerou somente as metanotróficas detentoras do gene *pmoA* e outros microrganismos capazes de utilizar CH_4 atmosférico como fonte de carbono e que não possuam este gene, como ocorre com oxidadores de amônia, não seriam detectados (BÉDARD; KNOWLES, 1989). A razão do não enriquecimento de metanotróficas em solos de floresta pode estar associado ao tempo de incubação, de 24 dias neste experimento. Utilizando solos da mesma região, sem homogeneização, Kroeger et al. (2020) realizaram incubação com atmosfera a 30.000 ppm de $^{13}\text{CH}_4$ e duração de sete meses, atingindo enriquecimento de metanotróficas em solos de floresta. No entanto, partindo de solos de floresta no oeste amazônico enriquecidos com meio mínimo mineral e sob atmosfera de 100.000 ppm de $^{13}\text{CH}_4$, Tessaro (2012) observou consumo total do metano adicionado em intervalos de 60h de incubação.

Dois táxons de bactérias foram identificados como ativos em solos de pastagem com correção de acidez. Estão também presentes em solos de pastagem naturais, mas em menor abundância e seu enriquecimento não foi significativo. O primeiro grupo é composto por duas ASVs distintas, o que pode indicar mais de um gênero ou espécie, e só foram identificados até o nível de família como Beijerinckiaceae. Ambos têm relação filogenética próxima com as metanotróficas conhecidas nesta família. Estes foram detectados em solos de floresta após correção de acidez, porém sem incremento significativo. O segundo grupo é composto pelo gênero *Methylocaldum* sp. que compõe metanotróficas do tipo I, possui pelo menos quatro espécies isoladas, 3 de ambientes aquáticos/sedimentos e uma de solo agrícola e é comumente detectado em solos, inclusive em aterros (KNIEF, 2015). Beijerinckiaceae são metanotróficas de tipo II, com algumas exceções no gênero *Beijerinckia*, uma família que agrupa gêneros com papel metanotrófico reconhecido em solos de floresta, com as linhagens cultivadas moderadamente acidofílicas (KNIEF, 2015). Um gênero de Beijerinckiaceae, *Methylocella silvestres*, foi detectado em solos de pastagem ácidas da mesma região por Kroeger et al. (2020), porém sem

registro de *Methylocaldum* sp. Já Tessaro (2012) detectou presença de *Methylocaldum* sp. em amostras de floresta e pastagem no oeste amazônico, mas não de Beijerinckiaceae. *Methylocaldum* sp. foi o gênero mais representativo dos microrganismos ativos na oxidação de metano em experimento com águas residuais de extração de petróleo, com pH médio de 8,0 e incubados sob 10.000 ppm de metano (SAIDI-MEHRABAD et al., 2013). Esses resultados indicam que *Methylocaldum* sp. é um gênero metanotrófico cosmopolita e de baixa afinidade, que existe em baixa abundância em solos de pastagem ácida e que tem sua atividade aumentada após correção de acidez e exposição a concentrações altas de metano. Isso condiz com o que se sabe sobre metanotróficas de tipo I serem de baixa afinidade, enquanto metanotróficas de tipo II são normalmente caracterizadas por alta afinidade (abaixo de 40 ppm de metano) (SZAFRANEK-NAKONIECZNA et al., 2019).

Por fim, uma análise complementar permitiu detectar a atividade de microrganismos capazes de utilizar metano em solos de floresta sob correção de acidez, ou substratos secundários a este. Houve aumento da abundância relativa de três táxons, considerando a fração densa em relação à fração leve das amostras incubadas com $^{13}\text{CH}_4$. E estes não variaram na incubação controle com $^{12}\text{CH}_4$, o que indica que tiveram incorporação de ^{13}C . Os grupos detectados foram identificados como Nitrososphaeraceae, *Lysobacter* sp. e *Acidothermus* sp. O primeiro, parte do filo de arqueias Thaumarchaeota, é uma família de microrganismos associada à oxidação de amônia (PESTER; SCHLEPER; WAGNER, 2011). A enzima amônia monooxigenase é capaz de converter metano a metanol (BÉDARD; KNOWLES, 1989), e esta pode ser a razão de seu enriquecimento na incubação com $^{13}\text{CH}_4$. No entanto, mesmo capaz de converter metano a metanol, não há registro da capacidade de utilizar metanol por estes microrganismos, ou mesmo a presença de genes para metanol-dehidrogenase nos genomas disponíveis. Uma relação de simbiose é possível entre Nitrososphaeraceae e *Lysobacter* sp., à medida que genomas disponíveis de *Lysobacter* spp. indicam genes para metanol-dehidrogenase, e para toda a via até a formação de formato. Esta última é uma molécula importante na regulação do metabolismo celular e base na síntese de purinas e outras moléculas complexas (BROSNAN; BROSNAN, 2020). Se excretada, poderia se complexar com celulose formando celulose-formato (FUJIMOTO et al., 1986), uma forma mais facilmente absorvível que poderia ser incorporada por *Acidothermus* sp. Isolados deste gênero demonstram capacidade celulolítica (MOHAGHEGHI; GROHMANN; HIMMEL, 1986).

4.5 Conclusão

A calagem de solos de pastagem na região amazônica pode estimular de forma intensa o sequestro de metano em condições de alta concentração do gás, em espaços de tempo menores que 30 dias. Em solos de floresta, no entanto, o estímulo é pequeno em um mesmo intervalo de tempo, o que indica uma comunidade microbiana adaptada a baixas concentrações de metano. Tanto metanotróficas de tipo I, como *Methylocaldum sp.*, e de tipo II, como *Beijerinckaceae*, foram identificadas como ativas nos solos de pastagem com correção de acidez, indicando que em ambos os tipos de metanotróficas há grupos que respondem positivamente a calagem e condições para baixa afinidade. Este trabalho abre questões sobre o potencial da calagem de pastagens na região amazônica em mitigar emissões de gás de efeito estufa, e demanda pesquisas em campo considerando a dinâmica da metanogênese nestes solos.

Referências

AMARAL, J. A.; REN, T.; KNOWLES, R. Atmospheric methane consumption by forest soils and extracted bacteria at different pH values. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 7, p. 2397-2402, 1998. Disponível em: <<http://aem.asm.org/>>. Acesso em: 7 maio 2020.

APPRILL, A. et al. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 75, n. 2, p. 129–137, 2015. Disponível em: <<http://www.int-res.com/abstracts/ame/v75/n2/p129-137/>>. Acesso em: 15 fev. 2020.

BARTON, L.; MURPHY, D. V.; BUTTERBACH-BAHL, K. Influence of crop rotation and liming on greenhouse gas emissions from a semi-arid soil. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 167, p. 23–32, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167880913000066>>. Acesso em: 9 maio 2017.

BÉDARD, C.; KNOWLES, R. Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH₄, NH₄⁺, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. **Microbiological Reviews**, v. 53, n. 1, p. 68–84, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2496288>>. Acesso em: 6 set. 2019.

BENDER, M.; CONRAD, R. Effect of CH₄ concentrations and soil conditions on the induction of CH₄ oxidation activity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 12, p. 1517–1527, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/003807179500104M>>. Acesso em: 12 out. 2016.

BENDER, M.; CONRAD, R. Kinetics of CH₄ oxidation in oxic soils exposed to ambient air or high CH₄ mixing ratios. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 101, n. 4, p. 261-270, 1992. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsle/article-abstract/101/4/261/576660>>. Acesso em: 6 maio 2020.

BOKULICH, N. A. et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2 q2-feature-classifier plugin. **Microbiome**, v. 6, n. 1, 17 maio 2018.

BOLYEN, E. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, v. 37, p. 852-857, 2019.

BORKEN, W.; GRÜNDEL, S.; BEESE, F. Potential contribution of *Lumbricus terrestris* L. to carbon dioxide, methane and nitrous oxide fluxes from a forest soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 32, n. 2, p. 142–148, 2000. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s003740000228>>. Acesso em: 7 maio 2020.

BROSNAN, J. T.; BROSNAN, M. E. Formate and its role in amino acid metabolism. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 23, n. 1, p. 23-28, 2020. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00075197-202001000-00006>>. Acesso em: 9 maio 2020.

BUTTERBACH-BAHL, K.; ROTHE, A.; PAPEN, H. Effect of tree distance on N₂O and CH₄ fluxes from soils in temperate forest ecosystems. **Plant and Soil**, v. 240, n. 1, p. 91–103, 2002.

CAI, Y. et al. Conventional methanotrophs are responsible for atmospheric methane oxidation in paddy soils. **Nature Communications**, v. 7, p. 11728, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncomms11728>>. Acesso em: 3 out. 2017.

CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. **The ISME Journal**, v. 11, n. 12, p. 2639–2643, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ismej.2017.119>>. Acesso em: 21 nov. 2017.

CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S *rRNA* diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 108, n. 1, p. 4516–4522, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20534432>>. Acesso em: 20 abr. 2018.

COLE, J. R. et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput *rRNA* analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. D633–D642, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3965039/>>.

CONRAD, R. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. **Environmental Microbiology Reports**, v. 1, n. 5, p. 285–292, 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1758-2229.2009.00038.x/abstract>>. Acesso em: 12 out. 2016.

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**, v. 65, n. 11, p. 5066–5074, 1999. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/65/11/5066>>. Acesso em: 12 out. 2016.

DE MORAES, J. F. L. et al. Soil properties under Amazon forest and changes due to pasture installation in Rondônia, Brazil. **Geoderma**, v. 70, n. 1, p. 63–81, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0016706195000720>>. Acesso em: 12 out. 2016.

DUMONT, M. G.; MURRELL, J. C. Stable isotope probing - Linking microbial identify to function. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 499–504, 2005.

DUNFIELD, P. F. et al. High-affinity methane oxidation by a soil enrichment culture containing a type II methanotroph. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1009–1014, 1999. Disponível em: <<http://aem.asm.org/>>. Acesso em: 10 maio 2020.

EHLERINGER, J. R.; COOK, C. S. Carbon and oxygen isotope ratios of ecosystem respiration along an Oregon conifer transect: preliminary observations based on small-flask sampling. **Tree Physiology**, v. 18, n. 8–9, p. 513–519, 1 ago. 1998. Disponível em: <<https://academic.oup.com/treephys/article-lookup/doi/10.1093/treephys/18.8-9.513>>. Acesso em: 10 dez. 2019.

FEARNSIDE, P. M.; BARBOSA, R. I. Soil carbon changes from conversion of forest to pasture in Brazilian Amazonia. **Forest Ecology and Management**, v. 108, n. 1–2, p. 147–166, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378112798002229>>. Acesso em: 1 nov. 2015.

FERNANDES, S. A. P. et al. Seasonal variation of soil chemical properties and CO₂ and CH₄ fluxes in unfertilized and P-fertilized pastures in an Ultisol of the Brazilian Amazon. **Geoderma**, v. 107, n. 3–4, p. 227–241, 2002.

FRITZE, H. et al. Wood-ash fertilization and fire treatments in a Scots pine forest stand: Effects on the organic layer, microbial biomass, and microbial activity. **Biology and Fertility of Soils**, v. 17, n. 1, p. 57–63, 1994.

FUJIMOTO, T. et al. Reaction of cellulose with formic acid and stability of cellulose formate. **Journal of Polymer Science Part C: Polymer Letters**, v. 24, n. 10, p. 495–501, 1986. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/pol.1986.140241002>>. Acesso em: 9 maio 2020.

GARCÍA-MARCO, S. et al. No tillage and liming reduce greenhouse gas emissions from poorly drained agricultural soils in Mediterranean regions. **Science of the Total Environment**, v. 566, p. 512–520, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969716310476>>. Acesso em: 5 maio 2017.

GEBERT, J.; PERNER, M. Impact of preferential methane flow through soil on microbial community composition. **European Journal of Soil Biology**, v. 69, p. 8–16, 2015.

GOREAU, T. J.; DE MELLO, W. Z. Tropical deforestation: Some effects on atmospheric chemistry. **Ambio**, v. 17, n. 4, p. 275–281, 1988. Disponível em: <<https://www.osti.gov/etdeweb/biblio/6655174>>. Acesso em: 5 maio 2018.

HANSON, R. S.; HANSON, T. E. Methanotrophic Bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 439–471, jun. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC239451/>>. Acesso em: 27 abr. 2016.

HOLMES, A. J. et al. Evidence that participate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. **FEMS Microbiology Letters**, v. 132, n. 3, p. 203–208, 1995. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07834.x>>. Acesso em: 3 set. 2017.

HÜTSCH, B. W.; WEBSTER, C. P.; POWLSON, D. S. Methane oxidation in soil as affected by land use, soil pH and N fertilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n. 12, p. 1613–1622, 1994. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0038071794903131>>. Acesso em: 10 maio 2017.

IPCC. **Climate change 2013: the physical science basis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2013.

JESUS, E. DA C. et al. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **The ISME Journal**, v. 3, n. 9, p. 1004–1011, 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/ismej/journal/v3/n9/abs/ismej200947a.html>>. Acesso em: 12 out. 2016.

KELLER, M.; KAPLAN, W. A.; WOFSY, S. C. Emissions of N₂O, CH₄ and CO₂ from tropical forest soils, **Journal of Geophysical Research**, v. 91, n. D11, p. 11791, 1986.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111–120, 1980.

KIRSCHKE, S. et al. Three decades of global methane sources and sinks. **Nature Geoscience**, v. 6, p. 813–823, 2013.

KNIEF, C. Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic Bacteria evaluated based on *pmoA* as molecular marker. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4678205/>>. Acesso em: 3 out. 2016.

KNIEF, C.; LIPSKI, A.; DUNFIELD, P. F. Diversity and Activity of Methanotrophic Bacteria in Different Upland Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6703–6714, 2003. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/69/11/6703>>. Acesso em: 19 jul. 2016.

KROEGER, M. E. et al. Rainforest-to-pasture conversion stimulates soil methanogenesis across the Brazilian Amazon. **bioRxiv**, 2020. doi: 10.1101/2020.03.08.982587.

KUNHIKRISHNAN, A. et al. Functional relationships of soil acidification, liming, and greenhouse gas flux. **Advances in Agronomy**, v. 139, p. 1–71, 2016.

KUSSMAUL, M.; WILIMZIG, M.; BOCK, E. Methanotrophs and methanogens in masonry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 4530–4532, 1998.

LAMMEL, D. R. et al. Direct and indirect effects of a pH gradient bring insights into the mechanisms driving prokaryotic community structures. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 106, 2018.

LE MER, J.; ROGER, P. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: a review. **European Journal of Soil Biology**, v. 37, n. 1, p. 25–50, 2001.

LIMA, A. B.; MUNIZ, A. W.; DUMONT, M. G. Activity and abundance of methane-oxidizing bacteria in secondary forest and manioc plantations of Amazonian Dark Earth and their adjacent soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 550, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4205850/>>. Acesso em: 10 set. 2016.

LÓPEZ-MONDÉJAR, R. et al. Decomposer food web in a deciduous forest shows high share of generalist microorganisms and importance of microbial biomass recycling. **ISME Journal**, v. 12, n. 7, p. 1768–1778, 2018.

MANDAL, S. et al. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. **Microbial Ecology in Health & Disease**, v. 26, p. 27663, 2015. doi: 10.3402/mehd.v26.27663.

MEYER, K. M. et al. Belowground changes to community structure alter methane-cycling dynamics in Amazonia. **bioRxiv**, 2020. doi: 10.1101/2020.03.10.984807v1. Acesso em: 10 maio 2020.

MEYER, K. M. et al. Conversion of Amazon rainforest to agriculture alters community traits of methane-cycling organisms. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 6, p. 1547–1556, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/mec.14011>>. Acesso em: 21 mar. 2017.

MOHAGHEGHI, A.; GROHMANN, K.; HIMMEL, M. Isolation and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* gen. nov., sp. nov., a new genus of thermophilic, acidophilic, cellulolytic bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 3, p. 435–443, 1986.

MOSIER, A. R.; DELGADO, J. A.; KELLER, M. Methane and nitrous oxide fluxes in an acid Oxisol in western Puerto Rico: effects of tillage, liming and fertilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 14, p. 2087–2098, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071798000856>>. Acesso em: 17 jul. 2016.

NEUFELD, J. D. et al. DNA stable-isotope probing. **Nature Protocols**, v. 2, n. 4, p. 860–866, 2007.

OP DEN CAMP, H. J. M. et al. Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic *Verrucomicrobia*. **Environmental Microbiology Reports**, v. 1, n. 5, p. 293–306, 1 out. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1758-2229.2009.00022.x>>. Acesso em: 10 maio 2020.

PARADA, A. E.; NEEDHAM, D. M.; FUHRMAN, J. A. Every base matters: assessing small subunit *rRNA* primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1403–1414, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1462-2920.13023>>. Acesso em: 15 fev. 2020.

PARK, D.; LEE, J. Biological conversion of methane to methanol. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 5, p. 977–987, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s11814-013-0060-5>>. Acesso em: 26 ago. 2016.

PAULA, F. S. et al. Land use change alters functional gene diversity, composition and abundance in Amazon forest soil microbial communities. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 12, p. 2988–2999, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/mec.12786>>.

PEDRON, R. et al. Genomic and metagenomic insights into the microbial community of a thermal spring. **Microbiome**, v. 7, n. 1, p. 8, 2019. Disponível em: <<https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-019-0625-6>>. Acesso em: 8 maio 2020.

PESTER, M.; SCHLEPER, C.; WAGNER, M. The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 300–306, 2011.

PRATSCHER, J. et al. Unravelling the identity, metabolic potential and global biogeography of the atmospheric methane-oxidizing upland soil cluster α . **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 1016–1029, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.14036>>.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. D590–D596, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3531112/>>.

RADAJEWSKI, S. et al. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. **Nature**, v. 403, n. 6770, p. 646–649, 2000.

RAIJ, B. VAN et al. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2001.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 1, p. 62–66, 2003.

REAY, D. S.; NEDWELL, D. B. Methane oxidation in temperate soils: Effects of inorganic N. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 12, p. 2059–2065, 2004.

RODRIGUES, J. L. M. et al. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 110, n. 3, p. 988–993, 2013. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/110/3/988>>. Acesso em: 2 nov. 2015.

SAARI, A.; RINNAN, R.; MARTIKAINEN, P. J. Methane oxidation in boreal forest soils: kinetics and sensitivity to pH and ammonium. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 7, p. 1037–1046, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071704000781>>. Acesso em: 12 out. 2016.

SAIDI-MEHRABAD, A. et al. Methanotrophic bacteria in oilsands tailings ponds of northern Alberta. **ISME Journal**, v. 7, n. 5, p. 908–921, 2013.

SCHNELL, S.; KING, G. M. Stability of methane oxidation capacity to variations in methane and nutrient concentrations. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 17, n. 4, p. 285–294, 1995. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6941.1995.tb00153.x>>. Acesso em: 22 abr. 2020.

SEMRAU, J. D.; DISPIRITO, A. A.; YOON, S. Methanotrophs and copper. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 4, p. 496–531, 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6976.2010.00212.x/abstract>>. Acesso em: 23 set. 2016.

SMILAUER, P.; LEPS, J. **Multivariate analysis of ecological data using Canoco 5**. Cambridge: Cambridge University Press, 2014.

STEUDLER, P. A. et al. Consequence of forest-to-pasture conversion on CH₄ fluxes in the Brazilian Amazon Basin. **Journal of Geophysical Research: Atmospheres**, v. 101, n. D13, p. 18547–18554, 1996. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1029/96JD01551>>. Acesso em: 25 set. 2017.

SZAFRANEK-NAKONIECZNA, A. et al. Activity and Identification of Methanotrophic Bacteria in Arable and No-Tillage Soils from Lublin Region (Poland). **Microbial Ecology**, v. 77, n. 3, p. 701–712, 2019.

TESSARO, S. **Estudo da comunidade de bactérias metanotróficas em uma cronossequência de solos da Amazônia**. 2012. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

VENTURINI, A. M. **Forest-to-pasture conversion in the Eastern Amazon: impacts on the soil methane microbial communities**. 2019. 103 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

VENTURINI, A. M. et al. Robust DNA protocols for tropical soils. **Heliyon**, v. 6, n. 5, e03830, 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405844020306757>>. Acesso em: 15 maio 2020.

WEON, H. Y. et al. *Rudaea cellulosilytica* gen. nov., sp. nov., isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 9, p. 2308–2312, 2009.

WHITTENBURY, R.; DAVIES, S. L.; DAVEY, J. F. Exospores and Cysts Formed by Methane-utilizing Bacteria. **Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 219–226, 1970. Disponível em: <<http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-61-2-219>>. Acesso em: 12 out. 2016.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Diante das emissões de metano em solos de pastagem na região amazônica, em contraponto ao sequestro que acontece em solos sob floresta, o manejo de pastagens com *U. brizantha* cv. Marandu visando a manutenção de cobertura de gramínea e conservação do solo é capaz de mitigar emissões. A presença de gramínea sobre o solo, em oposição a um solo descoberto, pode aumentar o sequestro de metano em até 35% sob 70% de saturação de umidade do solo. Nestas condições, a rizosfera desta gramínea tem sua microbiota reduzida em até 10x na abundância absoluta de arqueias metanogênicas e na abundância relativa de todas as metanogênicas identificadas, dos gêneros *Methanomicrobium* sp., *Methanocella* sp., *Methanosarcina* sp. e Rice Cluster I. Não há alterações significativas na abundância absoluta ou na composição de metanotróficas. A calagem de solos de pastagem a pHs(H₂O) 5,8-6,5 pode tanto promover sequestro de metano, quanto reduzi-lo. A concentração de metano a que o solo está exposto regula esta resposta, sendo que sob altas concentrações (~10.000 ppm) metanotróficas *Methylocaldum* sp. (tipo I) e *Beijerinckiaceae* (tipo II) têm sua atividade de oxidação de metano estimulada e sob concentrações atmosféricas o solo oxida menos metano, sem impacto na abundância de arqueias metanogênicas ou bactérias metanotróficas. O sequestro de metano em solos da floresta amazônica é dependente de sua acidez, sendo que a calagem desses solos a pH 6,5 é capaz de convertê-los a emissores após 40-50 dias da correção. Este trabalho destaca o potencial do manejo do solo de pastagens com correção de acidez e manutenção de cobertura de gramínea em mitigar impactos nas emissões de metano pelo solo. No entanto, pesquisas experimentais em campo que considerem a sazonalidade das chuvas e diferentes condições de saturação de umidade do solo são necessárias para uma recomendação apropriada aos tomadores de decisão e gestores.

APÊNDICES

Apêndice A – Material Suplementar do Capítulo 3

Tabela S1 - composição química dos solos utilizados no experimento (continua)

Área	Tempo	Tratamento	pH	M.O.	P	K	Ca	Mg	H+Al	Al
			CaCl ₂	g.dm ⁻³	mg.dm ⁻³			-----mmolc.dm ⁻³ -----		
Ariquemes/RO	Dia 0	Floresta-A-B	4.03 ±	28.3 ±	9.0 ± 0.0	1.2 ±	5.3 ±	3.7 ±	38.0 ±	6.0 ±
			0.06	1.1		0.0	1.1	0.6	4.0	0.0
		Pastagem-A-B	4.63 ±	34.0 ±	7.3 ± 1.1	1.6 ±	11.3 ±	4.3 ±	29.0 ±	<2
			0.06	2.0		0.3	3.5	1.1	1.7	
	Floresta-A-B	4.20 ±	27.7 ±	5.5 ± 1.0	1.2 ±	6.2 ±	1.7 ±	61.5 ±	6.5 ±	
		0.18	3.0		0.9	1.7	0.5	8.5	0.6	
	Floresta-A-G	4.20 ±	26.0 ±	5.0 ± 0.8	0.9 ±	6.5 ±	2.2 ±	50.0 ±	6.0 ±	
		0.12	2.0		0.6	2.1	0.5	8.5	0.8	
	Floresta-C-B	6.15 ±	24.0 ±	8.5 ± 2.6	0.7 ±	42.5 ±	2.7 ±	14.0 ±	<2	
		0.17	1.1		0.2	3.7	0.5	1.1		
	Floresta-C-G	6.05 ±	25.0 ±	8.5 ± 1.9	0.6 ±	38.2 ±	2.0 ±	14.7 ±	<2	
		0.17	1.6		0.1	3.7	0.0	1.3		
	Dia 250	Pastagem-A-B	4.67 ±	31.7 ±	6.2 ± 2.6	1.4 ±	15.2 ±	5.7 ±	37.0 ±	<2
			0.15	3.3		0.1	1.5	0.5	2.0	
Pastagem-A-G	4.75 ±	26.5 ±	5.5 ± 0.6	1.2 ±	15.5 ±	6.0 ±	34.0 ±	<2		
	0.17	1.0		0.0	1.9	0.0	0.0			
Pastagem-C-B	5.92 ±	27.7 ±	8.2 ± 3.2	1.3 ±	36.7 ±	5.2 ±	15.5 ±	<2		
	0.09	3.0		0.1	6.5	0.5	0.6			
Pastagem-C-G	5.97 ±	30.7 ±	8.2 ± 2.4	0.9 ±	42.0 ±	4.2 ±	15.5 ±	<2		
	0.15	2.5		0.1	7.5	1.0	2.1			
Belterra-Santarém/PA	Dia 0	Floresta-A-B	3.70 ±	39.6 ±	6.2 ± 1.3	1.1 ±	1.6 ±	2.4 ±	143 ±	16.8 ±
			0.30	10.3		0.2	0.5	0.5	44.6	1.6
		Pastagem-A-B	4.50 ±	31.8 ±	3.6 ± 1.1	1.1 ±	12.2 ±	7.2 ±	44 ±	2.2 ±
			0.10	3.0		0.2	1.9	1.5	2.7	0.8

M.O. = Matéria Orgânica; H+Al = acidez potencial. A= pH natural; B = bulk; C = calagem; G = gramínea.

Tabela S1 - composição química dos solos utilizados no experimento (conclusão)

Área	Tempo	Tratamento	SB	CTC	V	m	S	Cu	Fe	Mn	B
			--mmolc.dm ⁻³ --		%	%		-----mg.dm ⁻³ -----			mg.dm ⁻³
Ariquemes/RO	Dia 0	Floresta-A-B	10.0 ±	48.0 ±	21.0 ±	27.6 ±	11.0 ±	0.5 ±	83.3 ±	6.5 ±	<0.15
			1.0	3.3	3.5	15.4	2.8	0.1	7.8	2.5	
		Pastagem-A-B	17.3 ±	46.3 ±	37.0 ±	6.0 ±	<6	1.3 ±	84.3 ±	78.2 ±	<0.15
			4.7	5.0	6.6	7.2		0.1	7.5	8.7	
	Floresta-A-B	9.5 ±	71.0 ±	13.2 ±	42.5 ±	7.7 ±	0.3 ±	133.8 ±	4.9 ±	<0.15	
		2.9	7.3	4.6	9.9	2.4	0.0	42.4	0.9		
	Floresta-A-G	10.0 ±	60.0 ±	16.5 ±	39.0 ±	<6	0.3 ±	105.0 ±	3.2 ±	0.2 ± 0.1	
		2.4	6.8	5.7	8.1		0.1	22.0	0.5		
	Floresta-C-B	46.2 ±	60.2 ±	76.5 ±	ns	<6	0.2 ±	20.2 ±	1.5 ±	0.3 ± 0.2	
		4.1	3.1	3.0			0.0	5.7	0.6		
	Floresta-C-G	41.2 ±	56.0 ±	73.5 ±	ns	6.5 ±	0.2 ±	27.6 ±	1.8 ±	0.2 ± 0.1	
		3.7	2.6	3.3		1.3	0.1	6.7	0.4		
	Dia 250	Pastagem-A-B	22.7 ±	59.7 ±	37.7 ±	8.5 ±	<6	1.2 ±	108.0 ±	34.5 ±	<0.15
			2.0	1.5	3.1	0.6		0.2	11.6	10.4	
	Pastagem-A-G	22.5 ±	56.5 ±	40.0 ±	6.5 ±	7.2 ±	1.1 ±	103.4 ±	34.5 ±	0.2 ± 0.1	
		1.9	1.9	2.4	2.9	3.4	0.1	9.8	4.9		
Pastagem-C-B	43.2 ±	58.7 ±	73.5 ±	ns	<6	0.8 ±	33.6 ±	14.3 ±	<0.15		
	6.9	6.7	3.7			0.2	6.3	4.2			
Pastagem-C-G	47.2 ±	62.7 ±	74.7 ±	ns	<6	0.8 ±	30.8 ±	17.4 ±	<0.15		
	8.4	7.8	4.9			0.1	7.9	3.5			
Belterra-Santarém/PA	Dia 0	Floresta-A-B	5 ± 1.0	148 ±	3.4 ±	76.6 ±	11 ±	0.3 ±	161.6 ±	9.2 ±	0.5 ± 0.1
			44.9	1.1	4.9	2.5	0.1	127.3	7.9		
		Pastagem-A-B	20.6 ±	64.6 ±	31.8 ±	10.2 ±	11.4 ±	0.4 ±	151.8 ±	4.8 ±	0.5 ± 0.1
			3.7	4.6	3.9	4.8	1.5	0.1	52.1	1.2	

SB = Soma de bases; CTC = Capacidade de Troca Catiônica; V= saturação por bases; m = saturação por alumínio; A= pH natural; B = bulk; C = calagem; G = gramínea.

Tabela S2 - profundidade de sequenciamento em amostras de experimento com solos de Ariquemes/RO (2017), de *amplicons* 16S após filtragem, *denoise*, fusão das sequências *forward* e *reverse*, e remoção de quimeras pela ferramenta DADA2. Menor valor em 50.993 ASVs. P = Pastagem, FP = Floresta

Experimento 1 – Ariquemes/RO – 2017		
Amostra	Tratamento	Nº de ASVs pós DADA2
FP 0-0-1	FP-pH natural-bulk	64909
FP 0-0-2	FP-pH natural-bulk	59810
FP 0-0-3	FP-pH natural-bulk	56995
FP 0-0-4	FP-pH natural-bulk	60649
FP 0-1-1	FP-pH natural-rizosfera	59535
FP 0-1-2	FP-pH natural-rizosfera	63362
FP 0-1-3	FP-pH natural-rizosfera	55209
FP 0-1-4	FP-pH natural-rizosfera	81738
FP 1-0-1	FP-calagem-bulk	73568
FP 1-0-2	FP-calagem-bulk	63641
FP 1-0-3	FP-calagem-bulk	64302
FP 1-0-4	FP-calagem-bulk	67549
FP 1-1-1	FP-calagem-rizosfera	71862
FP 1-1-2	FP-calagem-rizosfera	55383
FP 1-1-3	FP-calagem-rizosfera	51441
FP 1-1-4	FP-calagem-rizosfera	68334
P 0-0-1	P-pH natural-bulk	83421
P 0-0-2	P-pH natural-bulk	70108
P 0-0-3	P-pH natural-bulk	78405
P 0-0-4	P-pH natural-bulk	63618
P 0-1-1	P-pH natural-rizosfera	70628
P 0-1-2	P-pH natural-rizosfera	50993
P 0-1-3	P-pH natural-rizosfera	82473
P 0-1-4	P-pH natural-rizosfera	74254
P 1-0-1	P-calagem-bulk	95860
P 1-0-2	P-calagem-bulk	88514
P 1-0-3	P-calagem-bulk	69433
P 1-0-4	P-calagem-bulk	58978
P 1-1-1	P-calagem-gramínea	63146
P 1-1-2	P-calagem-gramínea	61570
P 1-1-3	P-calagem-gramínea	69874
P 1-1-4	P-calagem-gramínea	77523

Tabela S3 - profundidade de sequenciamento em amostras de solo de campo de Belterra/PA (2019), de *amplicons* 16S após filtragem, *denoise*, fusão das sequências *forward* e *reverse*, e remoção de quimeras pela ferramenta DADA2. Menor valor em 11.761 ASVs. P = Pastagem

Campo – Belterra/PA – 2019		
Amostra	Tratamento	Nº de ASVs pós DADA2
B-1-A-2	P1-Adjacente à Raiz	40675
B-1-B-3	P1-Bulk	46030
B-1-R-1	P1-Rizosfera	25993
B-3-A-8	P1- Adjacente à Raiz	86869
B-3-B-9	P1-Bulk	46584
B-3-R-7	P1-Rizosfera	52615
B-4-A-11	P1- Adjacente à Raiz	23657
B-4-B-12	P1-Bulk	20374
B-4-R-10	P1-Rizosfera	65066
B-5-A-14	P1- Adjacente à Raiz	21783
B-5-B-15	P1-Bulk	22187
B-5-R-13	P1-Rizosfera	25661
G-1-A-17	P2- Adjacente à Raiz	38360
G-1-B-18	P2-Bulk	42145
G-1-R-16	P2-Rizosfera	31777
G-3-A-23	P2- Adjacente à Raiz	26987
G-3-B-24	P2-Bulk	15246
G-3-R-22	P2-Rizosfera	30297
G-4-A-26	P2- Adjacente à Raiz	21832
G-4-B-27	P2-Bulk	14162
G-4-R-25	P2-Rizosfera	20555
G-5-A-29	P2- Adjacente à Raiz	11761
G-5-B-30	P2-Bulk	19760
G-5-R-28	P2-Rizosfera	17842

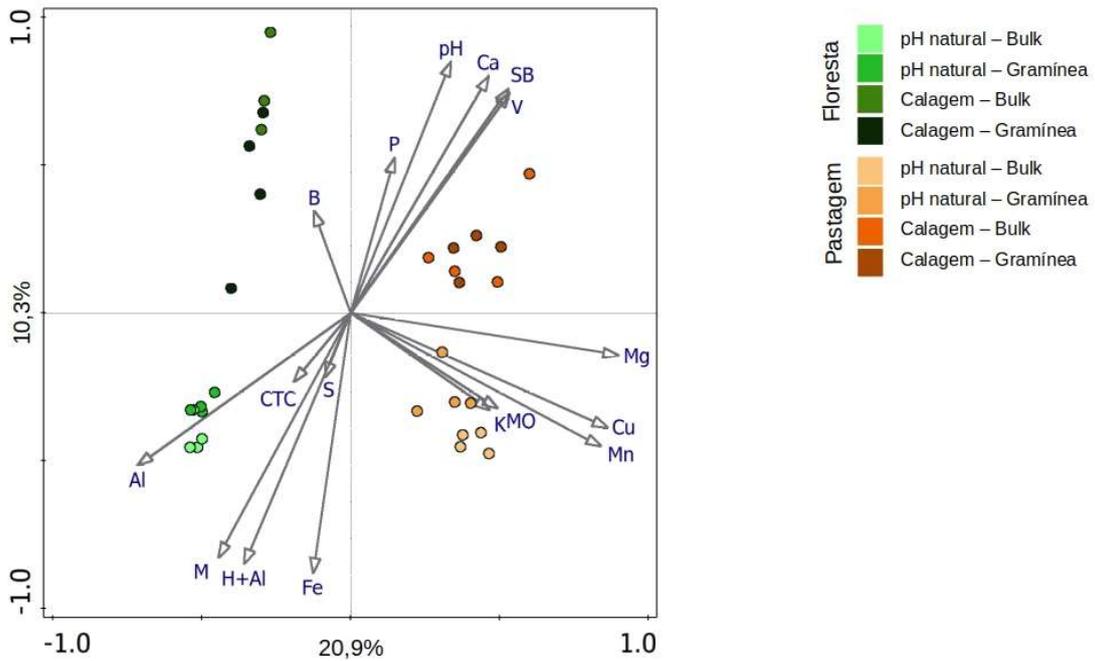


Figura S1 - análise de redundância (RDA) a partir dos dados de composição e abundância da comunidade e de química do solo. Bulk = solo sem planta; MO = Matéria Orgânica; SB = Soma de bases; CTC = Capacidade de Troca Catiônica; V= saturação por bases; m = saturação por alumínio; H+Al = acidez potencial

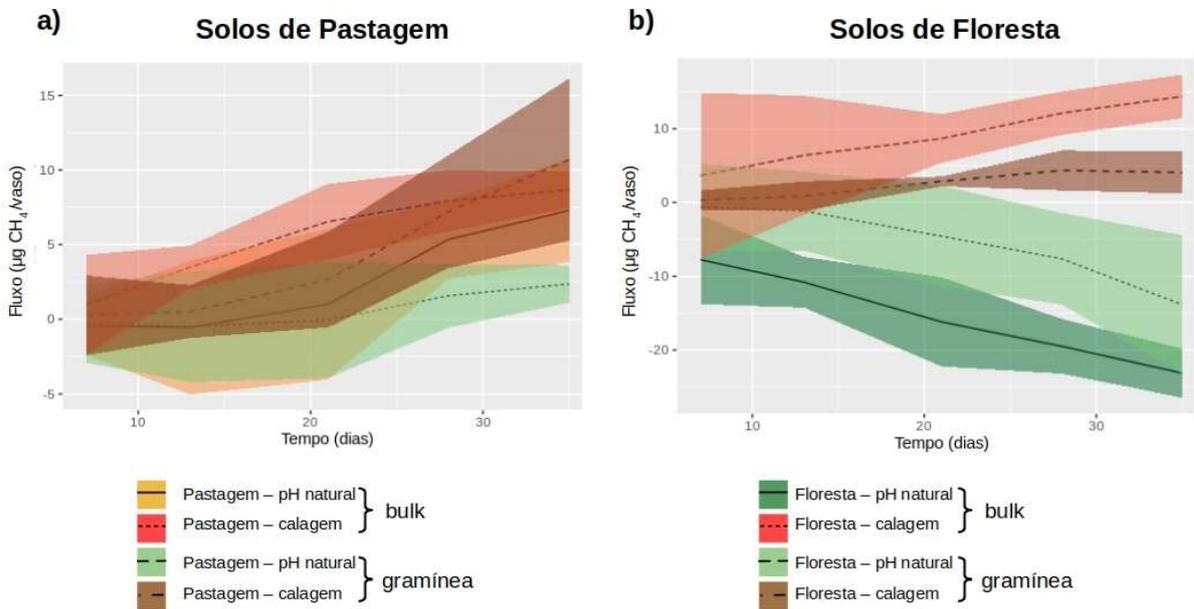


Figura S2 - fluxo acumulado de CH₄ em experimento com solos de a) pastagem e b) floresta de Belterra-Santarém/PA (2019), com e sem correção de acidez e com e sem cobertura de braquiária. Linhas centrais indicam a média e áreas sombreadas o desvio padrão

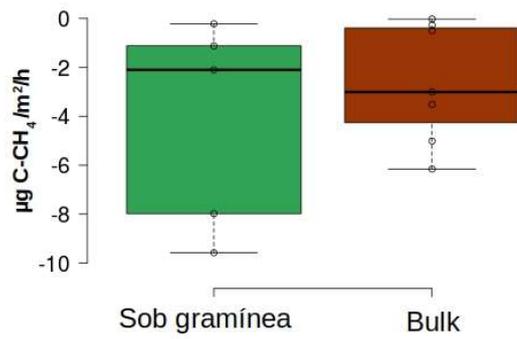


Figura S3 - fluxo de CH₄ em campo em áreas de pastagem de Belterra/PA (2019) sob cobertura de braquiária e em pontos sem cobertura de gramínea (bulk). Não há diferença significativa entre os dois grupos

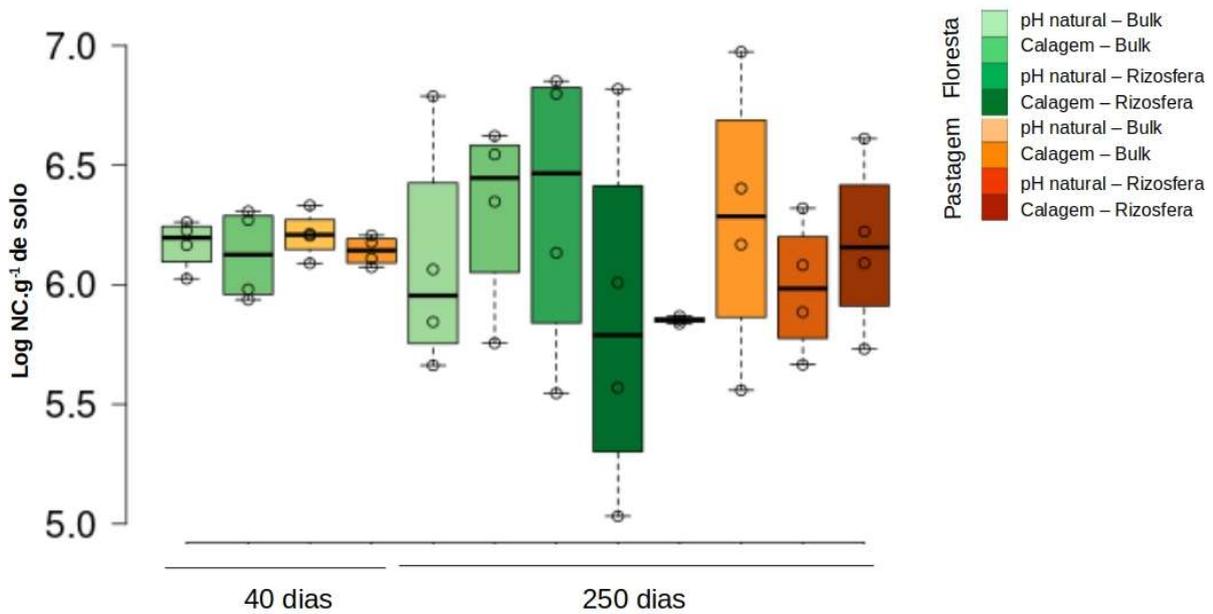


Figura S4 - quantificação de cópias do gene *mmoX* em experimento com solos de Ariquemes/RO (2017). ns = não significativo

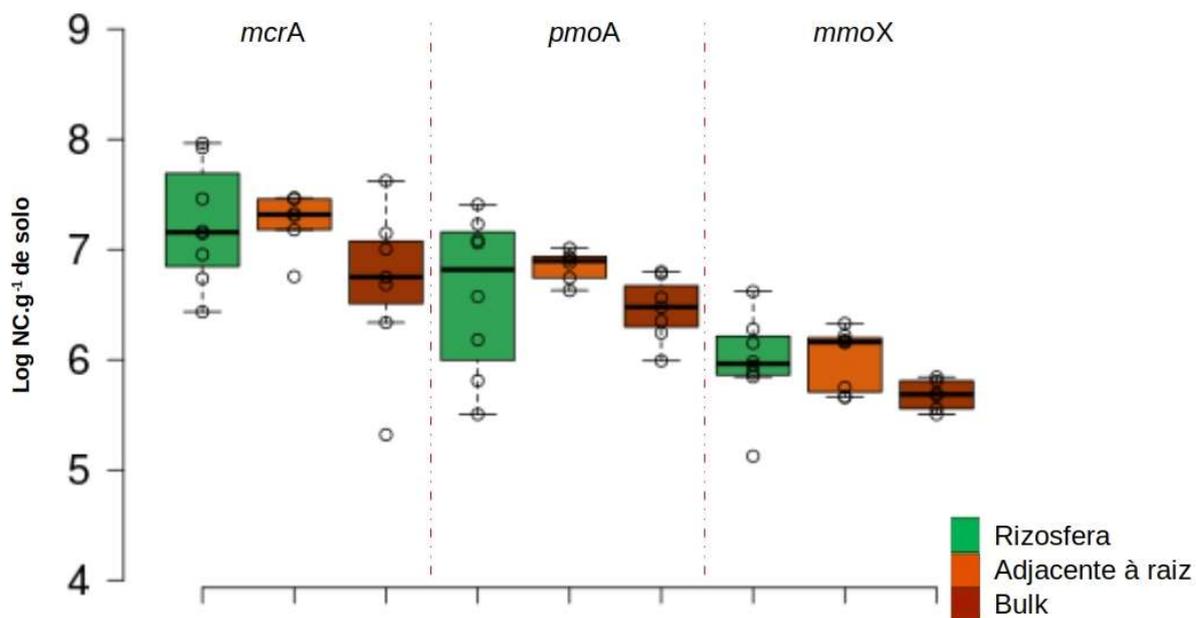


Figura S5 - quantificação de cópias dos genes *mcrA*, *pmoA* e *mmoX* em campo em áreas de pastagem de Belterra/PA (2019) na rizosfera de braquiária, em solos sob planta, porém não presos à raiz (adjacentes) e em pontos sem cobertura de gramínea (bulk). Não há diferenças significativas

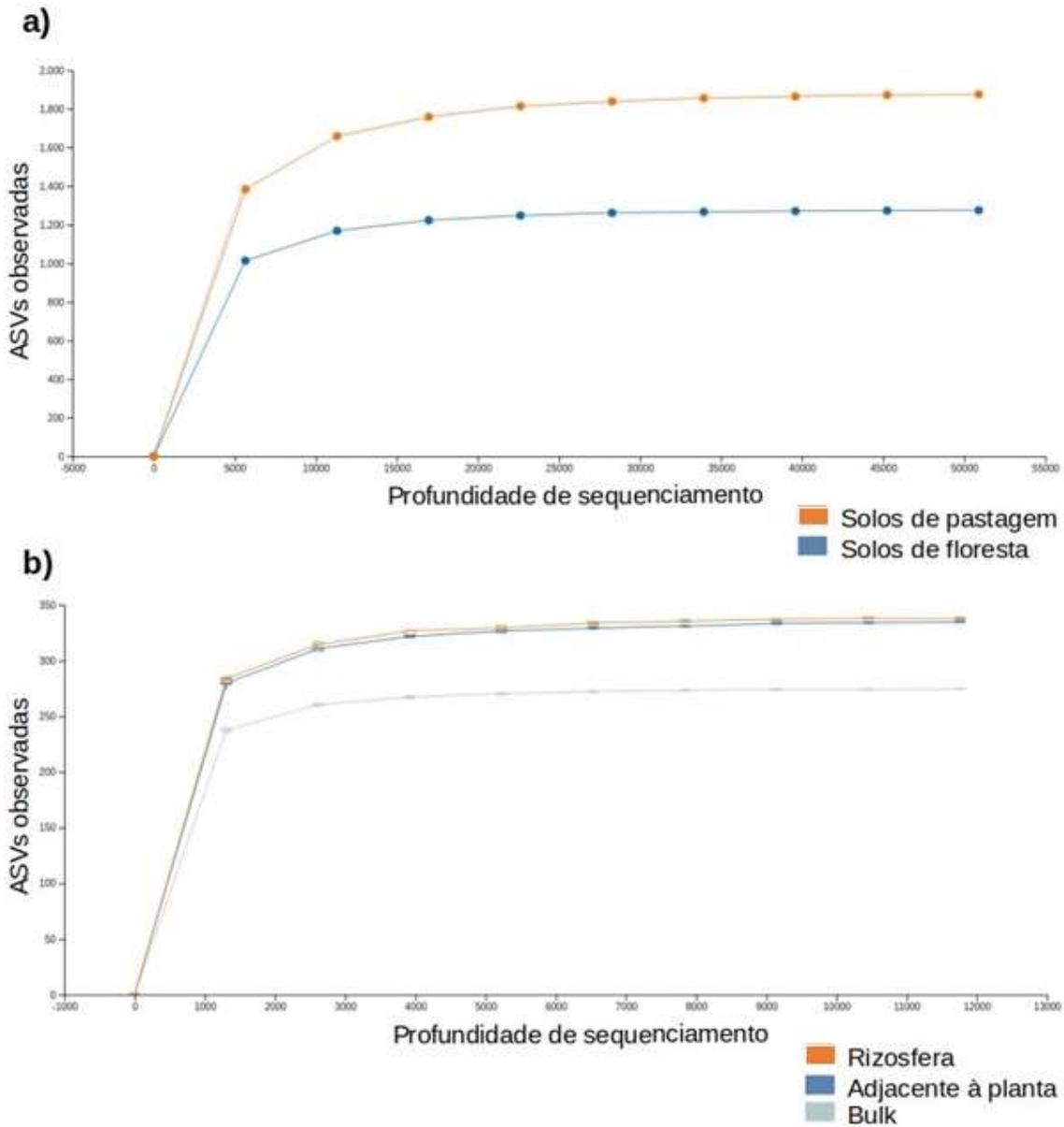


Figura S6 - análise de rarefação dos dados de sequenciamento do experimento 1 (Ariquemes/RO – 2017) e do estudo de campo em pastagens de Belterra/PA – 2019

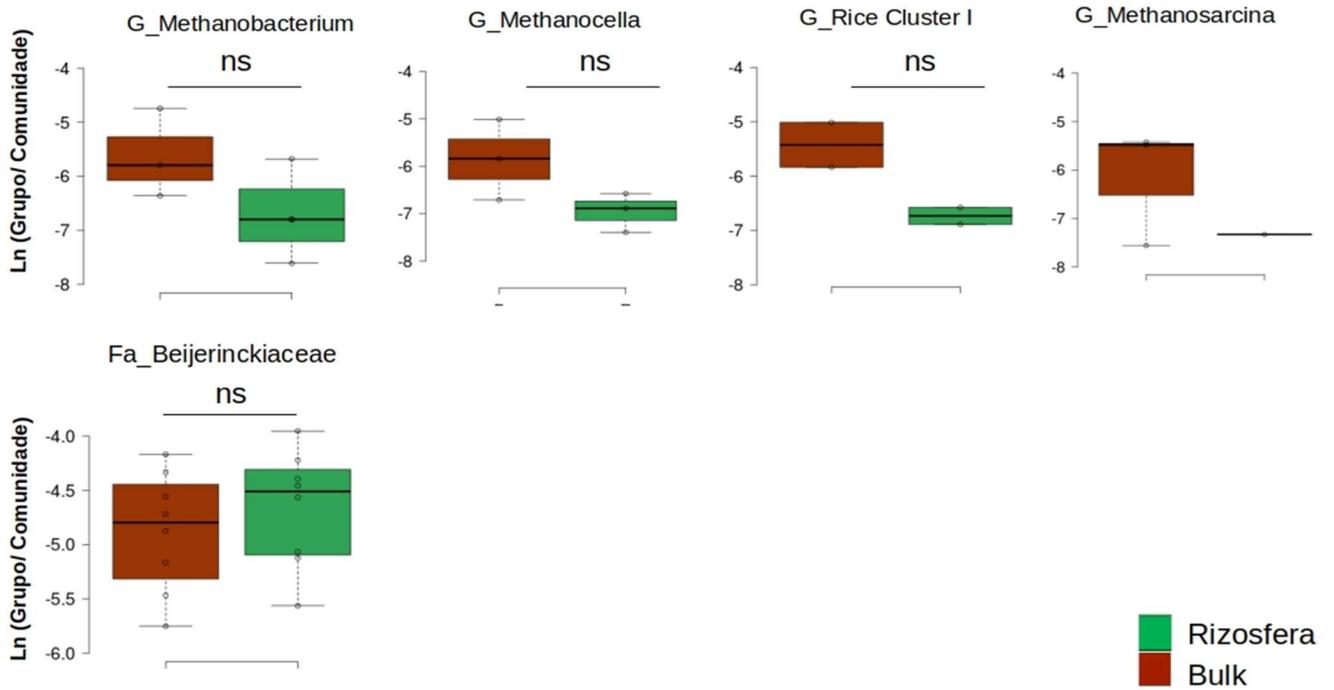


Figura S7 - razão entre microrganismos metanogênicos (superior na figura) e metanotróficos (inferior na figura) por gênero (G) ou família (Fa) em relação ao total da comunidade. Quanto mais negativos os números, menor a abundância. ns = não significativo

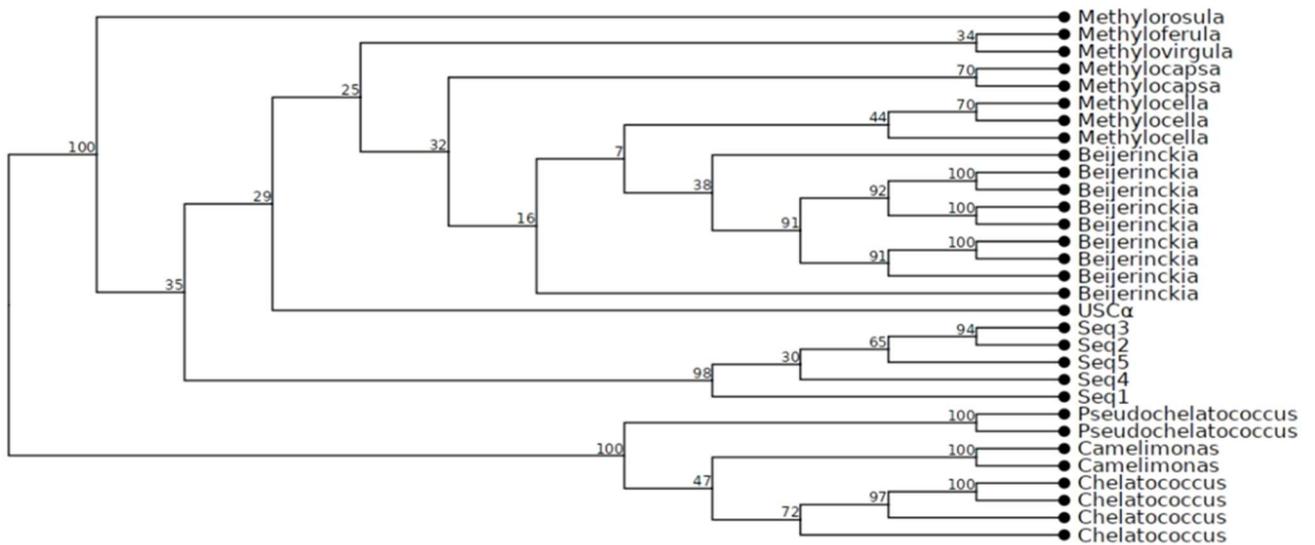


Figura S8 - árvore filogenética com sequências do gene 16S *rRNA* obtidas a partir do par de *primers* 341F/805R para regiões V3/V4 e identificadas como Beijerinckiaceae (Seq1 a Seq5), junto às sequências tipo de alta qualidade disponíveis para microrganismos desta família e de USCα. Sustentação dos agrupamentos indicada após 1000 bootstraps

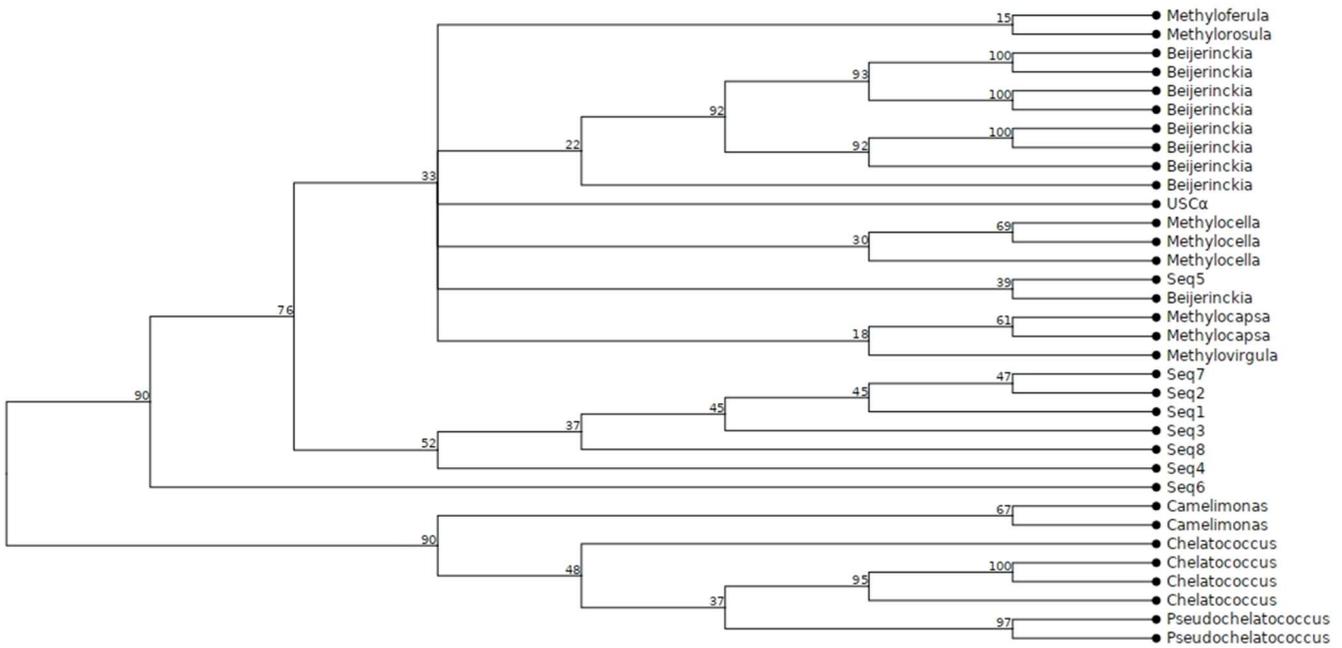


Figura S9 - árvore filogenética com sequências do gene 16S rRNA obtidas a partir do par de *primers* 515F/806R para região V4 e identificadas como Beijerinckiaceae (Seq1 a Seq8), junto às sequências tipo de alta qualidade disponíveis para microrganismos desta família e de USCα. Sustentação dos agrupamentos indicada após 1000 bootstraps

Apêndice B – Material Suplementar do Capítulo 4

Tabela S1 - composição química dos solos utilizados no experimento (continua)

Tratamento	pH	M.O	P	K	Ca	Mg	H+Al	Al	SB	CTC	V	m	S
	CaCl ₂	g dm ⁻³	mg dm ⁻³				----- mmol _c dm ⁻³ -----			%	%	mg dm ⁻³	
Floresta-natural	3,8	46	5	1,0	3	2	109	20	6	115	5	77	13
Floresta-natural	3,7	46	5	1,2	4	2	135	18	7	142	5	71	15
Floresta-natural	3,7	46	6	1,0	3	2	150	17	6	156	4	74	15
Floresta-natural	3,6	32	4	0,8	3	2	109	19	6	115	5	77	19
Floresta-natural	3,6	34	5	1,0	4	2	135	19	7	142	5	73	31
Floresta-calagem	5,0	37	4	1,0	48	3	38	1	52	90	58	2	15
Floresta-calagem	5,2	39	4	1,0	55	3	34	1	59	93	63	2	15
Floresta-calagem	5,3	34	4	1,2	55	3	31	2	59	90	66	3	19
Floresta-calagem	5,6	32	4	1,0	57	3	28	0	61	89	69	0	13
Floresta-calagem	5,3	32	5	1,0	51	3	34	0	55	89	62	0	19
Pastagem-natural	4,1	23	3	1,0	7	4	72	8	12	84	14	40	8
Pastagem-natural	4,2	25	3	1,2	8	4	58	7	13	71	19	35	11
Pastagem-natural	4,0	25	3	1,0	6	4	64	9	11	75	15	45	9
Pastagem-natural	4,1	32	2	1,0	7	5	64	7	13	77	17	35	11
Pastagem-natural	4,2	37	2	1,0	8	6	64	6	15	79	19	29	9
Pastagem-calagem	4,7	25	3	1,0	31	4	38	2	36	74	49	5	10
Pastagem-calagem	5,0	23	2	1,0	29	4	34	1	34	68	50	3	9
Pastagem-calagem	5,0	32	3	1,0	33	4	34	1	38	72	53	3	9
Pastagem-calagem	5,2	23	3	1,0	31	4	31	0	36	67	54	0	9
Pastagem-calagem	5,0	32	4	1,2	30	4	34	1	35	69	51	3	10

M.O. = Matéria Orgânica; SB = Soma de bases; CTC = Capacidade de Troca Catiônica; V= saturação por bases; m = saturação por alumínio; H+ Al = acidez potencial

Tabela S1 - composição química dos solos utilizados no experimento (conclusão)

Tratamento	Cu	Fe	Zn	Mn	B	N	pH	Argila	Silte	Areia Total	Areia Grossa	Areia Fina
	----- mg/dm ³ -----					mg/Kg	H ₂ O	-----g/kg-----				
Floresta-natural	0,4	153	8,4	9,7	0,64	2590	4,3	839	91	70	50	20
Floresta-natural	0,4	127	12,2	9,4	0,86	2800	4,0	744	176	80	50	30
Floresta-natural	0,4	120	41,2	10,5	0,93	2450	4,1	792	148	60	40	20
Floresta-natural	0,3	115	45,4	10,0	0,74	1260	4,0	822	148	30	20	10
Floresta-natural	0,4	215	74,6	12,3	1,05	1680	3,9	891	49	60	40	20
Floresta-calagem	0,4	88	47,2	8,9	0,61	2450	5,5	795	125	80	50	30
Floresta-calagem	0,3	112	21,2	5,6	0,63	2450	5,7	800	130	70	40	30
Floresta-calagem	0,3	62	31,6	3,6	1,04	2100	5,8	790	70	140	90	50
Floresta-calagem	0,2	68	26,0	7,2	0,83	1400	6,1	806	44	150	110	40
Floresta-calagem	0,3	79	66,0	7,1	0,72	1400	5,8	817	103	80	60	20
Pastagem-natural	0,4	144	20,2	7,2	0,25	1400	4,8	487	73	440	310	130
Pastagem-natural	0,3	137	22,6	6,2	0,36	1400	5,0	465	105	430	280	150
Pastagem-natural	0,3	131	44,6	5,9	0,45	1190	4,6	483	47	470	310	160
Pastagem-natural	0,2	148	26,2	4,9	0,40	1120	4,8	521	9	470	320	150
Pastagem-natural	0,3	134	40,6	7,2	0,44	1190	4,8	489	1	510	370	140
Pastagem-calagem	0,2	105	63,8	4,3	0,77	1540	5,4	516	34	450	290	160
Pastagem-calagem	0,6	74	19,6	3,8	0,46	1260	5,7	497	43	460	300	160
Pastagem-calagem	0,3	84	44,8	4,3	0,36	1470	5,5	514	46	440	290	150
Pastagem-calagem	0,2	66	25,2	4,8	0,32	980	5,7	459	61	480	340	140
Pastagem-calagem	0,2	73	45,4	7,2	0,35	1400	5,5	450	70	480	350	130

Tabela S2 - profundidade de sequenciamento de amplicons 16S após filtragem, *denoise*, fusão das sequências *forward* e *reverse*, e remoção de quimeras pela ferramenta DADA2. (continua)

Código da amostra	Tratamento	Nº de ASVs pós DADA2
82-H	FP-ácido-C12-H	44169
82-L	FP-ácido-C12-L	49465
83-H	FP-ácido-C12-H	36293
83-L	FP-ácido-C12-L	40342
84-H	FP-ácido-C12-H	17878
84-L	FP-ácido-C12-L	33044
87-H	P-ácido-C12-H	24293
87-L	P-ácido-C12-L	24249
87-VH	P-ácido-C12-VH	26646
88-H	P-ácido-C12-H	31270
88-L	P-ácido-C12-L	31016
88-VH	P-ácido-C12-VH	30362
89-H	P-ácido-C12-H	58170
89-L	P-ácido-C12-L	34474
89-VH	P-ácido-C12-VH	66545
91-H	FP-calagem-C12-H	48441
91-L	FP-calagem-C12-L	28947
92-H	FP-calagem-C12-H	31406
92-L	FP-calagem-C12-L	26487
94-H	FP-calagem-C12-H	25357
94-L	FP-calagem-C12-L	20660
96-H	P-calagem-C12-H	21427
96-L	P-calagem-C12-L	30597
96-VH	P-calagem-C12-VH	29877
98-H	P-calagem-C12-H	49389
98-L	P-calagem-C12-L	39249
98-VH	P-calagem-C12-VH	48318
100-H	P-calagem-C12-H	39728
100-L	P-calagem-C12-L	31366

Tabela S2 - profundidade de sequenciamento de amplicons 16S após filtragem, *denoise*, fusão das sequências *forward* e *reverse*, e remoção de quimeras pela ferramenta DADA2. (conclusão)

Código da amostra	Tratamento	Nº de ASVs pós DADA2
100-VH	P-calagem-C12-VH	38762
101-H	FP-ácido-C13-H	44685
101-L	FP-ácido-C13-L	37922
102-H	FP-ácido-C13-H	28953
102-L	FP-ácido-C13-L	37746
105-H	FP-ácido-C13-H	39080
105-L	FP-ácido-C13-L	53413
107-H	P-ácido-C13-H	34843
107-L	P-ácido-C13-L	27357
107-VH	P-ácido-C13-VH	41016
108-H	P-ácido-C13-H	34020
108-L	P-ácido-C13-L	23706
108-VH	P-ácido-C13-VH	27718
109-H	P-ácido-C13-H	28250
109-L	P-ácido-C13-L	22704
109-VH	P-ácido-C13-VH	30415
111-H	FP-calagem-C13-H	46263
111-L	FP-calagem-C13-L	67839
112-H	FP-calagem-C13-H	55590
112-L	FP-calagem-C13-L	14136
114-H	FP-calagem-C13-H	31354
114-L	FP-calagem-C13-L	22665
118-H	P-calagem-C13-H	25070
118-L	P-calagem-C13-L	5672
118-VH	P-calagem-C13-VH	24443
119-H	P-calagem-C13-H	24104
119-L	P-calagem-C13-L	27544
119-VH	P-calagem-C13-VH	23702
120-H	P-calagem-C13-H	46290
120-L	P-calagem-C13-L	40232
120-VH	P-calagem-C13-VH	101101

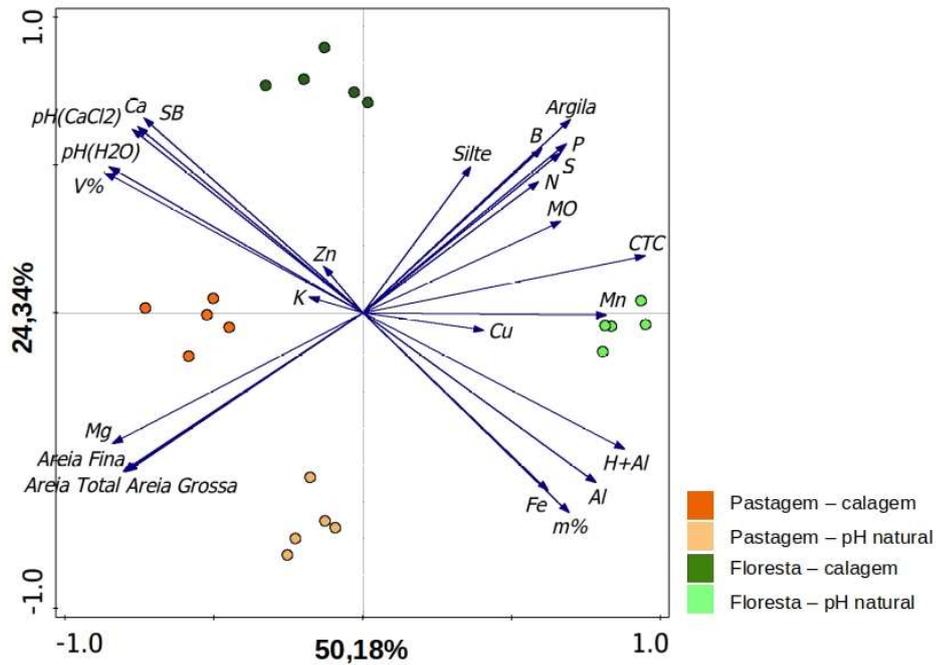


Figura S1 - análise de redundância (RDA) utilizando matriz dos resultados de análise química dos solos de floresta e pastagem após 40 dias da correção de acidez com adição de CaCO_3

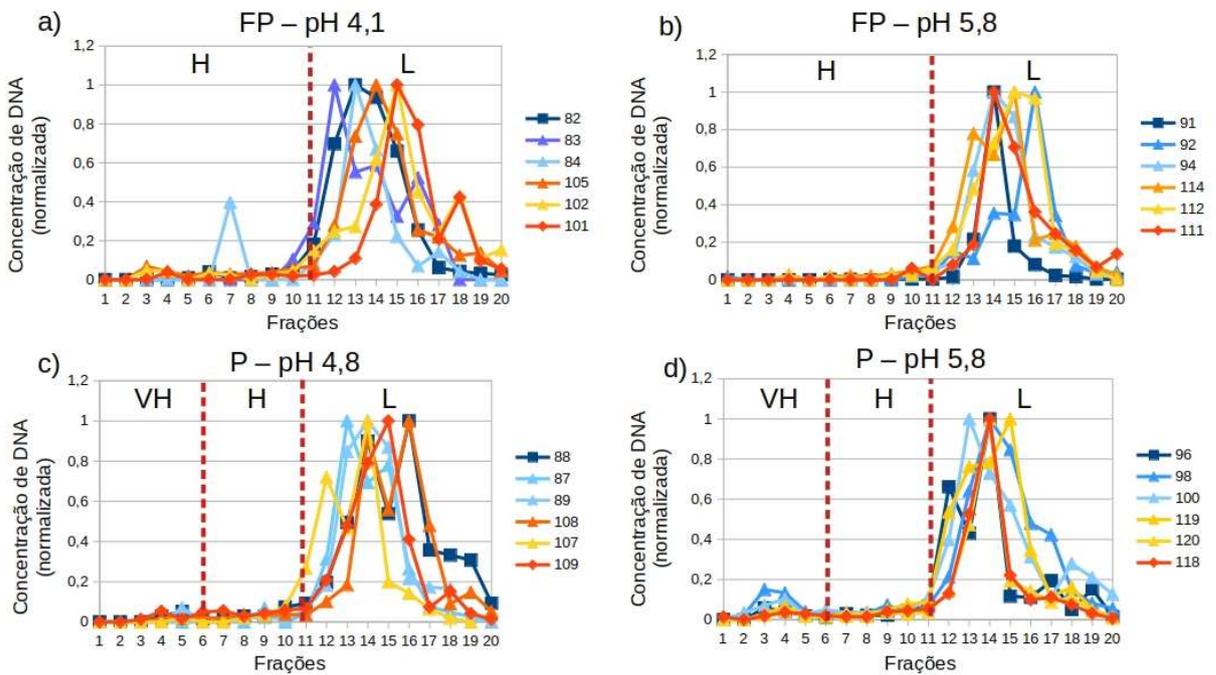


Figura S2 - distribuição do DNA após fracionamento por tratamento, destacando as regiões por densidade definidas como: muito alta (1-6), alta (7-11) e baixa densidade (12-20). Concentração de DNA normalizada (razão) em relação à maior concentração observada por cada amostra. Cores frias (tons de azul) indicam réplicas incubadas com $^{12}\text{CH}_4$ e cores quentes (Vermelho, laranja e amarelo) réplicas incubadas com $^{13}\text{CH}_4$

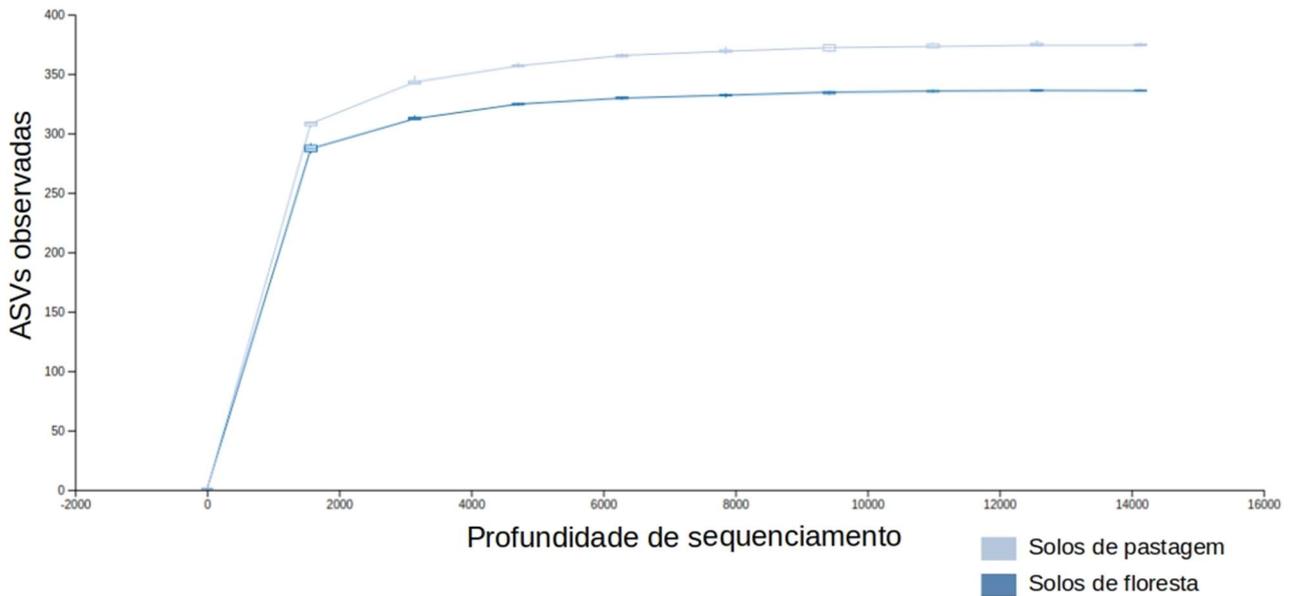
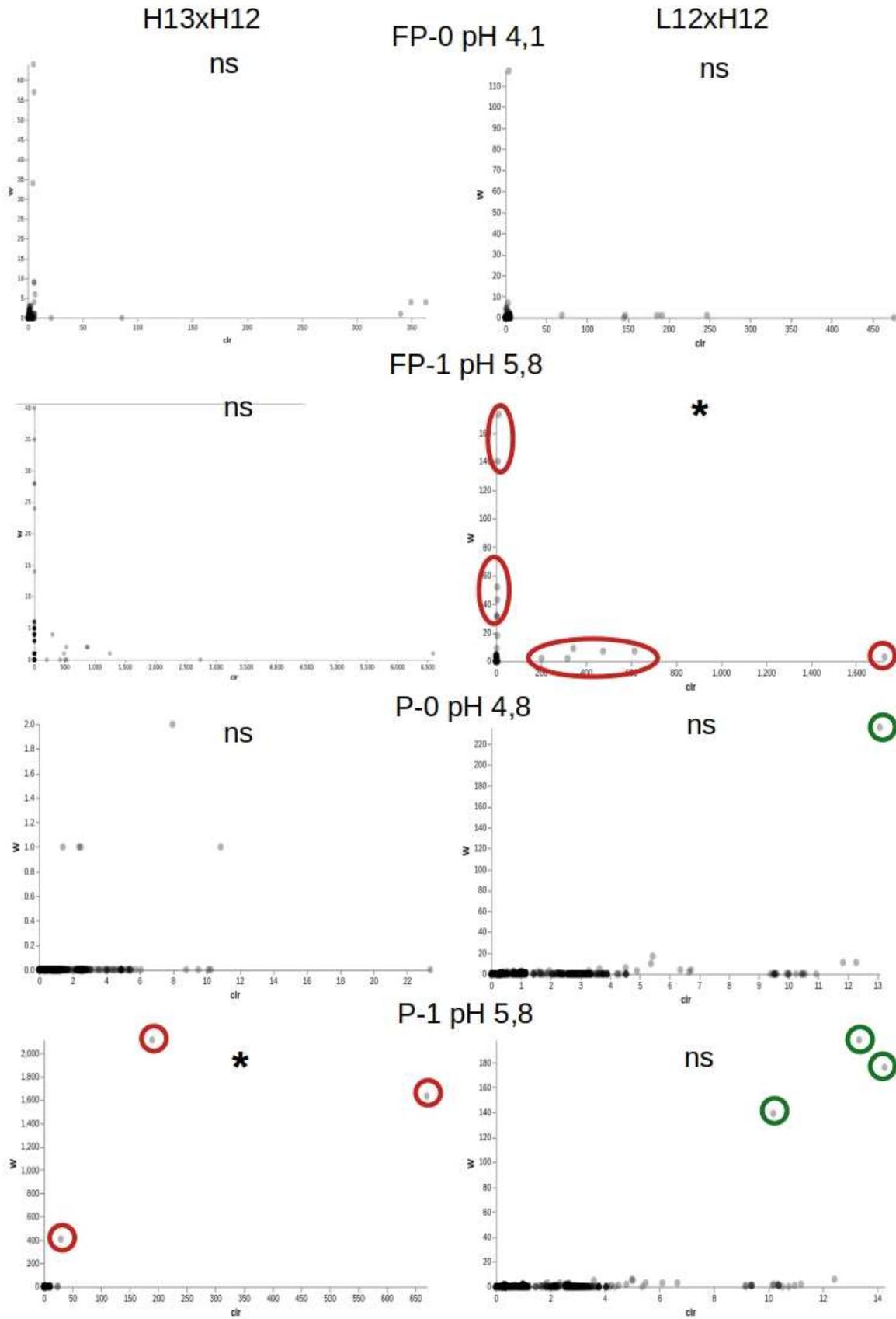


Figura S3 - análise de rarefação dos dados de sequenciamento das amostras de SIP, inclui regiões de alta e baixa afinidade de ambos solos e tratamentos de pH. Pontos da rarefação representados por *box-plots*

Figura S4 ([próxima página](#)) - análises ANCOM de diferenças significativas na abundância relativa de ASVs entre amostras de DNA de alta densidade das incubações com $^{13}\text{CH}_4$ (H13) e com $^{12}\text{CH}_4$ (H12), e no controle, de baixa densidade (L12) vs alta densidade (H12). * indicam os tratamentos com diferenças significativas. Círculos vermelhos destacam ASVs diferenciadas nos tratamentos com diferenças significativas e círculos verdes sequências que se destacavam nos tratamentos sem diferença significativa, mas com grande intensidade e consistência. ns = não significativo, FP = Floresta Primária e P = Pastagem



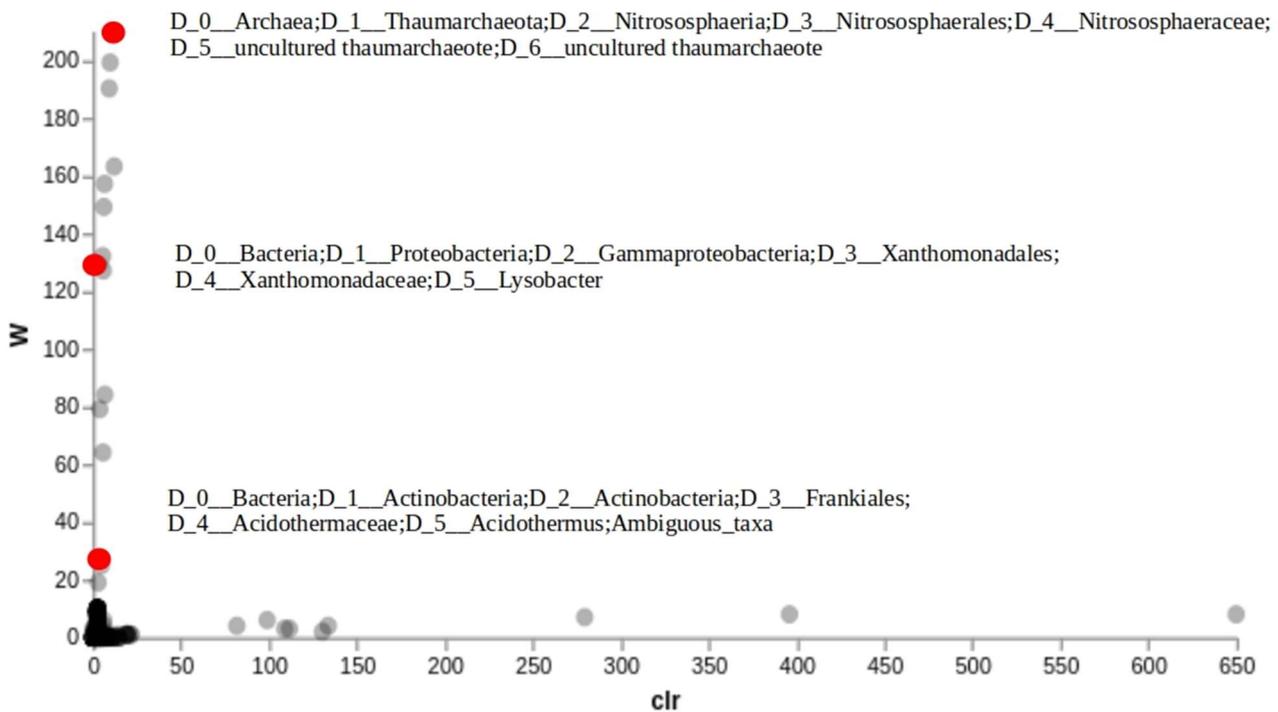


Figura S5 - análises ANCOM de ASVs de amostras de solo de Floresta com acidez corrigida, comparando DNA de alta densidade das incubações com $^{13}\text{CH}_4$ (H13) com as de baixa densidade (L13). Círculos vermelhos destacam ASVs diferenciadas significativamente, que acumulam as características: $W > 10$, não apresentaram diferença entre L12xH12 e a abundância relativa em H13 é maior que em L13

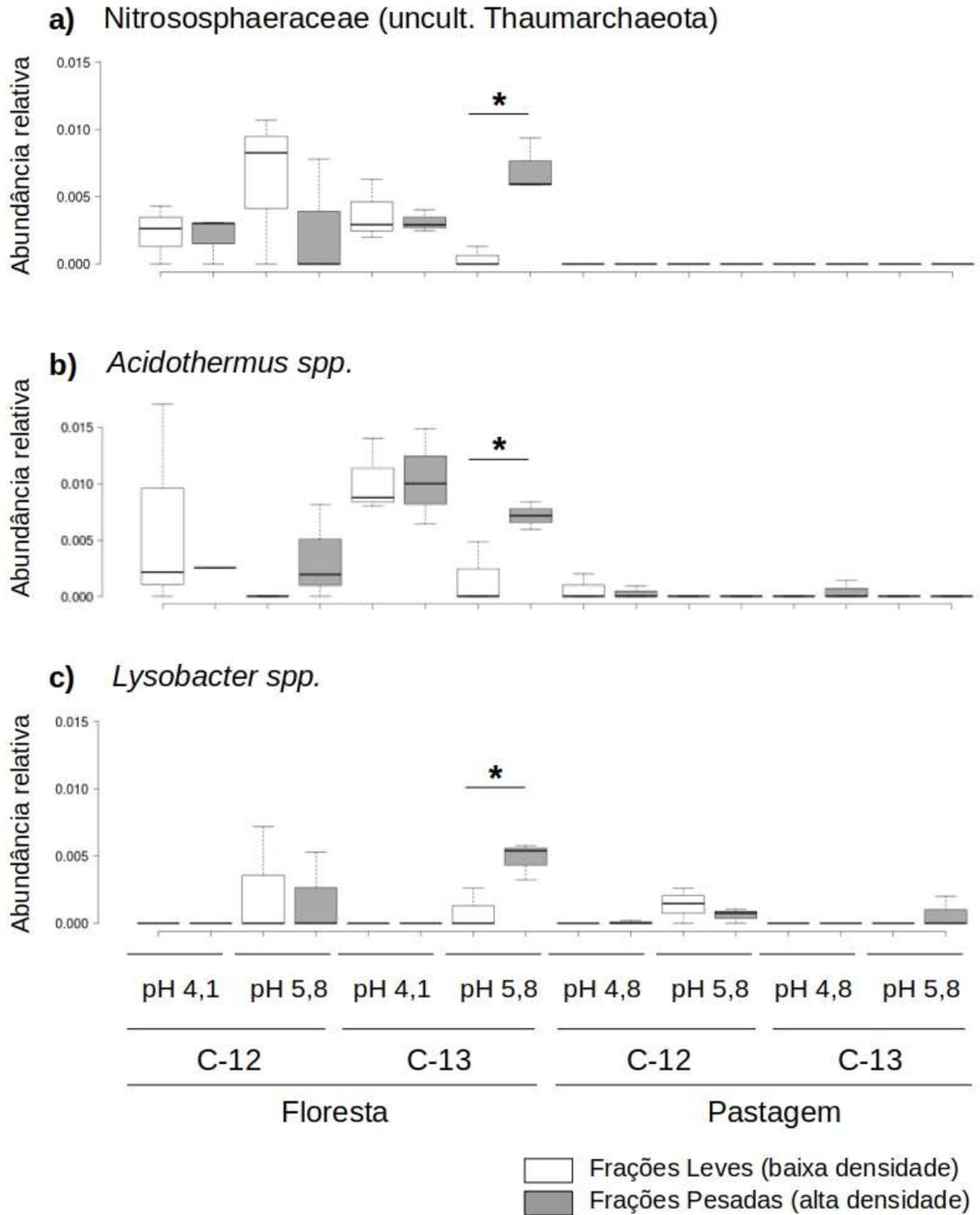


Figura S6: abundância relativa das ASVs de a) *Nitrososphaeraceae*, b) *Acidothermus sp.* e c) *Lysobacter sp* entre regiões de alta e baixa densidade após análise de SIP * indicam diferenças significativas (Tukey HSD; $p < 0,05$)

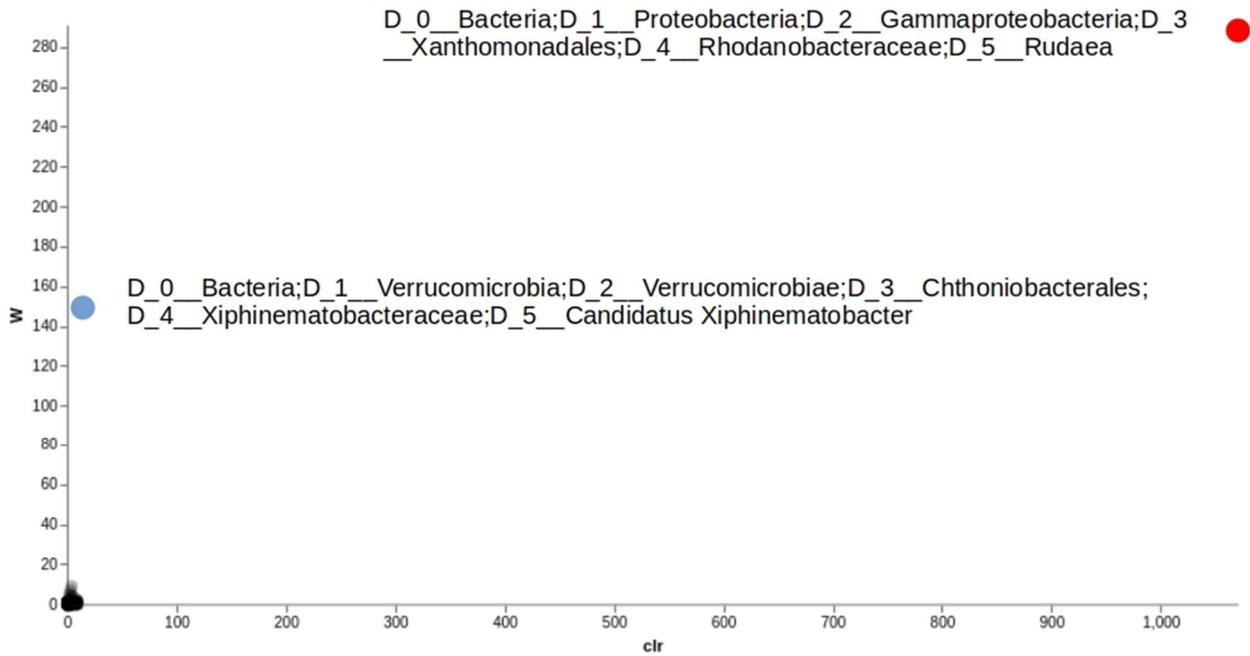


Figura S7 - análises ANCOM de ASVs de amostras de solo de Pastagem com acidez corrigida, comparando DNA de muito alta densidade das incubações com ¹²CH₄ (VH12) com as de baixa densidade e alta densidade (L12 e H12). Círculos vermelhos destacam ASVs diferenciadas significativamente e enriquecidas em VH12 e azuis em L12/H12

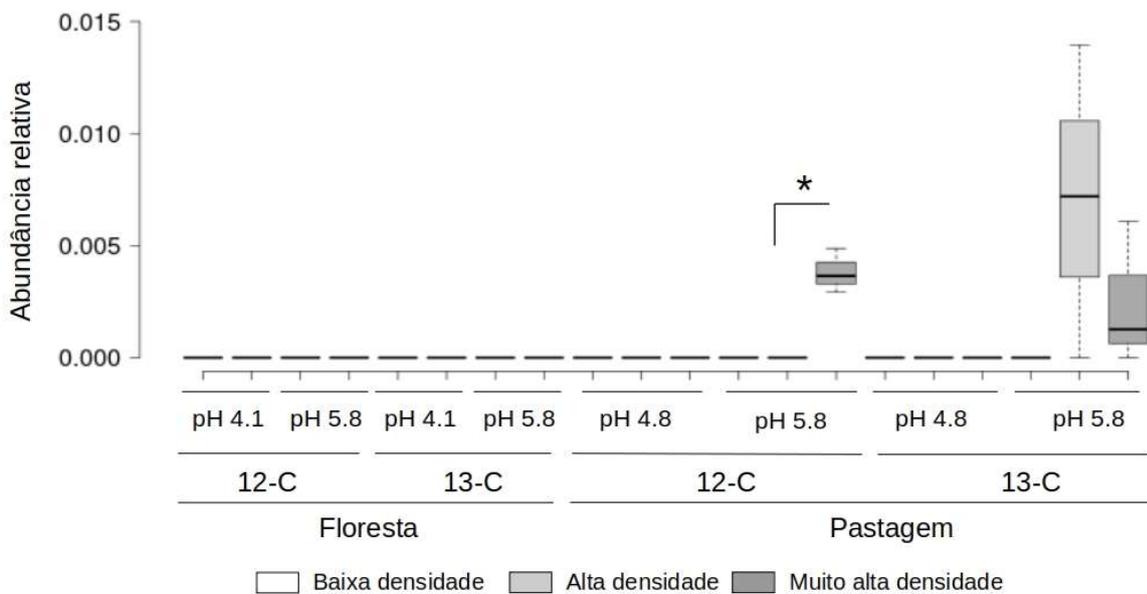


Figura S8 - abundância relativa de ASVs de *Rudaea sp.* em regiões de diferentes densidades após técnica de SIP. * indicam diferenças significativas (Tukey HSD; p<0,05)