

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

**Influência da cobertura vegetal nas comunidades bacterianas em Terra  
Preta de Índio na Amazônia Central brasileira**

Versão corrigida

**AMANDA BARBOSA LIMA**

**Piracicaba**

**2012**

**AMANDA BARBOSA LIMA**

**Influência da cobertura vegetal nas comunidades bacterianas em Terra  
Preta de Índio na Amazônia Central brasileira**

Versão corrigida

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

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no  
Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Siu Mui Tsai

Co-orientador: Dr. Wenceslau Geraldes Teixeira  
(EMBRAPA Solos)

**Piracicaba  
2012**

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

**Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Lima, Amanda Barbosa

Influência da cobertura vegetal nas comunidades de bactérias em Terra Preta de Índio na Amazônia Central brasileira / Amanda Barbosa Lima; orientadora Siu Mui Tsai, co-orientador Wenceslau Geraldes Teixeira. - - Piracicaba, 2012.

116 p.: il.

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

1. Biologia molecular 2. Dados de sequência molecular 3. Ecologia microbiana 4. Ecologia do solo 5. Solo tropical I. Título

CDU 579.26 : 577.2

Ao Marco,

Minha família (em ambos os lados do mundo) e

Cada um dos meus mentores.

***DEDICO***



## AGRADECIMENTOS

A incrível jornada de escrever esta tese de doutorado só foi possível com o carinho e o apoio contínuo dos meus orientadores, colegas, amigos e familiares.

Em primeiro lugar, quero agradecer de coração os meus mentores deste trabalho pelo ambiente de trabalho me proporcionaram. **Tsai**, obrigada por toda a confiança que você depositou em mim antes mesmo de saber se eu seria capaz de realizar qualquer pesquisa em biologia molecular. Você sempre me ensinou a apreciar o bom trabalho científico, me iluminou através de seu amplo conhecimento e sua intuição profunda. Sua alegria e entusiasmo com sua pesquisa e ensino tem sido uma inspiração para mim. **Wenceslau**, agradeço pela oportunidade de trabalhar no seu grupo de pesquisa antes de iniciar o doutorado. Seu positivismo e entusiasmo nesta pesquisa de doutorado foi muito importante para mim, e me ajudou a tomar a decisão de iniciar esta jornada de estudos envolvendo as Terras Pretas de Índio. Obrigada por compartilhar os seus conhecimentos em solos da Amazônia, por suas contribuições nesse trabalho e pelas várias discussões entusiasmadas. **Gesche**, *it was wonderful and enjoyable being your sandwich PhD student. Working in your research group was a memorable experience. I am also thankful for the inspiring example you have provided me as a successful researcher. Your optimism and constructive feedback kept me motivated to stay focused and productive. Thank you for sharing your great knowledge on denitrifiers with me.*

É um prazer agradecer aos meus ex-mentores, **Bete** e **Klaus**, pelo incentivo e apoio constantes. Obrigada por escrever cartas, pelos conselhos sábios e pela grande ajuda durante as aplicações nas bolsas do doutorado.

Também quero expressar a minha felicidade por ter compartilhado grandes momentos durante o doutorado com pessoas maravilhosas (alguns que são grandes amigos até hoje) que contribuíram imensamente para o meu tempo profissional e pessoal. Obrigada a todos que eu encontrei e compartilhei vários momentos alegres no CENA/USP, Embrapa Amazônia Ocidental e MPI-Marburg. Todos esses grupos têm sido uma fonte de amizade, assim como ótimos companheiros e colaboradores. Eu hesito em incluir uma lista, pois eu certamente poderei omitir alguns que mereçam ser mencionados. Mas, eu sou especialmente grata às minhas amigas da Terra Preta, **Fabi**, **Mari** e **Maju**, pela amizade e apoio (profissional e pessoal) que foi muito importante durante meu tempo em Piracicaba. **Acácio** (*roomie*) e **Lucas**, obrigada por toda a ajuda durante o doutorado e amizade. Meus sinceros agradecimentos ao **Elias**, **Chiquinho**, **Fábio** e **Wagner** pelo incrível apoio e contribuição no laboratório de biologia celular e molecular. **Lud**, a melhor secretária *multi-tasker*, obrigada por seu apoio, energia positiva e amizade. *Special thanks goes also to Gesche's lab group (Jan, Kristoph, Sabine). Thank you for your help in the lab, great patience (especially at understanding my rusty german) and the very warm working environment. Jenny and Judith, thank you for keeping a good karma around us. Your professional and personal support during my stay at MPI was very important to me. Shaka!*

Sou grata à todos os colaboradores de outros grupos de pesquisa por compartilhar seus conhecimentos e suporte técnico. Obrigada ao **Julio** (biomassa microbiana), **André** e **Denise** (Biolog), **Alessandra** (análise Biolog), **Luiz Augusto** (experimento rizosfera), **Prof. Tiedje**, **Eiko** e **Fran** (pirosequenciamento), e **Bellinda** (qPCR).

Gostaria também de agradecer à bibliotecária **Marília** pela ajuda na edição e revisão da tese, e à todos os funcionários do "**Apoio Acadêmico e pós-graduação do CENA/USP**" pelo apoio durante o doutorado.

Sinceros agradecimentos às fontes de financiamento que fizeram esse doutorado possível de ser realizado. Obrigada à **FAPEAM** - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas e ao **DAAD** - Serviço Alemão de Intercâmbio Acadêmico. Obrigada também ao **CENA/USP**, **Embrapa Amazônia Ocidental** e **Max Planck Institute for Terrestrial Microbiology**.

E, finalmente, agradeço à minha **família** (no Brasil e na Alemanha), ao **Marco** e aos meus maravilhosos **amigos** pelo constante apoio, amor e alegrias. Obrigada pela compreensão durante os vários períodos de ausência. Obrigada! *Danke!*

## RESUMO

LIMA, A. B. **Influência da cobertura vegetal nas comunidades bacterianas em Terra Preta de Índio na Amazônia Central brasileira**. 2012. 116 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

As Terras Pretas de Índio (TPIs) na Amazônia Brasileira são altamente férteis e o seu conteúdo químico parece não exaurir mesmo em condições de floresta tropical. Por essa razão, são frequentemente procuradas pelas populações locais para o cultivo de subsistência. A importância das comunidades microbianas tem aumentado o interesse em compreender a relação entre o uso da terra, as comunidades de plantas, os micro-organismos e os processos do ecossistema. Portanto, o objetivo principal desta pesquisa foi investigar as comunidades bacterianas sob a influência da cobertura vegetal em sistemas de uso da terra (floresta secundária e plantio de mandioca) e na rizosfera de plantas leguminosas nativas em comunidades bacterianas nas TPIs. Além disso, investigou-se também as bactérias desnitrificantes nesses solos. A área de estudo está localizada na Estação Experimental do Caldeirão, pertencente à Embrapa Amazônia Ocidental, no município de Iranduba-AM. A funcionalidade da comunidade bacteriana foi determinada pela Análise de Perfil Fisiológico da Comunidade Microbiana (CLPP), a estrutura da comunidade bacteriana foi acessada por Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP), a composição e distribuição das comunidades bacterianas foram determinadas por sequenciamento em larga escala (pirosequenciamento), e para quantificar as bactérias desnitrificantes foi utilizada a técnica de PCR quantitativa (qPCR). Os estudos foram realizados no laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA / USP) e no departamento de Biogeoquímica (Max Planck Institute for Terrestrial Microbiology). A análise de T-RFLP mostrou que o uso da terra e a sazonalidade afetaram as comunidades bacterianas nas TPIs, e mostrou também um claro efeito da rizosfera nas comunidades bacterianas. CLPP demonstrou que a atividade funcional da TPI não foi afetada pela sazonalidade. Além disso, a tecnologia de pirosequenciamento foi uma ferramenta importante para diferenciar filotipos raros. Diferenças distintas de alguns filos bacterianos da rizosfera foram observadas, indicando que a zona da raiz contribui para moldar essas comunidades. A abundância relativa do gene *nirK* não foi afetada pelo uso da terra nos dois tipos de solos. Alterações na estrutura das comunidades dos genes *nirK* e *nosZ* foram observadas em ambos os tipos de solos. As comunidades desnitrificantes na TPI pareceram ser mais influenciadas pelo uso da terra do que pela sazonalidade, e o solo adjacente foi mais influenciado pelas variações de sazonalidade.

Palavras-chave: Terra Preta de Índio. Rizosfera. Bactéria. Desnitrificantes. CLPP. T-RFLP. qPCR. Pirosequenciamento.





## ABSTRACT

LIMA, A. B. **Effects of vegetation cover on bacterial communities of Amazonian Dark Earth in Central Brazilian Amazon**. 2012. 116 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

Amazonian Dark Earths (ADEs) in the Brazilian Amazon are highly fertile and its chemical content seems not to get depleted even under tropical humid conditions. For this reason, these soils are frequently searched by local population for subsistence farming. The importance of microbial communities has grown the interest in understanding the relationship between land use, plant communities, microorganisms, and ecosystem processes. Therefore, the main objective of this research was to investigate the effect of vegetation cover in land use systems (secondary forest and cassava plantation) and rhizosphere of native leguminous plants on bacterial communities of ADEs. Furthermore, it was also aimed to investigate denitrifying bacteria in these soils. The study area is located at the Experimental Station of Caldeirão, belonging to Embrapa Amazônia Ocidental, Iranduba, AM. The bacterial community function was determined by Community Level Physiological Profile (CLPP), the bacterial community structure was assessed by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP), the bacterial community composition and distribution by high-throughput sequencing (pyrosequencing), and the quantification of denitrifier bacteria by Quantitative PCR (qPCR). The studies were performed in the Laboratory of Cell and Molecular Biology (CENA/USP) and the Department of Biogeochemistry (Max Planck Institute for Terrestrial Microbiology). T-RFLP analysis showed that land use and seasonality affected bacterial communities in ADE, and also showed a clear rhizosphere effect on bacterial communities. CLPP have shown that ADE functional activity was not affected by seasonality. Furthermore, pyrosequencing technology was an important tool to differentiate rare phylotypes. Distinct differences of some rhizosphere bacterial phyla were also observed, indicating that the root zone contributed to shape these communities. The relative abundance of *nirK* gene was not affected by land use in both studied soils. Alterations in the community structure of *nirK* and *nosZ* genes were observed for both soils. ADE denitrifying communities seemed to be more affected by land use than seasonality, and the adjacent soil was more influenced by seasonal variations.

Key-words: Amazonian Dark Earth. Rhizosphere. Bacteria. Denitrifiers. CLPP. T-RFLP. qPCR. Pyrosequencing.



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
1.1 Terra Preta de Índio .....	13
1.2 O nitrogênio no solo .....	14
1.3 Influência das plantas nos micro-organismos do solo .....	15
1.4 Estrutura e diversidade de comunidades microbianas do solo .....	17
1.5 Diversidade funcional de comunidades microbianas .....	18
1.6 Objetivos .....	19
1.6.1 Geral .....	19
1.6.2 Específicos .....	20
Referências .....	20
RESUMO .....	27
ABSTRACT .....	28
2.1 Introdução .....	29
2.2 Materiais e métodos .....	31
2.2.1 Áreas de estudo e amostragem .....	31
2.2.2. Determinação das propriedades do solo .....	32
2.2.3 Biolog .....	32
2.2.4 Extração de DNA, amplificação do gene 16S rRNA, T-RFLP e pirosequenciamento. ....	33
2.2.5 Análise das propriedades químicas do solo, biomassa microbiana e Biolog .....	34
2.2.6 Análise dos dados de T-RFLP .....	35
2.2.7 Análise dos dados de pirosequenciamento .....	36
2.3 Resultados .....	36
2.3.1 Propriedades do solo .....	36
2.3.2 Função da comunidades bacteriana .....	39
2.3.3 Estrutura da comunidade bacteriana .....	41
2.3.4 Composição da comunidade bacteriana .....	44
2.4 Discussão .....	49
2.4.1 Variabilidade nas propriedades do solo .....	49
2.4.2 Biolog .....	50
2.4.3 Sazonalidade, uso da terra e propriedades do solo moldam a estrutura das comunidades bacterianas do solo .....	51
2.4.4 A composição das comunidades bacterianas quando afetadas pelo uso da terra .....	52
2.5 Conclusões .....	54
Referências .....	55
RESUMO .....	63
ABSTRACT .....	64
3.1 Introdução .....	65
3.2. Materiais e métodos .....	67
3.2.1 Experimento em casa de vegetação .....	67
3.2.1 Propriedades químicas da rizosfera e solo controle e peso da biomassa seca da parte aérea .....	67
3.2.3 Análise das propriedades químicas e biomassa seca da parte aérea .....	68
3.2.4 Extração de DNA da rizosfera e solos controle .....	68
3.2.5 T-RFLP do gene 16S rRNA de bactéria .....	68

3.2.6 Pirosequenciamento do gene 16S rRNA de bactéria .....	69
3.2.7 Análise de pirosequenciamento .....	69
3.3 Resultados .....	70
3.3.1 Propriedades do solo e da rizosfera, e biomassa seca da parte aérea .....	70
3.3.2 Estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera e solo controle .....	72
3.3.4 Composição bacteriana da rizosfera e solo controle .....	74
3.3.5 Relação entre a estrutura e a composição da comunidade bacteriana com as propriedades do solo e biomassa seca da parte aérea .....	76
3.4 Discussão .....	78
3.4.1 Variação nas propriedades do solo e biomassa seca da parte aérea .....	78
3.4.2 Influência das plantas leguminosas na estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera .....	79
3.4.3 A composição de bactérias em associação com as raízes de plantas leguminosas .....	80
3.4.4 Relação entre as comunidades bacterianas da rizosfera e as propriedades do solo .....	81
3.5 Conclusões .....	82
Referências .....	83
RESUMO .....	89
ABSTRACT .....	90
4.1 Introdução .....	91
4.2 Materiais e métodos .....	93
4.2.1 Área de estudo, amostragem e propriedades químicas do solo .....	93
4.2.2 Extração de DNA do solo .....	94
4.2.3 PCR quantitativa .....	94
4.2.4 Análise da PCR quantitativa .....	94
4.2.5 T-RFLP .....	94
4.2.6 Análise de T-RFLP .....	95
4.3 Resultados .....	97
4.3.1 Abundância dos genes <i>nirK</i> e <i>nosZ</i> .....	97
4.3.2 Análise de T-RFLP dos genes <i>nirK</i> e <i>nosZ</i> .....	99
4.3.3 Correlação entre as propriedades do solo e as comunidades desnitrificantes .....	103
4.4 Discussão .....	107
4.4.1 Abundância das bactérias desnitrificantes .....	107
4.4.2 Efeitos do uso da terra e sazonalidade na estrutura das comunidades de bactérias desnitrificantes .....	108
4.4.3 Relação entre a abundância e estrutura de bactérias desnitrificantes com as propriedades do solo .....	109
4.5 Conclusões .....	110
Referências .....	111

## 1 Introdução

### 1.1 Terra Preta de Índio

A floresta tropical densa de terra firme, que cobre a maior parte da região amazônica, se situa predominantemente sobre solos de baixa fertilidade química natural, e deve sua sobrevivência e produtividade à sua alta diversidade vegetal, composta por espécies nativas adaptadas às condições climáticas e nutricionais do solo. Essas espécies dependem de uma eficiente reciclagem da matéria orgânica produzida pela própria floresta (JORDAN, 1985). A reciclagem da matéria orgânica depende fortemente da atividade biológica que, em condições naturais na floresta, é muito favorecida pela temperatura e umidade apropriadas da região.

Nesta mesma região existem áreas de solos afetadas consideravelmente pelo homem pré-histórico com altos teores de P, Ca, Mg, Zn e Mn e com teor elevado de matéria orgânica estável (KERN, 1988; KERN; KÄMPF, 1989; KERN, 1996; COSTA; KERN, 1999). Tais solos antropogênicos são conhecidos como Terra Preta de Índio (TPI), Terra Preta Arqueológica ou Terra Preta (KERN; KÄMPF, 1989). Aparentemente, as TPIs formam microecossistemas próprios que não se esgotam rapidamente, mesmo nas condições tropicais em que estão expostos ou sob uso agrícola.

Essas áreas de solos altamente férteis formadas no passado parecem não exaurir seu conteúdo químico mesmo em condições de floresta tropical, o que contrasta com a maioria dos solos encontrados nesta região. Por essa razão, são frequentemente procurados pelas populações locais para o cultivo de subsistência como mandioca, milho, banana, mamão, entre outros. Fator que dificulta sensivelmente o estudo da formação da TPI. Além disso, ainda se desconhece as técnicas utilizadas pelo homem pré-histórico na transformação de solos pouco férteis em solos altamente produtivos.

Dados sobre alterações da diversidade genética e/ou metabólica dos micro-organismos em TPI são escassos, mas poderiam ser úteis para avaliar o impacto causado pela ação antrópica nestes ecossistemas peculiares. Tanto análises de tamanho e atividade quanto de estrutura das comunidades microbianas podem contribuir significativamente para a geração de índices de qualidade biológica de solos.

## 1.2 O nitrogênio no solo

Os ciclos biogeoquímicos, em particular o ciclo do N, estão intimamente ligados à produtividade florestal e agrícola. Na região amazônica existe a tendência natural dos ecossistemas de perder N via solução do solo, devido ao intenso mecanismo de lixiviação, drenagem e os rápidos mecanismos de decomposição (SANTOS; RIBEIRO, 1975). Em florestas, onde a disponibilidade de N é alta, mudanças sazonais de umidade do solo resultam em maiores perdas de  $N_2O$  durante a estação chuvosa, enquanto na estação seca, os maiores fluxos são de NO (GARCIA-MONTIEL et al., 2001).

Os micro-organismos são responsáveis por diferentes reações envolvidas no ciclo do nitrogênio, como a fixação do N, a nitrificação e a desnitrificação. A microbiologia do solo possui um papel fundamental na função dos ecossistemas; em maior parte dos ecossistemas terrestres o N limita o crescimento da planta, e, portanto a produção líquida primária (capacidade produtiva do ecossistema) pode ser regulada pelas taxas de transformação do N produzidas pelos micro-organismos do solo em formas utilizáveis pela planta. No entanto, diversas formas de N são poluentes, deste modo as transformações de N pelos micro-organismos do solo também podem afetar a saúde humana e do ambiente. O melhor entendimento da transformação do N e dos micro-organismos do solo participantes nesse processo é essencial para o manejo e produtividade do ecossistema (ROBERTSON; GROFFMAN, 2007).

As bactérias transformadoras da matéria orgânica são de extrema importância para os processos de nitrificação (a conversão de amônio a nitrato por micro-organismos quimiolitotróficos ou quimiorganotróficos). Neste processo, ocorre a liberação de  $H^+$  para o meio, sendo esta a fase acidificante do processo de decomposição da matéria orgânica (LUCHESE; FÁVERO; LENZI, 2001). A calagem (estimula a nitrificação em solos ácidos) e a aplicação de fertilizantes (a aplicação de quantidades elevadas de fertilizantes amoniacais inibe a segunda fase da nitrificação) podem interferir na nitrificação em solos (VICTORIA; PICCOLO; VARGAS, 1992). Portanto, a identificação dos fatores ambientais que influenciam a nitrificação e a composição de bactérias nitrificantes são essenciais para compreender o ciclo do N e os impactos de atividades humanas.

Além disso, a desnitrificação (processo pelo qual o nitrato é reduzido a formas gasosas) é também um importante processo do ciclo do N, o qual influencia a fertilidade do solo e da água e a química da atmosfera (KNOWLES, 1982; ZUMFT, 1992). Além de causar perda do N disponível para a cultura, o processo de desnitrificação é um potencial contaminante do ambiente, visto que o N<sub>2</sub>O (importante produto intermediário do processo) é um dos gases envolvidos na destruição da camada de ozônio (CRUTZEN, 1981). A desnitrificação e a nitrificação são processos biológicos envolvidos nas emissões de N<sub>2</sub>O em solos agrícolas; no entanto, a desnitrificação tem sido considerada como o processo dominante na emissão de N<sub>2</sub>O em solos agrícolas (AULAKH; RENNIE; PAUL, 1984; MATHIEU et al., 2006).

As bactérias desnitrificantes são bem distribuídas no ambiente do solo e pertencem a diversos gêneros (BRAKER; TIEDJE, 2003). Desde 1998, vários estudos têm apresentado o uso dos genes *nirK* e *nirS* como marcadores moleculares de bactérias desnitrificantes para estudar sua diversidade em diferentes ambientes (AVRAHAMI; CONRAD; BRAKER, 2003; BRAKER; FESEFELDT; WITZEL, 1998; BRAKER et al., 2000; 2001; LIU et al., 2003; PRIEME; BRAKER; TIEDJE, 2002). Revisões de literatura têm identificado a necessidade de relacionar a estrutura, abundância e função de populações desnitrificantes com as atuais taxas de desnitrificação para determinar a influência da população microbiana nesse fundamental processo (PHILIPPOT; HALLIN, 2005; PHILIPPOT, 2006).

### **1.3 Influência das plantas nos micro-organismos do solo**

A mudança do uso da terra representa um dos maiores impactos em ecossistemas terrestres, afetando drasticamente as comunidades de plantas e diminuindo a diversidade biológica (VITOUSEK et al., 1997). Apesar da existência de diversos estudos sobre os efeitos da mudança na composição de espécies de plantas nas funções do ecossistema (TILMAN; WEDIN; KNOPS, 1996; HOOPER; VITOUSEK, 1997; TILMAN, 1999), ainda é pouco conhecido como os micro-organismos, mediadores chave nesse processo, respondem às mudanças na composição de plantas.



O tipo de planta é um fator determinante da estrutura de comunidade microbiana do solo, pois as plantas são os maiores fornecedores de formas específicas de C e fontes de energia (GARBEVA; van VEEN; van ELSAS, 2004; BREMER et al., 2007). Desse modo, os tipos de vegetação bem como as condições ambientais tornam-se fatores que determinam a quantidade e qualidade do material depositado no solo, influenciando a heterogeneidade e taxa de decomposição (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002) que atuam diretamente sobre a comunidade microbiana do solo. A diversidade estrutural e de atividade do sistema radicular podem estar igualmente envolvidas na deposição diferencial de compostos orgânicos no solo. Exsudatos radiculares são conhecidos como um dos mais importantes fatores que afetam a comunidade microbiológica. As raízes saudáveis liberam no solo compostos orgânicos solúveis, como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, os quais atraem populações microbianas, beneficiando a decomposição da liteira e a conservação de nutrientes no ecossistema (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

O melhor entendimento sobre os efeitos das mudanças antropogênicas em comunidades microbianas é importante, pois os micro-organismos regulam muitos processos do ecossistema, incluindo a decomposição da matéria orgânica, a mineralização dos nutrientes, e a emissão e consumo de gases traço. A atual importância das comunidades microbianas tem aumentado o interesse em compreender a relação entre o uso da terra, as comunidades de plantas, os micro-organismos, e os processos do ecossistema (VAN DER HEIJDEN et al., 1998; CAVIGELLI; ROBERTSON, 2000; NAEEM et al., 2000; ZAK et al., 2003; RUDGERS, 2004).

Existe também um grande interesse em se conhecer as comunidades microbianas da rizosfera, devido o seu papel chave na saúde da planta e na função do ecossistema. A diversidade de micro-organismos da rizosfera é parcialmente dependente do tipo de planta (MARSCHNER et al., 2001). Micro-organismos associados ao sistema radicular das plantas podem responder a quantidade e composição de exsudatos da raiz permitindo a formação de comunidades microbianas associadas à rizosfera de plantas específicas (HAICHAR et al., 2008; NUNAN et al., 2005; KOWALCHUK et al., 2002). No entanto, os exsudatos das raízes dependem também das condições de crescimento e estágio de desenvolvimento das plantas podendo mascarar os efeitos específicos de cada espécie (DUINEVELD et al., 1998; SMALLA et al., 2001).

#### 1.4 Estrutura e diversidade de comunidades microbianas do solo

As comunidades de organismos do solo, incluindo as bactérias, os fungos, protozoários e animais invertebrados, são extremamente diversas. O número de espécies de bactérias dos solos descrita na literatura vem crescendo nos últimos anos em virtude do desenvolvimento de ferramentas de biologia molecular que possibilitam a análise de sequências de DNA a partir de material genômico extraído diretamente do solo. As novas técnicas evidenciaram a enorme diversidade genética de bactérias presentes em apenas 1 g de solo. Estima-se que em 1 g de solo ocorram entre 20 e 40 mil espécies bacterianas (TORSVIK et al., 1990). Poucos dados das regiões tropicais estão disponíveis; onde se suspeita que os mais elevados níveis de diversidade possam ser encontrados. A diversidade biológica da comunidade dos organismos subsuperficiais, que normalmente é mais elevada do que aquela sobre a superfície, geralmente é ignorada nos exames de biodiversidade de ecossistemas, podendo causar resultados errôneos.

Alguns fatores têm contribuído para a falta de conhecimento sobre a diversidade microbiana em amostras ambientais. São, em grande parte, relacionados às limitações dos métodos tradicionalmente utilizados para o isolamento e cultivo de micro-organismos em laboratório (PALLERONI, 1996). Dados derivados de estudos comparativos apontam para o fato de que apenas uma pequena fração dos micro-organismos na natureza, entre 0,1 a 1%, dependendo do habitat, são cultivados através do emprego de métodos microbiológicos convencionais (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995). Novas técnicas moleculares baseadas na caracterização de ácidos nucléicos extraídos do solo oferecem grande potencial para investigar a vasta porção da comunidade microbiana não cultivável (CRECCHIO et al., 2004). Elas são independentes de cultivo e, de acordo com sua sensibilidade, podem detectar espécies, gêneros, famílias ou mesmo grupos taxonômicos maiores (NANNIPIERI et al., 2003).

Dentre as técnicas moleculares estão a análise de T-RFLP (Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição Terminal), o uso de cromossomos bacterianos artificiais (BAC) para estudo metagenômico e a amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) de regiões conservadas do gene 16S e 18S rDNA (BORNEMAN; TRIPLETT, 1997; NANNIPIERI et al., 2003; KIRK et al., 2004). A técnica de T-RFLP vem sendo amplamente utilizada devido à alta reprodutibilidade e ao acesso a um grande número de unidades

taxonômicas operacionais (UTOs) (OSBORN; MOORE; TIMMIS, 2000). Esta técnica vem sendo empregada para caracterizar comunidades microbianas em diferentes ambientes, como solos de floresta, solos poluídos, sedimentos, estruturas de plantas, trato digestivo de minhocas, entre outros (THIES, 2007). Além disso, é um método capaz de identificar sensíveis mudanças nas estruturas de comunidades microbianas do solo, além de permitir a análise de uma grande quantidade de amostras (LIU et al., 1997; TIEDJE et al., 1999).

Uma nova abordagem molecular de sequenciamento de DNA é o pirosequenciamento. Esse método consiste na síntese de DNA a partir de complexo de reações que inclui enzimas (ATP sulfúrilase e luciferase) durante a reação de polimerização (RONAGHI et al., 1996). Durante o pirosequenciamento, diferentes fitas molde são amplificadas separadamente por PCR e não compete por primers ou polimerase, e em princípio isto resulta em menor custo e viés (*bias*) do que em uma reação única de PCR. Esse recente avanço em sequenciamento de DNA tem permitido uma maior rapidez nas análises de diversidade e distribuição de comunidades microbianas do solo (LIU et al., 2007; SOGIN et al., 2006). Estes estudos detectaram *taxas* “raros” que não são possíveis de serem detectados em pequenas bibliotecas utilizando as técnicas convencionais de clonagem (SOGIN et al., 2006) e podem incluir também organismos cultiváveis (PEDROS-ALIO, 2007).

### **1.5 Diversidade funcional de comunidades microbianas**

A diversidade funcional é um aspecto de toda a diversidade do solo, e envolve diversas atividades. A relação entre a diversidade e função microbiana ainda não é completamente conhecida, porém sabe-se que a biodiversidade pode influenciar a estabilidade, produtividade, e resiliência do ecossistema. Após eventos de perturbação (e.g. queimada, erupção vulcânica ou deslizamentos) mudanças marcantes têm sido observadas na diversidade funcional em ecossistemas de solos (SCHIPPER et al., 2001).

Atualmente existem diversos métodos para se estudar a diversidade microbiana, na qual a maior parte destes envolve estudos na genética e diversidade taxonômica (THERON; CLOETE, 2000; ERCOLINI, 2004). No entanto, ainda existem poucos métodos investigando a diversidade funcional de comunidades microbianas. Este aspecto pode ser explorado com o Biolog Ecoplate. O uso prático desse sistema (inicialmente desenvolvido para identificar e caracterizar isolados de bactérias), para estudar a diversidade funcional de amostras

ambientais, foi introduzido por GARLAND; MILLS (1991). Diversos tipos de *plates* já estão sendo comercializados, principalmente o Biolog Ecoplate, para aplicações ecológicas. A atividade potencial de comunidades de bactérias é estudada através da utilização de padrões de fontes de carbono. Cada *plate* possui 31 substratos diferentes (mais o controle), contendo o corante tetrazolium que, devido à respiração das bactérias, é reduzido a formazan. A presença de formazan (coloração arroxeadada), quantificada por medições de densidade ótica, é um indicador de utilização das fontes de carbono.

Essa abordagem tem sido aplicada em diversos estudos ecológicos de associação solo/planta, incluindo a avaliação de práticas agrícolas em comunidades bacterianas (BOSSIO; SCOW, 1995); a classificação de comunidades bacterianas da rizosfera de plantas sob hidroponia (GARLAND, 1996; GARLAND; MILLS, 1994); e a avaliação da comunidade microbiana na rizosfera de árvores (GRAYSTON; CAMPBELL, 1996). Outro estudo utilizou esse método para avaliar a influência de diferentes tipos de plantas na estrutura de comunidades microbianas da rizosfera (GRAYSTON et al., 1998).

Apesar de ser uma técnica de cultivo, e de não representar necessariamente a atividade de todos os membros da comunidade; no entanto, as avaliações simultâneas de diferentes fontes de carbono, dados automatizados, e o potencial para a rápida comparação de amostras ambientais representam diversas vantagens sobre os métodos de cultura tradicionais (GARLAND, 1996; HAACK et al., 1995). Porém, para interpretar a diversidade funcional ou o potencial metabólico de comunidades microbianas utilizando padrões Biolog de utilização do substrato, é importante compreender os fatores que afetam a utilização do substrato quando diversos micro-organismos estão presentes em placas Biolog Ecoplate.

## **1.6 Objetivos**

### **1.6.1 Geral**

Esta proposta de pesquisa teve como objetivo estudar os efeitos da cobertura vegetal, na função, estrutura e diversidade de bactérias totais e desnitrificantes em TPI a partir de técnicas moleculares e bioquímica.

### 1.6.2 Específicos

- a) Determinar o efeito de sistemas de uso da terra (floresta secundária e plantio de mandioca) e sazonalidade na função, estrutura e diversidade de comunidades bacterianas a partir de técnicas moleculares e bioquímicas;
- b) Determinar a estrutura e diversidade de comunidades bacterianas na rizosfera de duas espécies de plantas leguminosas a partir de técnicas moleculares;
- c) Determinar o efeito de sistemas de uso da terra (floresta secundária e plantio de mandioca) e sazonalidade na estrutura e abundância de bactérias desnitrificantes.

### Referências

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 59, p. 143-169, 1995.

AULAKH, M.S.; RENNIE, D.A.; PAUL, E.A. Gaseous nitrogen losses from soils under zero tillage as compared with conventional tilled system. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 13, p. 130-136, 1994.

AVRAHAMI, S.; CONRAD, R.; BRAKER, G. Effect of soil ammonium concentration on N<sub>2</sub>O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, p. 5685-5692, 2003.

BOSSIO, D.A.; SCOW, K.M. Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 61, p. 4043-4050, 1995.

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

BRAKER, G.; FESEFELDT, A.; WITZEL, K.P. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, p. 3769-3775, 1998.

BRAKER, G.; ZHOU, J.; WU, L.; DEVOL, A.H.; TIEDJE, J.M. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 2096-2104, 2000.

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

BRAKER, G.; TIEDJE, J.M. Nitric oxide reductase (*norB*) genes from pure cultures and environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 3476-3483, 2003.

BREMER, C.; BRAKER, G.; MATTHIES, D.; REUTER, A.; ENGELS, C.; CONRAD, R. Impact of plant functional group, plant species, and sampling time on the composition of *nirK*-type denitrifier communities in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 73, p. 6876-6884, 2007.

CAVIGELLI, M.A.; ROBERTSON, G.P. The functional significance of denitrifier community composition in a terrestrial ecosystem. **Ecology**, Brooklyn, v. 81, p. 1402-1414, 2000.

COSTA, M.L.; KERN, D.C. Geochemical signatures of tropical soils with archaeological black earth in the Amazon. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 66, p. 369-385, 1999.

CRECCHIO, C.; GELSOMINO, A.; AMBROSOL, R.; MINATI, J.L.E.; RUGGIERO, P. Functional and molecular responses of soil microbial communities under differing soil management practices. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1873-1883, 2004.

CRUTZEN, P.J. Atmospheric chemical processes of the oxides of nitrogen, including nitrous oxide. In: DELWICHE, C.C. (Ed.). **Denitrification, nitrification, and nitrous oxide**. New York: Wiley, 1981. p. 17-44.

DUINEVELD, B.M.; ROSADO, A.S.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VENN, J.A. Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of the Crysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, p. 4950-4957, 1998.

ERCOLINI, D. PCR–DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food: a review. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 56, p. 297-314, 2004.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 243-70, 2004.

GARCIA-MONTIEL, D.C.; STEUDLER, P.A.; PICCOLO, M.C.; MELILLO, J.M.; NEILL, C.; CERRI, C. Controls on soil nitrogen oxide emissions from forest and pasture in the Brazilian Amazon. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, DC, v. 15, p. 1021-1030, 2001.

GARLAND, J.L. Patterns of potential C source utilization by rhizosphere communities. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 28, p. 223-230, 1996.

GARLAND, J.L.; MILLS, A.L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 57, p. 2351-2359, 1991.

GARLAND, J.L.; MILLS, A.L. A community-level physiological approach for studying microbial communities. In: RITZ, K.; DIGHTON, J.; GILLER, K.E. (Ed.). **Beyond the biomass: compositional and functional analysis of soil microbial communities**. New York: John Wiley, 1994. p. 77-83.

GRAYSTON, S.J.; CAMPBELL, C.D. Functional biodiversity of microbial communities in the rhizospheres of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and Sitka spruce (*Picea sitchensis*). **Tree Physiology**, Victoria, v. 16, p. 1031-1038, 1996.

GRAYSTON, S.J.; WANG, S.; CAMPBELL, C.D.; EDWARDS, A.C. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 369-378, 1998.

HAACK, S.D.; GARCHOW, H.; KLUG, M.J.; FORNEY, C.J. Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 61, p. 1458-1468, 1995.

HAICHAR, F.Z.; MAROL, C.; BERGE, O.; RANGEL-CASTRO, J.I.; PROSSER, J.I.; BALESSENT, J.; HEULIN, T.; ACHOUAK, W. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. **The ISME Journal**, London, v. 2, p. 1221-1230, 2008.

HOOPER, D.U.; VITOUSEK, P.M. The effects of plant composition and diversity on ecosystem processes. **Science**, Washington, DC, v. 277, p. 1302-1305, 1997.

JORDAN, C.F. **Nutrient cycling in tropical forest ecosystems: principles and their application in management and conservation**. New York: John Wiley & Sons, 1985. 190 p.

KERN, D.C. **Caracterização pedológica de solos com terra arqueológica na região de Oriximiná-PA**. 1988. 231 p. Dissertação (Mestrado em Solos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1988.

KERN, D.C. **Geoquímica e pedoquímica em Sítios Arqueológicos com Terra Preta na Floresta Nacional de Caxiuanã (Portel-PA)**. 1996. 124 p. Tese (Doutorado) - Centro de Geociências, Universidade Federal do Pará, Belém, 1996.

KERN, D.C.; KÄMPF, N. O efeito de antigos assentamentos indígenas na formação de solos com Terra Preta Arqueológica na região de Oriximiná-Pa. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 13, p. 219-225, 1989.

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

KNOWLES, R. Denitrification. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 46, p. 43-70, 1982.

KOWALCHUK, G.A.; BUMA, D.S.; BOER, W. DE; KLINKHAMER, P.G.L.; VAN VEEN, J.A. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 81, p. 509-520, 2002.

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

LIU, X.; TIQUIA, S.M.; HOLGUIN, G.; WU, L.; NOLD, S.C.; DEVOL, A.H.; LUO, K.; PALUMPO, A.V.; TIEDJE, J.M.; ZHOU, J. Molecular diversity of denitrifying genes in continental margin sediments within the oxygen-deficient zone off the Pacific coast of Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 3549-3560, 2003.

LIU, Z.Z.H.; LOZUPONE, C.; HAMADY, M.; BUSHMAN, F.D.; KNIGHT, R. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. **Nucleic Acids Research**, London, v. 35, p. 1-10, 2007.

LUCHESE, E.B.; FÁVERO, L.O.B.; LENZI, E. **Fundamentos da química do solo**. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 2001. 182 p.

MARSCHNER, P.; YANG, C.H.; LIEBEREI, R.; CROWLEY, D.E. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 1437-1445, 2001.

MATHIEU, O.; HÉNAULT, C.; LÉVÊQUE, J.; BAUJARD, E.; MILLOUX, M.J.; ANDREUX, F. Quantifying the contribution of nitrification and denitrification to the nitrous oxide flux using <sup>15</sup>N tracers. **Environmental Pollution**, London, v. 144, p. 933-940, 2006.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. 625 p.

NAEEM, S.; KNOPS, J.M.H.; TILMAN, D.; HOWE, K.M.; KENNEDY, T.; GALE, S. Plant diversity increases resistance to invasion in the absence of covarying extrinsic factors. **Oikos**, Kobenhavn, v. 91, p. 97-108, 2000.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M.T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.E.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 54, p. 655-670, 2003.

NUNAN, N.; DANIELL, T.J.; SINGH, B.K.; PAPERT, A.; MCNICOL, Z.W.; PROSSER, J.I. Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils characterized using molecular techniques. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 71, p. 6784-6792, 2005.

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



PALLERONI, N.J. Microbial diversity and the importance of culturing. In: SAMSON, R.A.; STALPERS, J.A.; VAN DER MEI, D.; STOUTHAMER, A.H. (Ed.). **Culture collections to improve the quality of life**. Baarn, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1996. p. 111-114.

PEDROS-ALIO, C. Dipping into the rare biosphere. **Science**, Washington, DC, v. 315, p. 192-193, 2007.

PHILIPPOT, L.; HALLIN, S. Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 8, p. 234-239, 2005.

PHILIPPOT, L. Use of functional genes to quantify denitrifiers in the environment. **Biochemical Society Transactions**, Essex, v. 34, p. 101-103, 2006.

PRIEME, A.; BRAKER, G.; TIEDJE, J.M. Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, p. 1893-1900, 2002.

ROBERTSON, G.P.; GROFFMAN, P.M. Nitrogen transformations. In: PAUL, E.A. (Ed.). **Soil microbiology, ecology and biochemistry**. New York: Academic Press, 2007. p. 341-364.

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

RUDGERS, J.A. Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. **Ecology Letters**, Oxford, v. 7, p. 42-51, 2004.

SANTOS, A.; RIBEIRO, M.N. Nitrogênio na água do solo do ecossistema Campina Amazônica. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 5, p. 173-182, 1975.

SCHIPPER, L.A.; DEGENS, B.P.; SPARLING, G.P.; DUNCAN, L.C. Changes in microbial heterotrophic diversity along five plant successional sequences. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 2093-2103, 2001.

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

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

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

THERON, J.; CLOETE, T.E. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 26, p. 37-57, 2000.

THIES, J.E. Soil microbial community analysis using terminal restriction fragment length polymorphisms. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 71, p. 579-591, 2007.

TILMAN, D. The ecological consequences of changes in biodiversity: a search for general principles. **Ecology**, Brooklyn, v. 80, p. 1455-1474, 1999.

TILMAN, D.; WEDIN, D.; KNOPS, J. Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystems. **Nature**, London, v. 379, p. 718-720, 1996.

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

VAN DER HEIJDEN, M.G.A.; KLIRONOMOS, M.U.; MOUTOGLIS, P.; STREITWOLF-ENGEL, R.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A.; SANDERS, I.R. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. **Nature**, London, v. 396, p. 69-72, 1998.

VICTORIA, R.L.; PICCOLO, M.C.; VARGAS, A.A.T. O ciclo do nitrogênio. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: SBCS, 1992. p. 105-120.

VITOUSEK, P.M.; ABER, J.D.; HOWARTH, R.W.; LIKENS, G.E.; MATSON, P.A.; SCHINDLER, D.W.; SCHLESINGER, W.H.; TILMAN, D.G. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. **Ecological Applications**, Washington, DC, v. 7, p. 737-750, 1997.

ZAK, D.R.; HOLMES, W.E.; FINZI, A.C.; NORBY, R.J.; SCHLESINGER, W.H. Soil nitrogen cycling under elevated CO<sub>2</sub>: A synthesis of forest FACE experiments. **Ecological Applications**, Washington, DC, v. 13, p. 1508-1514, 2003.

ZUMFT, W.G. The denitrifying prokaryotes. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. **The prokaryotes**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1992. p. 554-582.



## 2 USO DA TERRA E SAZONALIDADE INFLUENCIAM AS COMUNIDADES DE BACTÉRIA DE TERRA PRETA DE ÍNDIO NA AMAZÔNIA CENTRAL BRASILEIRA

### RESUMO

Terra Preta de Índio (TPI) na Amazônia brasileira é a principal evidência deixada por populações indígenas pré-Colombianas, indicando que solos pobres podem ser transformados em solos altamente férteis. Mudanças no uso da terra e sazonalidade são susceptíveis de influenciar as comunidades microbianas, no entanto, pouco se conhece sobre esses efeitos nas TPIs. Portanto, este estudo comparou os efeitos de dois sistemas de uso da terra (floresta secundária e plantio de mandioca) durante as estações chuvosa e seca utilizando ferramentas bioquímicas e moleculares. A função da comunidade bacteriana foi determinada por CLPP - Análise do Perfil Fisiológico da Comunidade Microbiana, a estrutura da comunidade bacteriana por T-RFLP - Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição Terminal, e a composição e distribuição bacteriana por pirosequenciamento da região V4 do gene 16S rRNA. Os resultados de T-RFLP confirmaram que o uso da terra e a sazonalidade afetam as comunidades bacterianas do solo. CLPP mostrou que a atividade funcional na TPI foi pouco afetada pela sazonalidade. A tecnologia de pirosequenciamento foi uma importante ferramenta para diferenciar filotipos raros de acordo com o tipo de solo e uso da terra. Além disso, correlações positivas entre certos filos bacterianos (e.g. *Nitrospira*) e propriedades do solo, como o pH e P, indicam que a TPI pode servir como habitat para esses filos bacterianos. Essas descobertas levantam um novo aspecto chave da TPI como microhabitat susceptível para micro-organismos funcionais que podem desempenhar um papel importante nos ciclos biogeoquímicos.

Palavras-chave: Terra Preta de Índio. Uso da terra. Sazonalidade. Bactéria. CLPP. T-RFLP. Pirosequenciamento.

## LAND USE AND SEASONALITY INFLUENCE BACTERIAL COMMUNITIES OF AMAZONIAN DARK EARTH IN THE BRAZILIAN CENTRAL AMAZON

### ABSTRACT

Amazonian Dark Earth (ADE) in the Brazilian Amazon is the main evidence left by pre-Columbian indigenous populations indicating that poor soil can be transformed into highly fertile ground. Changes in land use and seasonality are likely to influence microbial communities, however, little is known about these effects on ADE. Therefore, this study compared the effects of two land use systems (secondary forest and cassava plantation) during the rainy and dry seasons using biochemical and molecular tools. The bacterial community function was determined by CLPP - Community Level Physiological Profile, the bacterial community structure by T-RFLP - Terminal Restriction Length Polymorphism, and bacterial community composition and distribution by pyrosequencing of the V4 16S rRNA gene region. T-RFLP results confirmed that land use and seasonality affect soil bacterial communities in ADE. CLPP have shown that ADE functional activity is less affected by seasonality. Furthermore, pyrosequencing technology was an important tool to differentiate rare phylotypes according to soil type and land use. Also, positive correlations between certain bacterial phyla (e.g. Nitrospira) and soil properties, such as pH and P, indicate that ADE may be an important habitat for those bacterial phyla. These findings bring new key features of ADE as suitable microhabitat for main function microorganisms which may play an important role in biogeochemical cycles.

Key-words: Amazonian Dark Earth. Land use. Seasonality. Bacteria. CLPP. T-RFLP. Pyrosequencing.

## 2.1 Introdução

Maior parte da floresta Amazônica está localizada sob solos fortemente intemperizados e pobres em nutrientes, e sua produtividade depende da diversidade vegetal e é geralmente dependente da reciclagem eficiente da matéria orgânica (SANCHEZ et al., 1982). A agricultura de derruba e queima é um típico sistema de uso da terra realizada por populações tradicionais na região Amazônica. A liberação de nutrientes ricos em cinzas leva a um aumento no pH do solo e no conteúdo de cátions na superfície do solo, promovendo consequentemente a adição de novos nutrientes (HÖLSCHER et al., 1997). No entanto, com o uso contínuo desses nutrientes em atividades agrícolas existe um decréscimo gradual na fertilidade desses solos (SANCHEZ et al., 1982), e outro fator é a perda de nutrientes devido à queima, corte e lixiviação durante o processo de derruba e queima (HÖLSCHER et al., 1997).

Ainda considerando a mesma região, a existência de manchas de solos escuros férteis conhecidos como Terra Preta de Índio (TPI) ou *Amazonian Dark Earth* é a principal evidência deixada por populações indígenas pré-colombianas de que solos pobres podem ser transformados em solos altamente férteis. Análises realizadas nesses solos têm mostrado elevada estabilidade da matéria orgânica e elevados teores de nutrientes químicos, tais como C, P, Ca, e Mn (LEHMANN et al., 2003). Além disso, o horizonte antrópico da TPI possui resiliência ao manejo do solo e excelente qualidade física (TEIXEIRA; MARTINS, 2003). Acredita-se que esses elementos foram adicionados nesses solos a partir da deposição de atividades humanas em atividades de agricultura pré-histórica semi-intensiva e intensiva (DENEVAN, 1996). Por esta razão, as TPIs são frequentemente procuradas por comunidades tradicionais para o seu uso em agricultura de subsistência.

Apesar das propriedades peculiares da TPI, pouco se conhece sobre os efeitos de atividades agrícolas modernas, uso da terra e sazonalidade nesses solos antrópicos. Mudança de uso da terra representa um dos maiores impactos em ecossistemas terrestres, influenciando drasticamente comunidades de plantas e diminuindo a diversidade funcional (FLYNN et al., 2009; LALIBERTÉ et al., 2010). Alguns estudos também têm mostrado evidências de que os micro-organismos do solo são afetados pelo uso da terra. Diferenças na estrutura e composição de comunidades bacterianas foram observadas em diferentes sistemas de uso da terra em solos amazônicos (JESUS et al., 2009; NAVARRETE et al., 2010). Além disso, existe uma preocupação crescente de que recentes eventos de mudanças climáticas possam

causar um enorme “dieback” ou degradação da floresta Amazônica com elevada probabilidade de intensificação das estações secas (MALHI et al., 2009). Isto, por sua vez, influenciará as comunidades microbianas do solo sendo muitas responsáveis por regular importantes processos do ecossistema (NEHER, 1999).

Recentemente, microbiologistas ambientais vêm investigando as comunidades microbianas da TPI. Métodos baseados em cultivo e técnicas moleculares têm mostrado que a diversidade e riqueza das comunidades bacterianas do solo são maiores nas TPIs quando comparada aos seus solos adjacentes (KIM et al., 2007; O’NEILL et al., 2009; GROSSMAN et al., 2010; NAVARRETE et al., 2010). Além disso, algumas peculiaridades da TPI, especialmente a elevada presença de carvão, têm motivado pesquisadores a conduzir estudos sobre os efeitos da aplicação de carvão na estrutura e composição das comunidades microbianas (ANDERSON et al., 2011; KHODADAD et al., 2011). No entanto, um dos principais desafios atuais é acessar essas comunidades microbianas quando influenciadas por mudanças no ecossistema causadas, por exemplo, pelo uso da terra e sazonalidade que provavelmente podem afetar a funcionalidade da TPI.

Portanto, é importante melhor avaliar as comunidades microbianas nas TPIs e identificar possíveis mudanças nessas comunidades que possam influenciar a fertilidade e qualidade desses solos antrópicos. Uma forma de acessar essas mudanças é a partir da funcionalidade do solo com o uso de placas Biolog Ecoplate (Biolog, Hayward, CA, USA) permitindo a Análise do Perfil Fisiológico da Comunidade Microbiana (CLPP - *Community Level Physiological Profile*) de bactérias aeróbicas heterotróficas (GARLAND; MILLS, 1991). Diversos estudos têm utilizado esse método para observar diferenças nas comunidades microbianas em solos como o da tundra da Antártida (CAMPBELL et al., 2010) e em zonas úmidas sob diferentes sistemas de manejo (DOUTORELO; GOULDER; LILLIE, 2010). Ferramentas moleculares (e.g. PCR, Reação em cadeia da polimerase; DGGE, Eletroforese em gel de gradiente desnaturante; T-RFLP, Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição Terminal) também têm sido utilizadas com sucesso para descrever mudanças de comunidades microbianas não cultiváveis em solos de floresta tropical (JESUS et al., 2009) e em solos agrícolas (LUKOW; DUNFIELD; LIESACK, 2000). Recentemente, a tecnologia de pirosequenciamento tem se mostrado como uma poderosa ferramenta de rápida e sensível investigação de comunidades microbianas complexas. Alguns estudos já têm focado em como as comunidades microbianas são afetadas pelo manejo e uso da terra (ROESCH et al., 2007;

NACKE et al., 2011) assim como pela presença de carvão em solos (ANDERSON et al., 2011; KHODADAD et al., 2011; NAVARRETE et al., 2010).

Nesse contexto, o principal objetivo desse estudo foi investigar a função, estrutura e composição da comunidade bacteriana na TPI (Antrossolo hórtico) e em seu solo adjacente (Argissolo amarelo, ACH) sob diferentes usos da terra e sazonalidade na estação experimental do Caldeirão na Amazônia Central brasileira. Para testar a hipótese de que o uso da terra e a sazonalidade influenciam as comunidades bacterianas na TPI e ACH, a análise de CLPP foi utilizada para investigar a função da comunidade, a técnica de T-RFLP para detectar possíveis mudanças na estrutura, e pirosequenciamento do gene 16S rRNA da região V4 para acessar a composição e distribuição da comunidade bacteriana.

## **2.2 Materiais e métodos**

### **2.2.1 Áreas de estudo e amostragem**

A área de estudo está situada na Estação Experimental do Caldeirão pertencente a Embrapa Amazônia Ocidental localizada no município de Iranduba, Amazonas (03°26'00" S, 60°23'00" W). Quatro sítios foram selecionados, dois com a presença de solo com horizonte A antrópico, conhecido como Terra Preta de Índio, sendo um sítio sob floresta secundária e outro sob cultivo; os outros dois sítios são os solos adjacentes à TPI, sendo um sítio sob floresta secundária e outro sob cultivo. A Terra Preta de Índio foi classificada como Antrossolo hórtico e os solos adjacentes como Argissolo amarelo (*Haplic Acrisol*, ACH) de acordo com a Base de Referência Mundial para Recursos de Solos (FAO, 1998). Os sítios encontram-se sob floresta secundária (FS) com aproximadamente 35 anos de idade e plantio de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz, PM). As amostras de solos TPI e ACH foram coletadas durante a estação chuvosa (Janeiro de 2009) e durante a estação seca (Agosto de 2009). A precipitação média em Janeiro de 2009 foi de 400 mm, e em Agosto de 2009 foi de 30 mm ([http://clima1.cptec.inpe.br/~rclima1/monitoramento\\_brasil.shtml](http://clima1.cptec.inpe.br/~rclima1/monitoramento_brasil.shtml)). Em cada sítio, o ponto de amostragem central foi selecionado aleatoriamente, e a partir desse ponto de referência foram marcados três pontos aleatórios distantes a 5 m do ponto de referência. Amostras de solos indeformadas (5 cm de diâmetro e 15 cm de comprimento) foram coletadas em cada um dos pontos marcados. As amostras de solos foram coletadas em triplicatas e transportadas em gelo seco até o Laboratório de Biologia Celular e Molecular (Piracicaba, SP)



e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Foram coletadas também amostras de solos para o ensaio de Biolog e biomassa microbiana, sendo que essas amostras foram transportadas separadamente em caixas contendo embalagens térmicas (*ice packs*) e armazenadas posteriormente a  $4^{\circ}\text{C}$ . Para as análises de biomassa microbiana, amostras de solos foram enviadas à Embrapa Soja (Londrina, PR), e para análises químicas à Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus, AM).

### 2.2.2 Determinação das propriedades do solo

As amostras de solos foram analisadas em triplicatas para pH ( $\text{H}_2\text{O}$ , 1:1), extratores de Al, Ca e Mg (1M KCl), extratores de Cu, Fe, K, Mn, Na, P e Zn (solução dupla de ácido sulfúrico a 0,025M e ácido clorídrico a 0,05M, Mehlich-1), C orgânico do solo (C-solo) (método Walkely-Black; matéria orgânica do solo (MO) = C-solo x 1,724) e capacidade de troca de cátions (CTC) (soma de todos os cátions trocáveis mais o Al e H trocáveis) (EMBRAPA, 1998). O teor de umidade do solo foi obtido pela diferença do peso da amostra de solo antes e após secagem em estufa a  $105^{\circ}\text{C}$ .

O carbono da biomassa microbiana (CBM) foi estimado pelo método de fumigação-extração (VANCE; BROOKES; JENKINSON, 1987) e o nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) pelo método de BROOKES et al. (1985) ambos ligeiramente modificados por HUNGRIA et al. (2009). Para ambas as medições, três repetições foram utilizadas para cada sítio ( $n = 9$ ). A medição do CBM teve como base a diferença entre o C orgânico extraído com 0,5 M  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (BARTLETT; ROSS, 1988) a partir de amostras fumigadas com clorofórmio e de amostras não fumigadas (VANCE; BROOKES; JENKINSON, 1987), além de utilizar o fator de correção 0,41 como recomendado para solos tropicais (FEIGL et al., 1995). O NBM foi determinado pela diferença entre N extraível de amostras fumigadas e não fumigadas utilizando o fator de correção de 0,54 (BROOKES et al., 1985).

### 2.2.3 Biolog

Análise do Perfil Fisiológico da Comunidade Microbiana (CLPP) foi acessada utilizando Biolog Ecoplate (Biolog, Hayward, CA, USA) o qual contém poços em triplicatas de 31 diferentes fontes de carbono e um controle negativo com água (INSAM, 1997). As medições foram realizadas para cada amostra de solo coletadas em três pontos de cada sítio. A densidade de inoculação foi previamente estimada por contagem das unidades formadoras de

colônias em meio ágar a 25°C por 48 h. Cada suspensão do solo foi inoculada na placa Biolog (120 µL por poço) e incubadas a 28°C. A primeira leitura foi realizada após 12h e as leituras posteriores a cada 24h durante 7 dias em leitor de microplacas ELISA a 590 nm. Os dados gerados pelas placas Biolog foram transformados dividindo os valores brutos pelo respectivo desenvolvimento de cor do poço da placa de Biolog (AWCD) (GARLAND; MILLS, 1991). Os valores corrigidos foram utilizados para estimar o metabolismo heterotrófico médio e os parâmetros cinéticos  $K$  (parâmetro cinético de consumo que representa o potencial de substrato utilizado),  $r$  (parâmetro cinético de consumo que representa a taxa exponencial de utilização do substrato) e  $S$  (parâmetro cinético de consumo que representa o tempo para alcançar o ponto médio da curva de consumo de substrato) como proposto por Lindström, Barry e Braddock (1998).

#### **2.2.4 Extração de DNA, amplificação do gene 16S rRNA, T-RFLP e pirosequenciamento**

O DNA dos solos foi extraído em triplicata utilizando-se o *Kit Power Soil DNA Extraction<sup>TM</sup>* (MoBio, Carlsbad, CA). Em microtubo contendo micro esferas de vidro foram adicionados 0,25 g de amostras de solo e agitados gentilmente para homogeneização das amostras. O DNA total do solo foi extraído de acordo com as instruções indicadas pelo fabricante. A verificação da qualidade do DNA foi feita em espectrofotômetro através da leitura de absorbância em 260 e 280 nm (NanoDrop® ND-1000 UV/vis-spectrophotometer, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany). O DNA extraído foi armazenado à -20°C.

A estrutura da comunidade bacteriana das amostras analisadas foi determinada pela técnica de *fingerprint* de T-RFLP. O conjunto de primers 27F-FAM-labeled (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGT TACGACTT-3') foram usados na reação de amplificação do gene 16S rRNA (LANE, 1991). A amplificação foi feita em triplicata em solução contendo: 1 x tampão de PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA), 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP (Eppendorf, Germany), 0,1 mM de BSA (New England Biolabs, USA), 25 pmol de cada primer, 1 U de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA), 2 ng de DNA genômico e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para um volume final de 25 µL. A reação foi realizada nas seguintes condições: 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 59°C por 45 s, 72°C por 1 min e 72°C por 15 min. Após a obtenção do produto de PCR, foi feita a purificação dos fragmentos amplificados utilizando o *Qiagen*

*PCR purification kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA). Os produtos de PCR purificados foram digeridos a 37°C por 3 horas com a enzima de restrição *MspI* (Invitrogen, USA). O DNA foi precipitado com isopropanol (SAMBROOK; RUSSELL, 2001), resuspenso em 9,8 µL de Formamida Hi-Di e 0,2 µL de padrão de comprimento GeneScan 500 ROX™ (Applied Biosystems, USA) e desnaturado a 94°C por 5 min. A determinação do comprimento dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFs) foi realizada no sequenciador capilar automático modelo ABI PRISM 3100 *Genetic Analyzer* – *Applied Biosystems/HITACHI*.

Os primers 563F (5'-GCCTCCCTCGCGCCATCAG[bar code] AYTGGGYDTAAAGVG-3') e 802R (5'-GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTACNV GGGTATCTAATCC-3') utilizados para reação de PCR foram desenhados a partir da região V4 (fragmentos de 270-300 pb). A reação de amplificação foi realizada em triplicata em solução contendo 1x tampão para reação de PCR, 1,8 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5x BSA (New England Biolabs), 1µM de cada primer, 1 U de *FastStart high-fidelity PCR system enzyme blend* (Roche Applied Sciences, IN, USA) e 10 ng de DNA. Os ciclos utilizados foram: desnaturação inicial de 95°C por 3 min; 30 ciclos de 95°C por 45 s, 57°C por 45 s, 72°C por 1 min; e extensão final a 72°C por 4 min. O produto amplificado foi separado por gel de eletroforese e obtido com o tamanho esperado (270-300 pb), e em seguida o produto foi excisado e purificado com o *Qiagen gel extraction kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA). Uma segunda purificação foi realizada com o *Qiagen PCR purification kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA). Os produtos purificados foram submetidos ao pirosequenciamento em sequenciador automático *Genome Sequencer FLX System* (454 Life Sciences, Branford, CT, USA) na Michigan State University Research Technology Support Facility.

### **2.2.5 Análise das propriedades químicas do solo, biomassa microbiana e Biolog**

Análises de variância (ANOVA) foram aplicadas separadamente para os dados das propriedades químicas do solo para testar o efeito do uso da terra e sazonalidade. Para os resultados que mostraram diferenças significativas, foi aplicado o teste de Tukey com significância de  $P < 0,005$ . Os parâmetros cinéticos, gerados pelos dados de AWCD, e de biomassa microbiana também foram submetidos à análise de variância, e quando significativos ao teste de Tukey ( $P < 0,005$ ). Posteriormente, a correlação de Spearman foi utilizada para verificar possíveis correlações entre os parâmetros cinéticos com as

propriedades químicas do solo e biomassa microbiana. As análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA v.10 (StatSoft, USA).

### **2.2.6 Análise dos dados de T-RFLP**

Os dados de T-RFLP foram analisados no programa *Peak Scanner* v1.0 (Applied Biosystems). Os fragmentos terminais de restrição (T-RFs) menores que 50 pb e maiores que 800 pb foram excluídos da análise. Os picos verdadeiros foram determinados a partir do programa de acesso online T-REX (ABDO et al., 2006) (<http://trex.biohpc.org>, *last updated on 2010/03/01*), os T-RFs foram arredondados para o T-RF mais próximo e as alturas dos picos normalizadas de acordo com a quantidade de DNA de cada amostra (CULMAN et al., 2009). Os picos normalizados foram utilizados para o cálculo da abundância relativa de T-RFs. Análises multivariadas foram realizadas com os dados de T-RFLP transformados via raiz quadrada para se obter homogeneidade das variâncias. A análise multivariada utilizada para os dados de T-RFLP foi a análise de ordenação de escala multidimensional (MDS) com base na similaridade de Bray-Curtis. A similaridade entre as amostras foi calculada também pela análise de similaridade (ANOSIM) utilizando 1000 permutações (CLARKE, 1993). Para verificar diferenças significativas entre as amostras, a partir dos dados de T-RFLP, a análise de variância permutacional (PERMANOVA) foi usada para acessar possíveis diferenças relacionadas ao uso da terra e sazonalidade (ANDERSON, 2001). A rotina estatística SIMPER (porcentagem de similaridade) foi utilizada para acessar a contribuição de indivíduos T-RFs na dissimilaridade quando influenciados pelo uso da terra e sazonalidade (CLARKE, 1993). A influência das propriedades do solo na estrutura das comunidades de bactéria foram acessadas pela análise BEST (procedimento BIOENV, programa PRIMER 6) o qual seleciona as propriedades do solo que melhor explicam os padrões biológicos observados nas amostras (CLARKE, 1993). Além disso, a análise canônica de coordenadas principais (CAP) foi usada para visualizar a correlação entre a estrutura da comunidade bacteriana com as propriedades do solo (previamente selecionadas pela análise BEST) (ANDERSON; WILLIS, 2003). Todas as análises multivariadas foram realizadas no programa PRIMER 6 e pacote PERMANOVA (CLARKE; GORLEY, 2006; ANDERSON; GORLEY; CLARKE, 2008).

### 2.2.7 Análise dos dados de pirosequenciamento

A partir das sequências geradas pelo pirosequenciamento, foram feitas triagens e removidas as sequências com erros nos primers *forward* e regiões *barcode*, ambiguidades e sequências menores que 150 pb foram removidas utilizando o programa RDP *Pyrosequencing Initial Process Tool* (COLE et al., 2009). Sequências quiméricas foram identificadas pelo programa *Chimera Check* do RDP (<http://www.rdp.cmc.msu.edu>). Sequências de qualidade foram alinhadas usando a função de análise para pirosequenciamento no programa RDP utilizando a função *Aligner* e agrupadas a partir de parâmetros padrão da função *Clustering* do RDP. Os alinhamentos gerados pelo RDP foram manualmente checados e corrigidos quando necessários. Os agrupamentos gerados foram utilizados para a estimativa dos índices de diversidade e riqueza (índice de diversidade de Shannon e estimador de riqueza Chao 1), assim como para a construção de curvas de rarefação com nível de dissimilaridade de 3% e posterior classificação filogenética utilizando a função *Classifier* do RDP (WANG et al., 2007). Matrizes de distância foram construídas utilizando a função *dist.seqs* e comparações com o teste *Libshuff* foram realizadas no programa MOTHUR (SCHLOSS et al., 2009). O *Libshuff* testa a hipótese nula de que duas bibliotecas são estatisticamente indistinguíveis com base nas distâncias entre seus membros (SINGLETON et al., 2001) e é mais discriminativo do que abordagens que utilizam OTUs (unidades taxonômicas operacionais) (SCHLOSS, 2008). Análises de agrupamento a partir do coeficiente de similaridade de Bray-Curtis foram realizadas no programa PRIMER 6 (CLARKE; GORLEY, 2006).

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Propriedades do solo

Os resultados das diferentes propriedades dos solos estudados (TPI e ACH) sob floresta secundária (FS) e plantio de mandioca (PM) durante as estações chuvosa e seca estão apresentados na Tabela 2.1. As propriedades químicas da TPI-FS foram quimicamente similares aos da TPI-PM durante ambas as estações. ACH-FS e ACH-PM também apresentaram semelhanças em suas propriedades químicas com exceção do carbono orgânico do solo (C-solo) e matéria orgânica (MO) os quais apresentaram significativamente maiores valores em ACH-FS. TPI apresentou maior pH do solo tanto sob FS e PM durante as estações

chuvosa e seca, sendo esses valores maiores quando comparados a ACH independente do sistema de uso da terra e sazonalidade. Como esperado, em contraste a ACH, TPI apresentou elevados valores de CTC, Ca, Mg e P indicando a elevada fertilidade desses solos antrópicos. Particularmente, TPI apresentou elevados valores de bases trocáveis (Ca, Mg) ( $P < 0,05$ ) independente do sistema de uso da terra quando comparada a ACH. Decréscimo nos teores de Ca foi observado durante a estação seca em TPI-FS (57%) e TPI-PM (55%) em relação à estação chuvosa. Da mesma forma, um decréscimo no teor de Mg de 40% foi observado em TPI-FS. Mudanças devido a sazonalidade na CTC foi observada em TPI com significativo decréscimo na estação seca. Para ACH, mudanças devido à sazonalidade foram observadas apenas nos teores de C-solo e MO sob FS.

Carbono da biomassa microbiana (CBM) foi maior em TPI-FS em relação à TPI-PM, o qual apresentou valores similares de CBM em ACH-FS durante a estação chuvosa. ACH-PM apresentou decréscimo significativo em CBM e nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) durante as estações chuvosa e seca. Além disso, a sazonalidade afetou o CBM em TPI-FS com um decréscimo de 34% juntamente com uma redução de 27% em NBM durante a estação seca. Para ACH-FS, houve um aumento significativo de CBM e NBM nas estações chuvosa e seca. Por outro lado, ACH-PM apresentou decréscimo significativo de CBM da estação chuvosa para a seca. O teor de umidade do solo foi significativamente maior nos solos durante a estação chuvosa com um decréscimo de 45% a 68 % da estação chuvosa para a estação seca.

Tabela 2.1 - Propriedades do solo da Terra Preta de Índio (TPI) e solo adjacente (argissolo amarelo, ACH) sob floresta secundária e plantio de mandioca durante as estações chuvosa e seca

Propriedades do solo	TPI		TPI		ACH		ACH	
	Floresta secundária		Plantio de mandioca		Floresta secundária		Plantio de mandioca	
	Chuva	Seca	Chuva	Seca	Chuva	Seca	Chuva	Seca
pH	5,40 a	5,25 a	5,46 a	5,33 a	3,63 b	3,67 b	3,68 b	3,73 b
C-solo (g kg <sup>-1</sup> )	32,35 a	28,17 a	28,44 a	26,47 a	30,47 aA	18,68 aB	17,62 b	16,15 b
MO (g kg <sup>-1</sup> )	55,65 a	48,46 a	48,91 a	45,54 a	52,41 aA	32,12 aB	30,47 b	27,78 b
P (mg dm <sup>-3</sup> )	140 aA	83 aB	174 a	205 a	9 b	4 b	6 b	4 b
Ca (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	9,05 aA	3,93 aB	8,68 aA	3,93 aB	0,89 b	0,24 b	0,16 b	0,11 b
Mg (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	1,43 aA	0,86 aB	1,53 a	1,11 a	0,31 b	0,11 b	0,10 b	0,06 b
Al (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,01 a	0,03 a	0,01 a	0,02 a	2,06 bA	1,52 bB	1,72 b	1,49 b
CTC† (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	10,64 aA	4,90 aB	10,37 aA	5,13 aB	3,42 b	1,95 b	2,07 b	1,74 b
CBM (mg kg <sup>-1</sup> )	656,97 aA	431,00 aB	372,53 b	346,43 ab	378,53 b	452,93 a	248,33 c	232,73 b
NBM (mg kg <sup>-1</sup> )	51,93 a	63,47 a	20,90 bA	15,33 bB	19,37 bA	51,33 aB	12,83 b	13,00 b
h (%)	41,8 aA	23,1 aB	24,0 bA	16,2 bB	40,0 aA	12,7 bcB	37,7 aA	12,1 cB

Abreviações: C-solo, carbono orgânico do solo; MO, matéria orgânica do solo; CTC, capacidade de troca de cátions; CBM, carbono da biomassa microbiana; NBM, nitrogênio da biomassa microbiana; h, umidade do solo.

### 2.3.2 Função da comunidade bacteriana

Os dados da média do desenvolvimento de cor do poço da placa de Biolog (AWCD) representados pela intensidade média da utilização de 31 diferentes fontes de carbono apresentam-se na Figura 2.1. Os valores de AWCD aumentaram rapidamente após 30h independente da sazonalidade, com exceção de ACH-FS na estação chuvosa. Durante a estação chuvosa, AWCD variou entre todos os solos estudados com maior valor de AWCD em TPI quando comparado a ACH. Foram observadas diferenças devido ao uso da terra apenas para ACH-FS. No entanto, nenhuma diferença foi observada em AWCD para todos os solos estudados durante a estação seca.

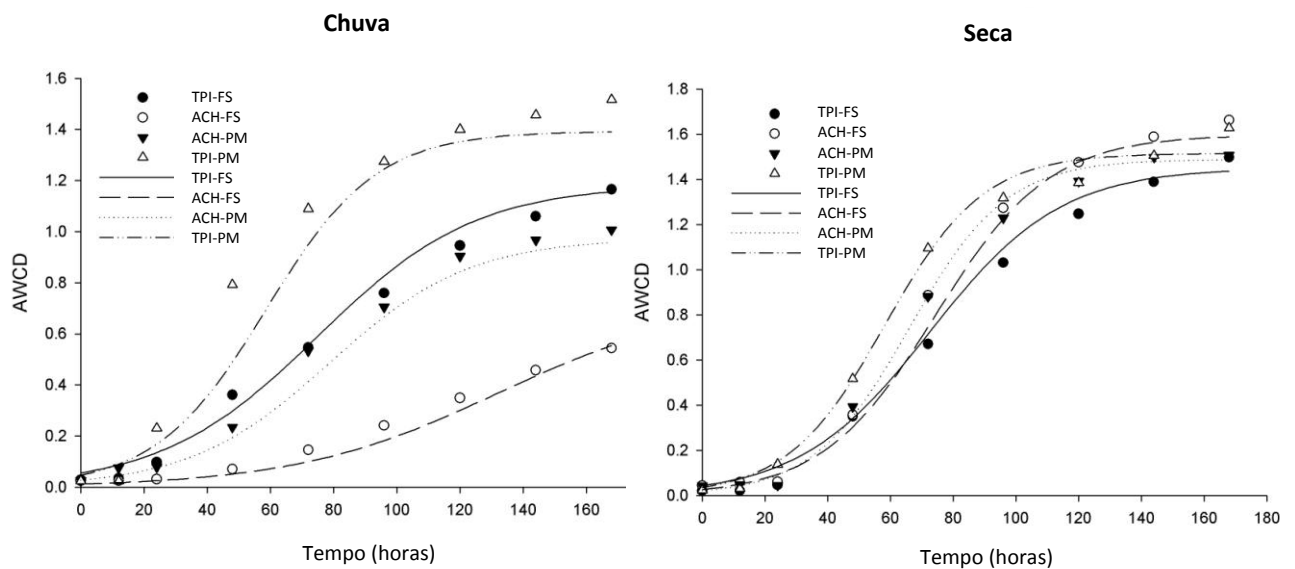


Figura 2.1 - Metabolismo heterotrófico médio (média do desenvolvimento de cor do poço da placa de Biolog, AWCD) da análise do perfil fisiológico da comunidade microbiana (CLPP) da Terra Preta de Índio (TPI) e solo adjacente (argissolo amarelo, ACH) sob floresta secundária (FS) e plantio de mandioca (PM) durante as estações chuvosa e seca

O grau de consumo máximo de substrato, representado pelo parâmetro  $K$ , foi significativamente maior em TPI-PM e menor em ACH-FS durante a estação chuvosa. A taxa máxima exponencial ( $r$ ) foi menor sob PM nos dois solos estudados. O crescimento exponencial ( $s$ ) foi maior em ACH-FS e menor nos outros solos. Para a estação seca, nenhuma diferença foi observada nos parâmetros  $K$ ,  $r$  e  $s$  independente do solo e uso da terra.



Com o intuito de explorar a relação entre as diferenças observadas nos parâmetros  $K$ ,  $r$  e  $s$  com as propriedades do solo, o coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado ( $P < 0,05$ ) e os resultados estão apresentadas na Tabela 2.2. O parâmetro  $K$  se correlacionou positivamente com o pH, P e Ca, e negativamente com o Al durante a estação chuvosa. Nenhuma correlação foi observada para os parâmetros  $r$  e  $s$  durante ambas as estações (Tabela 2.3).

Tabela 2.2 - Parâmetros cinéticos da curva de ajuste do metabolismo heterotrófico médio da Terra Preta de Índio (TPI) e solo adjacente (Argissolo amarelo, ACH) sob floresta secundária (FS) e plantio de mandioca (PM) durante as estações chuvosa e seca

Solos e uso da terra	Chuva		
	$K$	$r$	$s$
TPI-SF	1,109 ab	0,039 ab	81,49 b
TPI-CP	1,393 a	0,057 a	58,71 b
ACH-FS	0,505 c	0,027 b	139,83 a
ACH-PM	1,033 b	0,056 a	66,65 b
	Seca		
	$K$	$r$	$s$
TPI-FS	1,451	0,048	72,63
TPI-PM	1,515	0,064	58,37
ACH-FS	1,597	0,055	74,41
ACH-PM	1,488	0,065	66,13

<sup>a</sup>  $K$ , quantidade potencial de substrato utilizado;  $r$ , taxa de crescimento exponencial;  $s$ , tempo para alcançar o ponto médio da fase exponencial.

<sup>b</sup> Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Tabela 2.3 - Correlação de Spearman entre os parâmetros cinéticos do metabolismo heterotrófico e as propriedades do solo da Terra Preta de Índio e solo adjacente (Argissolo amarelo) durante a estação chuvosa

Parâmetros cinéticos	pH	P	Ca	Al
$K$	0,643*	0,628*	0,669*	-0,732**
$r$	0,146	0,097	0,184	-0,277
$s$	-0,456	-0,427	-0,436	0,566

<sup>a</sup>  $K$ , quantidade potencial de substrato utilizado;  $r$ , taxa de crescimento exponencial;  $s$ , tempo para alcançar o ponto médio da fase exponencial.

<sup>b</sup> \* significância a  $P < 0,05$ ; \*\* significância a  $P < 0,01$ .

### 2.3.3 Estrutura da comunidade bacteriana

A análise de T-RFLP foi utilizada para caracterizar a estrutura da comunidade bacteriana em TPI e ACH sob diferentes sistemas de uso da terra e sazonalidade. Os dados de similaridade analisados a partir da escala multidimensional (MDS) diferenciaram claramente a estrutura da comunidade bacteriana em TPI e ACH, onde agrupamentos distintos foram formados de acordo com o uso da terra e sazonalidade (Figura 2.2). Estes resultados foram confirmados pelo teste permutacional ANOVA (PERMANOVA) mostrando o significativo efeito do uso da terra (FS e PM) e sazonalidade (chuva e seca) na estrutura das comunidades bacterianas em TPI ( $P = 0,002$ ) e ACH ( $P = 0,002$ ). A análise de dissimilaridade (SIMPER) apresentou maiores valores entre TPI-FS-Chuva vs. ACH-FS-Chuva e TPI-PM-Chuva vs. ACH-PM-Chuva com maior número de T-RFs presentes em TPI (Tabela 2.4). O menor valor de dissimilaridade foi observado na interação entre ACH-FS-Chuva vs. ACH-PM-Chuva. O número de T-RFs compartilhados entre TPI foi maior do que em ACH. A rotina BIO-ENV foi usada para determinar qual conjunto de variáveis (ambientais e biomassa microbiana) melhor explicam os padrões biológicos observados na análise de T-RFLP durante as estações chuvosa e seca. Os resultados obtidos mostraram que as variáveis que melhor explicaram a estrutura da comunidade bacteriana durante a estação chuvosa foram Al, Ca, P, pH e umidade do solo ( $Rho = 0,911$ ;  $P < 0,01$ ) e na estação seca foram o Al, NBM e pH ( $Rho = 0,877$ ;  $P < 0,01$ ). Análises de coordenadas principais foram aplicadas separadamente para as estações chuvosa e seca para visualizar a relação das mudanças observadas na rotina BIO-ENV (Figura 2.3). O gráfico de CAP indicou que a estrutura da comunidade bacteriana na TPI durante a estação chuvosa esteve principalmente associada às elevadas concentrações de Ca, P, pH e umidade do solo. Particularmente, TPI-FS mostrou forte correlação com a umidade do solo. Durante a estação seca, a estrutura da comunidade bacteriana na TPI esteve fortemente correlacionada com o pH e ambos os solos sob FS correlacionaram com NBM. Em ambas as estações, a estrutura da comunidade bacteriana em ACH associou-se com a elevada concentração de Al.

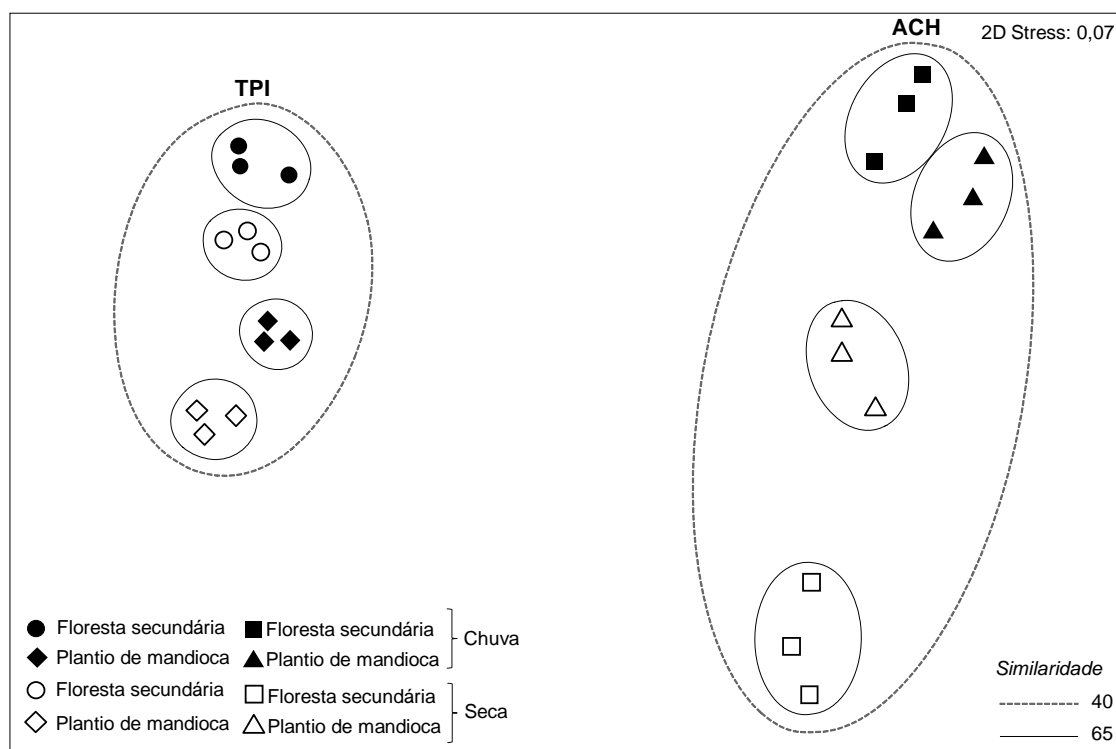


Figura 2.2 - Análise de ordenação em escala multidimensional (MDS) com base no coeficiente de similaridade de Bray Curtis utilizando os dados de T-RFLP (transformados via raiz quadrada) das comunidades de Terra Preta de Índio (TPI) e solo adjacente (Argissolo amarelo, ACH) sob floresta secundária e plantio de mandioca durante as estações chuvosa e seca

Tabela 2.4 - Análise de porcentagem de similaridade (SIMPER) entre Terra Preta de Índio (TPI) e solo adjacente (argissolo amarelo, ACH) sob floresta secundária (FS) e plantio de mandioca (PM) durante as estações chuvosa (C) e seca (S) e número de T-RFs presentes/ausentes/comuns

Grupos	Dissimilaridade %	Número de T-RFs		
		presentes	ausentes	comuns
ACH-FS-C vs. ACH-FS-S	62,12	24	32	4
ACH-FS-S vs. ACH-PM-S	50,82	27	9	11
ACH-PM-C vs. ACH-PM-S	44,71	22	11	9
TPI-FS-S vs. TPI-PM-S	43,90	41	20	13
TPI-FS-C vs. TPI-PM-C	42,35	29	28	27
TPI-PM-C vs. TPI-PM-S	42,21	34	13	18
TPI-FS-C vs. TPI-FS-S	39,88	29	23	26
ACH-FS-C vs. ACH-PM-C	35,64	14	13	17

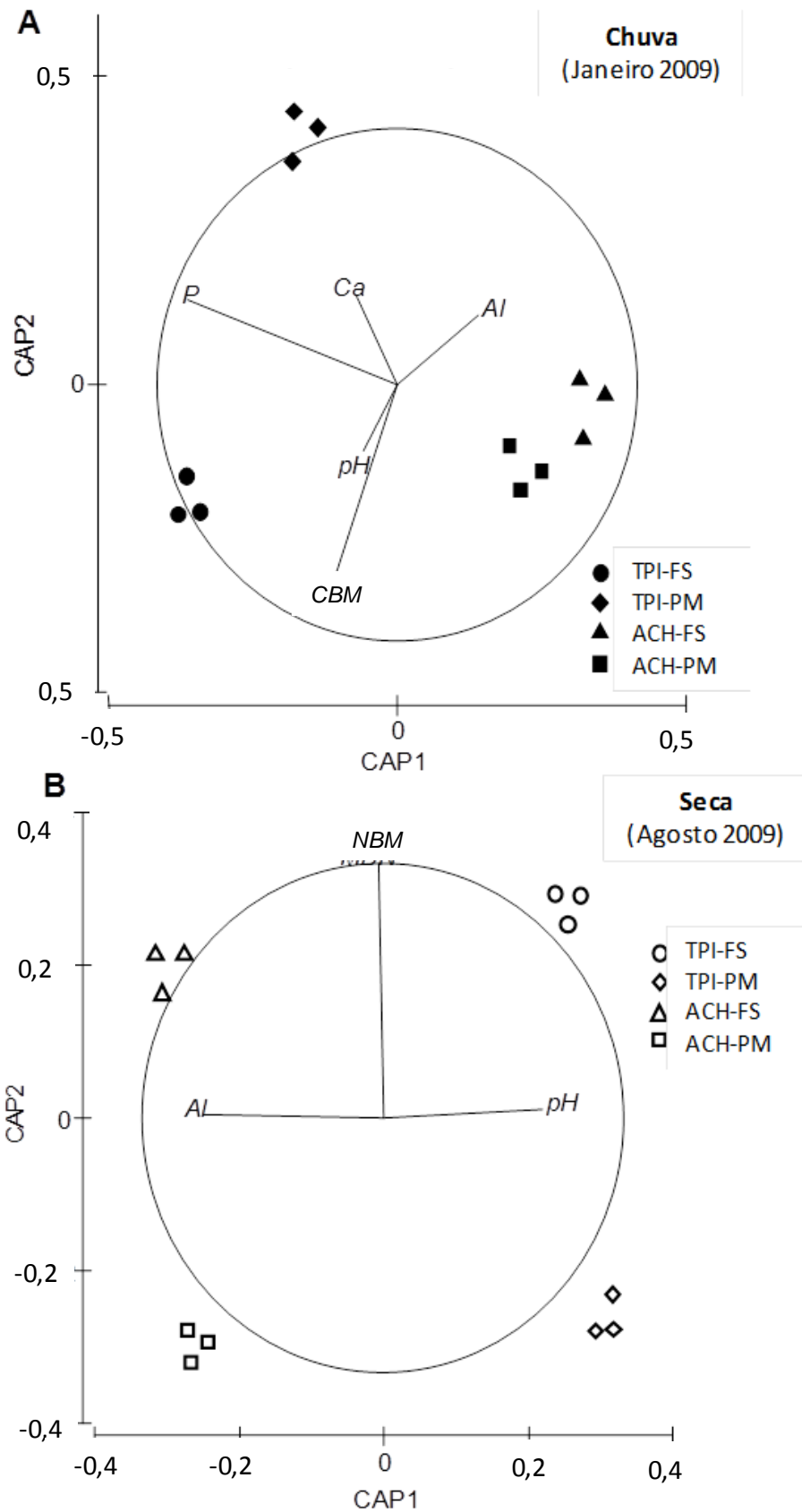


Figura 2.3 - Análise canônica de coordenadas principais (CAP) dos dados de T-RFLP das comunidades de bactérias da Terra Preta de Índio (TPI) e solo adjacente (Argissolo amarelo, ACH) sob floresta secundária (FS) e plantio de mandioca (PM) durante as estações chuvosa (A) e seca (B). Vetores representam as correlações entre as propriedades do solo. Somentes correlações  $> 0,9$  estão apresentadas

### 2.3.4 Composição da comunidade bacteriana

A análise de pirosequenciamento do gene 16S rRNA da região V4 foi utilizada para acessar a composição da comunidade bacteriana em TPI e ACH sob diferentes usos da terra. Um total de 3288; 3210; 3035 e 2609 de sequências de qualidade foram obtidas para TPI-FS, ACH-PM, ACH-FS e TPI-PM, respectivamente, com um comprimento de leitura  $\geq 150$  pb. Os estimadores de riqueza não paramétricos ACE e Chao I também confirmaram uma elevada riqueza em espécies bacterianas na TPI quando comparado a ACH (Tabela 5). O índice de diversidade de Shannon foi maior em TPI-PM ( $H'=5,71$ ) e menor em ACH-FS ( $H'=5,21$ ) (Tabela 2.5).

Tabela 2.5 - Número de OTUs, índices de riqueza (ACE, Chao1) e diversidade (Shannon), e *estimated sample coverage* (ESC) para as bibliotecas do gene 16S rRNA da Terra Preta de Índio (TPI) e solo adjacente (Argissolo amarelo, ACH) sob floresta secundária (FS) e plantio de mandioca (PM) na Amazônia Central brasileira

Bibliotecas	NS	OTUs <sup>a</sup>	Riqueza		Shannon <sup>b</sup>	ESC <sup>c</sup>
			ACE	Chao1		
ADE-FS	3288	778	2270 (2153; 2396)	1532 (1357; 1759)	5,48 (5,42; 5,54)	0,45
ADE-PM	2609	740	2198 (2081; 2326)	1551 (1357; 1806)	5,71 (5,65; 5,77)	0,37
ACH-FS	3035	528	1210 (1103; 1335)	1008 (866; 1208)	5,16 (5,10; 5,21)	0,49
ACH-PM	3210	557	1325 (1279; 1375)	1117 (956;1342)	5,21 (5,15; 5,26)	0,52

Abreviações: ESC, *estimated sample coverage*; NS, número de sequências; OTU, unidade taxonômica operacional.

<sup>a</sup> Calculado no programa MOTHUR com intervalo de *cut-off* de 3%.

<sup>b</sup> Índices de riqueza e diversidade de Shannon foram calculados no programa MOTHUR (*cut-off* de 3%).

<sup>c</sup> ESC:  $Cx=1-(Nx/n)$ , onde  $Nx$  é o número de sequências únicas e  $n$  é o número total de sequências.

Valores entre parênteses indicam intervalos de confiança de 95% calculados no programa MOTHUR.

A distribuição dos filos bacterianos nos solos estudados está apresentada na Figura 2.4. Utilizando uma distância genética de 3%, os filos bacterianos dominantes acima de 5% foram *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Firmicutes* e *Actinobacteria*. Os filos menos abundantes (1-5%) na maior parte dos solos foram *Bacteria incertae sedis* e *Gemmatimonadetes*. Os filos raros (<1%) foram representados por *WS3*, *Synergistetes*, *Bacterioidetes*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi* e *Nitrospira*. Para obter mais detalhes sobre os filos dominantes, a abundância

relativa de cada um está apresentada separadamente na Figura 2.5. A classe *Alphaproteobacteria* foi igualmente abundante em todos os sítios. Além disso, *Deltaproteobacteria* apresentou maior abundância em TPI-PM (15,2%). *Gammaproteobacteria* e *Betaproteobacteria* mostraram maior abundância em ACH. O filo *Acidobacteria* em TPI foi dominado pelas subdivisões *Gp6* e *Gp5*, e ACH pelas subdivisões *Gp1*, *Gp3* e *Gp2*. Diferenças em ACH, devido ao uso da terra, foram observadas na maior abundância relativa de *Acidobacteria Gp1* e *Actinobacteridae* em ACH-PM quando comparado a ACH-FS. Para TPI, a única diferença observada devido ao uso da terra foi na maior abundância relativa de *Rubrobacteridae* em TPI-PM. Pequenas diferenças também foram observadas para ACH, com um aumento na abundância relativa de *Acidobacteria Gp2* e um decréscimo de *Betaproteobacteria* em ACH-FS. TPI apresentou uma pequena diferença na abundância relativa de *Deltaproteobacteria*, sendo esta maior em TPI-PM.

Correlação entre alguns filós e propriedades do solo mostraram que maior parte da correlação positiva foram encontradas para pH, MO, P, Ca, Mg e CTC (Tabela 2.5). *Chloroflexi* e *Nitrospira* apresentaram uma forte correlação positiva com P. *Bacteroidetes*, *Gemmatimonadetes* e *WS3* apresentaram correlação positiva com MO. *Acidobacteria* mostrou correlação negativa com C-solo e MO.

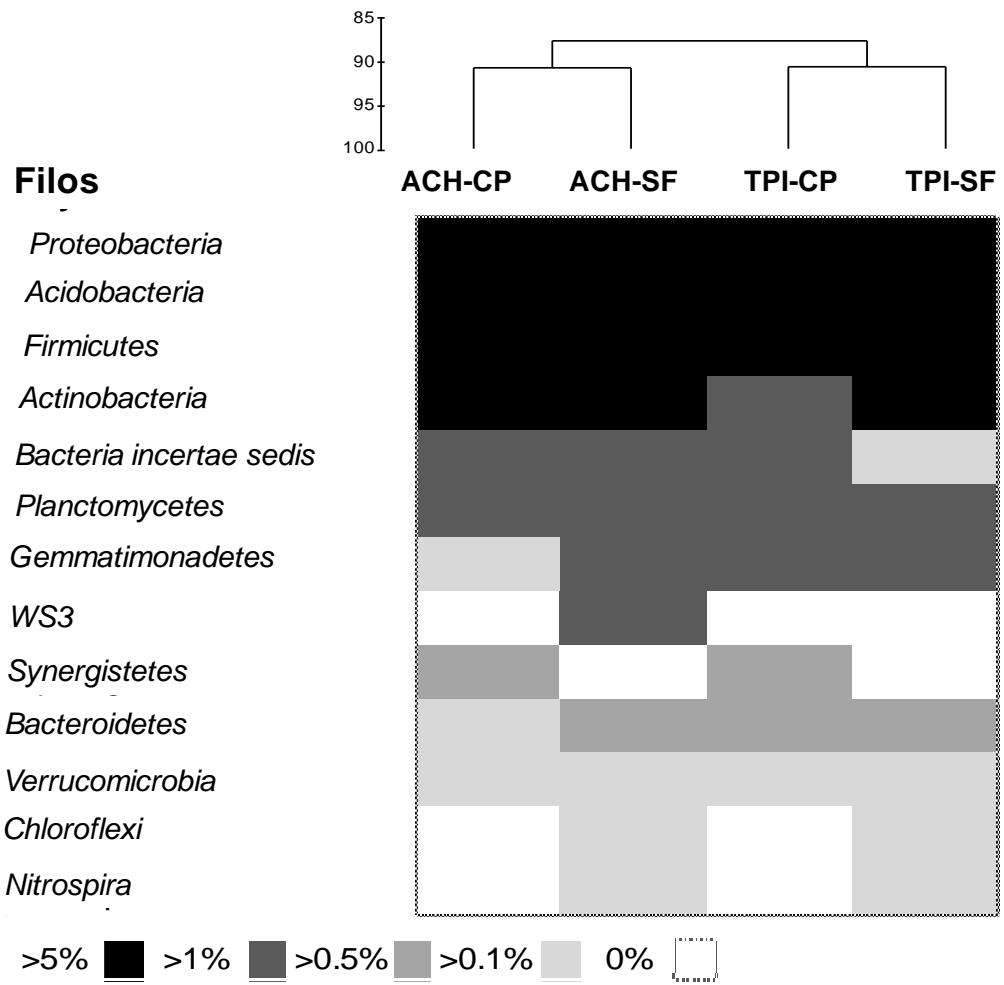


Figura 2.4 - Distribuição da abundância relativa dos filios bacterianos da Terra Preta de Índio (TPI) e solo adjacente (Argissolo amarelo, ACH) sob floresta secundária (FS) e plantio de mandioca (PM). Agrupamento foi realizado com base nos dados de abundância relativa dos filios utilizando o coeficiente de similaridade de Bray Curtis

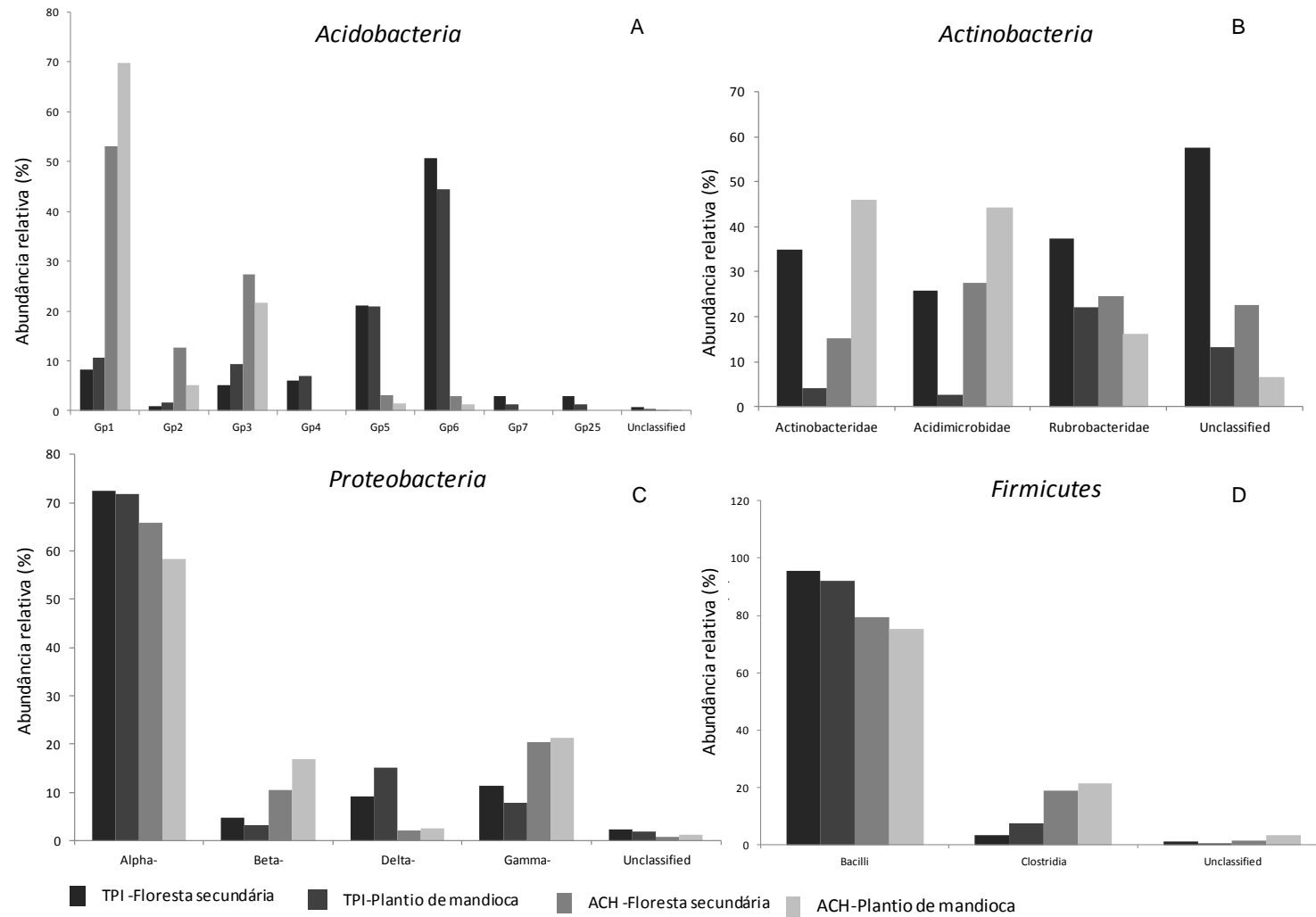


Figura 2.5 - Composição das comunidades de bactérias dos filós mais abundantes (> 5%) da Terra Preta de Índio (TPI) e solo adjacente (Argissolo amarelo, ACH) sob floresta secundária (FS) e plantio de mandioca (PM). (A) *Acidobacteria*, (B) *Actinobacteria*, (C) *Firmicutes* e (D) *Proteobacteria*



Tabela 2.6 - Correlação de Spearman entre os filos selecionados de bactéria da Terra Preta de Índio e solo adjacente (Argissolo amarelo, ACH) com suas propriedades do solo

Propriedades do solo	<i>Synergistetes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Chloroflexi</i>	<i>Nitrospira</i>	<i>Bacteria incertae sedis</i>	<i>Planctomycetes</i>	<i>Acidobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Gemmatimonadetes</i>	WS3
pH <sub>água</sub>	-0,828*		0,828*	0,828*		0,785*				
C-solo		0,756*					-0,732*			
MO		0,756*					-0,732*	-0,736*	0,893**	0,760*
P	-0,906**		0,931***	0,931***		0,810*				
Ca	-0,926***	0,756*	0,772*	0,772*	-0,849**					
Mg	-0,926***	0,756*	0,772*	0,772*	-0,849**					
Al	0,738*		-0,791*	-0,791*		-0,850**				
CTC	-0,926***	0,756*	0,772*	0,772*	-0,849**					
CBM	-0,772*	0,756*			-0,926***					
NBM	-0,772*	0,756*			-0,926***					

<sup>a</sup> \* $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$

<sup>b</sup> C-solo, carbono orgânico do solo; MO, matéria orgânica; CTC, capacidade de troca de cátions; CBM, carbono da biomassa microbiana; NBM, nitrogênio da biomassa microbiana

<sup>c</sup> C-solo, MO ( $\text{g kg}^{-1}$ ); P ( $\text{mg dm}^{-3}$ ); Ca, Mg, Al, CTC ( $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ); CBM, NBM ( $\text{mg kg}^{-1}$ )

## 2.4 Discussão

### 2.4.1 Variabilidade nas propriedades do solo

Perdas em C-solo e MO devido à conversão de floresta nativa para uso agrícola na Amazônia brasileira é bem conhecida (FEARNSIDE; BARBOSA, 1998). Esta afirmação está de acordo com os resultados obtidos nas amostras ACH, as quais apresentaram um significativo decréscimo em C-solo e MO após conversão de floresta secundária para plantio de mandioca (Tabela 2.1). No entanto, os conteúdos de C-solo e MO na TPI não foram influenciados pelo uso da terra, confirmando que a MO na TPI é altamente estável mesmo sob uso agrícola (WOODS; MCCANN, 1999). Acredita-se que a presença de elevados teores de carvão encontrados nas TPIs é capaz de melhorar e manter a fertilidade do solo estabilizando o C orgânico e elevando a capacidade de sequestrar C (ZAVALLONI et al., 2011).

CBM do solo foi significativamente maior na TPI. Além disso, o conteúdo do CBM em TPI-PM não foi significativamente diferente do observado em TPI-FS. Este resultado sugere que a presença de carvão na TPI pode estar beneficiando o aumento do CBM (STEINER et al., 2008; LIANG et al., 2010). No entanto, houve um claro declínio no CBM devido ao uso da terra para ambos os solos estudados durante o período chuvoso e somente para ACH durante o período da seca. Tais declínios no CBM, devido ao uso da terra, também foram observados em outros solos da Amazônia Central (LUIZÃO; BONDE; ROSSWALL, 1992). Diferenças no conteúdo do CBM devido à sazonalidade foram observadas somente em TPI-FS com maior valor observado na estação chuvosa (Tabela 2.1). Cleveland, Townsend e Constance (2004) relataram que a elevada quantidade de CBM durante a estação chuvosa pode estar sendo controlada pela precipitação, pois esta ocasiona o transporte de carbono orgânico lixiviado que foi acumulado durante a estação seca. No entanto, este efeito não foi observado em ACH-FS indicando que o CBM em TPI-FS esteja atuando como um sumidouro (*sink*) de C durante a estação chuvosa, o qual pode estar sendo influenciado pela presença de grande quantidade de carvão na TPI, assim como a presença de liteira da floresta acumulada durante a estação seca. O NBM foi fortemente afetado pelo uso da terra em ambos os solos. Variações sazonais do NBM foram observadas em TPI-PM e TPI-FS. Agosto apresentou baixa precipitação mensal (~ 30 mm) a qual é menor do que a média observada na região (~ 58 mm) para esse mês (<http://www.bdclima.cnpm.embrapa.br/resultados/index.php>), indicando que as comunidades microbianas do solo podem estar atuando como sumidouro de

nutrientes e como fonte de nutrientes durante a estação chuvosa quando o crescimento da floresta é geralmente maior (TRIPATHI; SINGH, 2007). Além disso, Janeiro/2009 apresentou uma das maiores anomalias de precipitação na Amazônia Central entre 25% e 50% acima do normal (MARENGO, 2010). Isso poderia explicar o declínio do NBM durante a estação chuvosa (Tabela 2.1). Curiosamente, TPI-FS não apresentou indicação de mineralização do N durante a estação chuvosa. A presença de carvão na TPI pode estar influenciando a imobilização do N no NBM, pois não foi observada nenhuma diferença significativa nos teores de C-solo e MO na TPI-FS. Além disso, é provável que a TPI-FS tenha maior disponibilidade de C orgânico e maiores taxas de atividade microbiana podendo desencadear a imobilização do N (BARRET; BURKE, 2000).

#### **2.4.2 Biolog**

Os padrões de utilização de diferentes fontes de carbono mostraram que o uso da terra e a sazonalidade pareceram afetar principalmente as comunidades bacterianas de ACH, evidenciada pela mudança devido à sazonalidade (Figura 2.1). A quantidade excessiva de umidade do solo durante a estação chuvosa pode ter causado estresse nas bactérias em ACH (Tabela 2.1). Dunn, Barro e Poth (1985) também mostraram que micro-organismos fisiologicamente ativos foram mais sensíveis a umidade do solo do que os micro-organismos dormentes em solos secos. Outro estudo mostrou que após diversos eventos de secagem e umidade, as taxas de respiração dos solos que sofreram estresse foram substancialmente menores do que nos solos controle sem os eventos de perturbação (FIERER; SCHIMEL, 2002). Curiosamente, a utilização das fontes de C na TPI foi menos influenciada pelo uso da terra e sazonalidade (Figura 2.1 e Tabela 2.2) sugerindo que a funcionalidade das comunidades microbianas na TPI não somente mostraram certa resistência ao uso da terra como em eventos de estresse ambiental (e.g. elevada umidade). Isto sugere uma resistência ao estresse ambiental apesar das mudanças significativas observadas na estrutura das comunidades bacterianas na TPI (Figura 2.2). Girvan et al. (2005) também mostraram que os solos ricos em material mineral e orgânico permitiram uma maior resistência dos micro-organismos à perturbação, indicando que a complexa estrutura do solo pode ter proporcionado

alguma proteção a esses micro-organismos. Também foi importante observar a aparente recuperação funcional de ACH durante a estação seca (Figura 2.1) demonstrando a adaptação dos micro-organismos sobreviventes após eventos de perturbação (GIRVAN et al., 2005).

### **2.4.3 Sazonalidade, uso da terra e propriedades do solo moldam a estrutura das comunidades bacterianas do solo**

A estrutura da comunidade bacteriana variou com a sazonalidade com diferenças observadas durante as estações chuvosa e seca tanto na TPI quanto em ACH, indicando que as comunidades bacterianas nesses solos possam ser dependentes da disponibilidade de umidade e temperatura (GORDON; HAYGARTH; BARDGETT, 2008; BÁRCENAS-MORENO et al., 2009). As análises de MDS e SIMPER mostraram claramente que a sazonalidade e o uso da terra afetaram ambos os solos (Figura 2.2 e Tabela 2.4). Parece que as comunidades bacterianas em ACH foram mais sensíveis a sazonalidade indicando que as comunidades bacterianas na TPI possam ser mais resistentes a eventos de perturbação. Nesse sentido, resistência pode ser definida como a habilidade de tolerar a um evento de perturbação ou estresse (MCNAUGHTON, 1994). Cruz-Martínez et al. (2009), por exemplo, indicaram que as comunidades microbianas do solo podem ser mais robustas a mudanças do clima do que alguns macroorganismos do solo. Além disso, o uso da terra pareceu ter mais influência na estrutura da comunidade bacteriana em ACH durante a estação seca (Figura 2.2). Talvez a elevada precipitação observada em Janeiro/2009 (MARENGO, 2010) possa ter causado um severo estresse na estrutura dessas comunidades omitindo assim um maior efeito do uso da terra durante a estação chuvosa. A estrutura da comunidade bacteriana na TPI pareceu ser mais afetada pelo uso da terra do que pela sazonalidade (Figura 2.2). Esses resultados corroboram com outros estudos em solos tropicais da Amazônia, os quais mostraram que a estrutura das comunidades de bactérias foi influenciada pelo uso da terra (JESUS et al., 2009; NAVARRETE et al., 2010). Contradizendo parcialmente os achados desse estudo, Grossman et al. (2010) não observaram mudanças na estrutura das comunidades bacterianas na TPI sob diferentes usos da terra, o qual pode ser explicado pela diferença na estratégia de amostragem do referente estudo (por horizonte do solo) ou até mesmo a idade da floresta secundária estudada.

Além disso, as diferentes propriedades do solo influenciaram a estrutura das comunidades bacterianas durante as estações chuvosa e seca. A análise de ordenação CAP foi utilizada para visualizar a possível correlação das comunidades bacterianas em TPI e ACH com suas propriedades do solo (Figura 2.3). Durante ambas as estações, a estrutura da comunidade bacteriana da TPI se correlacionou positivamente com o pH e P. Estudos anteriores também mostraram que o pH é uma importante propriedade do solo capaz de alterar a estrutura da comunidade bacteriana (LAUBER et al. 2009; ROUSK; BROOKES; BAATH, 2009). Um recente estudo realizado por Kuramae et al. (2011) observou que o P foi a propriedade do solo que melhor explicou a formação das comunidade microbianas em uma série de solos com pH neutro (pH=7.0-7.5). A análise BEST, quando aplicada apenas para TPI, indicou que o P foi realmente a melhor propriedade em indicar diferenças na estrutura bacteriana (dados não apresentados). Habekost et al. (2008) detectaram distintas variações sazonais na estrutura de comunidades microbianas, além de apresentar que a viabilidade e qualidade de fontes orgânicas estejam influenciando a biomassa microbiana. A análise BEST quando aplicada apenas para ACH apresentou o NBM como uma das propriedades do solo responsável em moldar a estrutura bacteriana nesses solos, assim como o Al que é conhecido por influenciar as comunidades bacterianas em solos amazônicos (JESUS et al., 2009; NAVARRETE et al., 2010). Esse resultado é de extrema importância para as práticas de manejo da biomassa microbiana do solo, pois esta pode atuar tanto como sumidouro quanto fonte de N disponível para as plantas (FRIEDEL; GABEL; STAHR, 2001).

#### **2.4.4 A composição das comunidades bacterianas quando afetadas pelo solo e uso da terra**

A análise de pirosequenciamento revelou que as comunidades bacterianas na TPI são mais diversas do que em seu solo adjacente (ACH), corroborando com outros estudos realizados em outros sítios TPIs (KIM et al., 2007; O'NEILL et al., 2009; GROSSMAN et al., 2010). Os filos bacterianos dominantes em ambos os solos foram *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Firmicutes* e *Actinobacteria*. Estes resultados confirmam os resultados observados em outros estudos com TPI utilizando tanto métodos de cultivo como técnicas independentes de cultivo (KIM et al., 2007; O'NEIL et al., 2009; GROSSMAN et al., 2010; NAVARRETE et al., 2010). O teste *Libshuff* apresentou diferenças significativas na composição da comunidade bacteriana de acordo com o solo estudado e uso da terra ( $P < 0,0001$ ). Este resultado confirma os agrupamentos formados de acordo com o solo e uso

da terra utilizando a distância de similaridade de Bray-Curtis (Figura 2.4). Maior parte das mudanças observadas na composição das comunidades em TPI e ACH foi a abundância de filotipos já conhecidos por sua dominância em solos (ROESCH et al., 2007; YOUSSEF; ELSHAHED, 2009). Além disso, alguns filotipos raros se diferenciaram em sua abundância de acordo com o solo e uso da terra. *Synergistetes*, por exemplo, apresentou maior abundância em PM independente do solo estudado, sendo este filo conhecido por utilizar aminoácidos que proporcionam ácidos graxos e sulfato para degradadoras como as metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato (VARTOUKIAN; PALMER; WADE, 2007). *Bacteroidetes* apresentou maior abundância em ambos os sítios TPI e ACH-FS indicando que esse resultado pode estar relacionado à sua rápida capacidade de explorar matéria orgânica biodisponível (ABELL; BOWMAN, 2005). Em relação à biosfera rara (ocorrência < 0,1%), *Nitrospira* esteve presente em ambos os solos sob FS indicando seu importante papel em solos de elevada atividade microbiana como são os solos de floresta. Um elevado número de *Actinobacteria* não classificada foi observado na TPI sugerindo que *Actinobacteria* ainda não conhecida pode ter um importante papel nas TPIs. Este filo é conhecido por compor grupos formadores de poros contribuindo assim para a sobrevivência desses organismos sob eventos de estresse ambiental, além de ter um papel importante na decomposição de materiais orgânicos (SCHIMDT et al., 2005). Isto é particularmente importante na TPI por sua característica peculiar de apresentar um elevado acúmulo de MO em seu horizonte antrópico que pode atingir até 2 m de profundidade (KERN et al., 2003). Além disso, a detecção de filos como o *Nitrospira* sob FS indica a importância funcional dessas bactérias em áreas de floresta. Attard et al. (2010) sugeriram que *Nitrospira* têm um importante papel em solos de baixa atividade e que estes provavelmente dominam ambientes com baixo teor de N.

Khodadad et al. (2011) observaram que *Gemmatimonadetes* e *Actinobacteria* tiveram maior abundância em solos aplicados com carvão. No presente estudo, *Gemmatimonadetes* também foi detectado na TPI e se correlacionou fortemente com a MO. Além disso, o pH do solo mostrou ser uma forte propriedade do solo em moldar as comunidades de *Acidobacteria* (JONES et al., 2009). Por outro lado, *Acidobacteria* se correlacionou negativamente com C-solo e MO corroborando com os resultados encontrados por Fierer, Bradford e Jackson (2007). No entanto, este resultado não descarta a possibilidade do pH influenciar as subdivisões de *Acidobacteria*, como por exemplo, Gp1, Gp2 e Gp3 que apresentaram maior abundância em ACH (pH mais ácido) e Gp 6 na TPI (pH menos ácido) (JONES et al., 2009). Alguns resultados contrastantes foram observados na maior abundância de *Actinobacteridae*

em ACH (pH mais ácido) e *Rubrobacteriadae* não apresentou maior abundância na TPI (pH menos ácido) (LAUBER et al., 2009). *Chloroflexi*, *Nitrospira* e *Planctomycetes* se correlacionaram positivamente com o pH e P, e negativamente com o Al indicando que estes filos podem possuir um papel funcional importante nas TPIs. No entanto, ainda são escassas as informações sobre a funcionalidade desses filos. *Chloroflexi*, por exemplo, aparenta estar envolvido na degradação de componentes complexos como polissacarídeos e proteínas (MIURA; OKABE, 2008). Curiosamente, análises genômicas comparativas têm indicado a importância da transferência lateral de genes entre *Nitrospira* e *Planctomycetes* anaeróbicos oxidadores de amônio, os quais compartilham a NXR (enzima nitrito oxireductase) assim como outras proteínas sugerindo que importantes processos do ciclo do N podem estar evolutivamente conectados (LÜCKER et al., 2010).

## 2.5 Conclusões

Este estudo apresentou evidências de que o uso da terra e a sazonalidade influenciam as comunidades bacterianas em TPI e ACH. A estrutura da comunidade bacteriana se diferenciou em ambos os solos e o número de T-RFs foi maior na TPI. AWCD (dos substratos de Biolog) foram maiores em TPI do que ACH durante a estação chuvosa e manteve o mesmo padrão de consumo de carbono durante a estação seca. Este resultado indica que a funcionalidade das bactérias na TPI foi menos afetada pela sazonalidade demonstrando que essas comunidades são mais resistentes ao estresse ambiental (e.g elevada umidade do solo), e a presença do carvão na TPI pode estar atuando como um “tampão” (*buffer*) protegendo esses micro-organismos a eventos de estresse. A tecnologia de pirosequenciamento foi uma ferramenta importante para acessar mudanças na composição e distribuição bacteriana devido ao solo e uso da terra. Alguns filos (e.g. *Chloroflexi* e *Nitrospira*) se correlacionaram com as propriedades da TPI (e.g. pH e P) indicando que esses filos podem ter um papel importante nos ciclos biogeoquímicos, especialmente sob diferentes usos da terra. Portanto, estes resultados indicaram que a TPI sustenta uma elevada diversidade bacteriana, comunidades bacterianas ativas e que alguns filos se correlacionaram com propriedades do solo típicas das TPIs. Estes resultados fornecem uma importante informação de que as propriedades do solo da TPI podem ser um microhabitat favorável para os micro-organismos do solo. Portanto, os resultados encontrados nesse estudo enfatizam a necessidade de futuros estudos envolvendo os micro-organismos participantes nos ciclos biogeoquímicos, e avaliações da influência das mudanças climáticas nas comunidades microbianas das TPIs.

## Referências

- ABDO, Z.; SCHMETTE, U.M.E.; BENT, S.J.; WILLIAMS, C.J.; FORNEY, L.J.; JOYCE, P. Statistical methods for characterizing diversity of microbial communities by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, p. 929-938, 2006.
- ABELL, G.C.J.; BOWMAN, J.P. Colonization and community dynamics of class Flavobacteria on diatom detritus in experimental mesocosms based on Southern Ocean seawater. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 53, p. 379-391, 2005.
- ANDERSON, C.R.; CONDRON, L.M.; CLOUGH, T.J.; FIERS, M.; STEWART, A.; HILL, R.A.; SHERLOCK, R.R. Biochar induced soil microbial community change: Implications for biogeochemical cycling of carbon, nitrogen and phosphorus. **Pedobiologia**, Jena, v. 54, p. 309-220, 2011.
- ANDERSON, M.J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. **Austral Ecology**, Carlton, v. 26, p. 32-34, 2001.
- ANDERSON, M.J.; WILLIS, T.J. Canonical analysis of principal coordinates: a useful method of constrained ordination for ecology. **Ecology**, Brooklyn, v. 84, p. 511-525, 2003.
- ANDERSON, M.J.; GORLEY, R.N.; CLARKE, K.R. **PERMANOVA + for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods**. Plymouth, UK: PRIMER-E, 2008.
- ATTARD, E.; POLY, F.; COMMEAUX, C.; LAURENT, F.; TERADA, A.; SMETS, B.F.; RECOUS, S.; ROUX, X.L. Shifts between *Nitrospira*- and *Nitrobacter*- like nitrite oxidizers underlie the response of soil potential nitrite oxidation to changes in tillage practices. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, p. 315-326, 2010.
- BÁRCENAS-MORENO, G.; GÓMEZ-BRANDÓN, M.; ROUSK, J.; BAATH, E. Adaptation of soil microbial communities to temperature: comparison of fungi and bacteria in a laboratory experiment. **Global Change Biology**, Washington, DC, v. 15, p. 2950-2957, 2009.
- BARRET, J.E.; BURKE, I.C. Potential nitrogen immobilization in grassland soils across a soil organic matter gradient. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 32, p. 1707-1716, 2000.
- BARTLETT, R.J.; ROSS, D.N. Colorimetric determination of oxidizable carbon in acid soil solutions. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 52, p. 1191-1192, 1988.
- BROOKES, P.C.; LANDMAN, A.; PRUDEN, G.; JENKINSON, D.S. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method for measuring microbial biomass nitrogen in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 17, p. 837-842, 1985.
- CAMPBELL, B.J.; POLSON, S.W.; HANSON, T.E.; MACK, M.C.; SCHUUR, E.A.G. The effect of nutrient deposition on bacterial communities in Arctic tundra soil. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, p. 1842-1854, 2010.



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

CLARKE, K.R.; GORLEY, R.N. **PRIMER v6**: User Manual/Tutorial. Plymouth, UK: PRIMER-E, 2006.

CLEVELAND, C.C.; TOWNSEND, A.R.; CONSTANCE, B.C. Soil microbial dynamics in Costa Rica: seasonal and biogeochemical constraints. **Biotropica**, Washington, DC, v. 36, p. 184-195, 2004.

COLE, J.R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; MCGARRELL, D.M.; MARSH, T.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, London, v. 37, p. 141-145, 2009.

CRUZ-MARTÍNEZ, K.; SUTTLE, K.B.; BRODIE, E.L.; POWER, M.E.; ANDERSEN, G.L.; BANFIELD, J.F. Despite strong seasonal responses, soil microbial consortia are more resilient to long-term changes in rainfall than overlying grassland. **The ISME Journal**, London, v. 3, p. 738-744, 2009.

CULMAN, S.W.; BUKOWSKI, R.; GAUCH, H.G.; CADILLO-QUEIROZ, H.; BUCKLEY, D.H. T-REX: Software for the processing and analysis of T-RFLP data. **BMC Bioinformatics**, London, v. 10, p. 171, 2009.

DENEVAN, W.M. A bluff model of riverine settlement in prehistoric Amazonia. **Annals of the Association of American Geographers**, Washington, DC, v. 86, p. 654-681, 1996.

DOUTORELO, I.; GOULDER, R.; LILLIE, M. Soil microbial community response to land-management and depth, related to the degradation of organic matter in English wetlands: Implications for the *in situ* preservation of archaeological remains. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 44, p. 219-227, 2010.

DUNN, P.H.; BARRO, S.C.; POTH, M. Soil moisture affects survival of microorganisms in heated chaparral soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 17, p. 143-148, 1985.

EMBRAPA. **Análises químicas para avaliação da fertilidade do solo**. Rio de Janeiro: EMBRAPA, CNPSo, 1998.

FAO. **World Reference Base for Soil Resources**. FAO, Rome, 1998. 88 p. (World Soil Resources Report 84).

FEARNSIDE, P.M.; BARBOSA, R.I. Soil carbon changes from conversion of forest to pasture in Brazilian Amazonia. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 108, p. 147-166, 1998.

FEIGL, B.J.; SPARLING, G.P.; ROSS, D.J.; CERRI, C.C. Soil microbial biomass in Amazonian soils: evaluation of methods and estimates of pool size. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, p. 1467-1472, 1995.

FIERER, N.; BRADFORD, M.A.; JACKSON, R.B. Toward an ecological classification of soil bacteria. **Ecology**, Brooklyn, v. 88, p. 1354-1364, 2007.

FIERER, N.; SHIMEL, J.P. Effects of drying –rewetting frequency on soil carbon and nitrogen transformations. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 34, p. 777-787, 2002.

FLYNN, D.F.; GOGOL-PROKURAT, M.; NOGEIRE, T.; MOLINARI, N.; RICHERS, B.T.; LIN, B.B.; SIMPSON, N.; MAYFIELD, M.M.; DECLERCK, F. Loss of functional diversity under land use intensification across multiple taxa. **Ecology Letters**, Oxford, v. 12, p. 22-33, 2009.

FRIEDEL, J.K.; GABEL, D.; STAHR, K. Nitrogen pools and turnover in arable soils under different durations of organic farming: II: Source-and-sink function of the soil microbial biomass or competition with growing plants? **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 164, p. 421-429, 2001.

GARLAND, J.L.; MILLS, A.L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source-utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 57, p. 2351-2359, 1991.

GIRVAN, M.S.; CAMPBELL, C.D.; KILLHAM, K.; PROSSER, J.I.; GLOVER L.A. Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, p. 301-313, 2005.

GORDON, H.; HAYGARTH, P.M.; BARDGETT, R.D. Drying and rewetting effects on soil microbial community composition and nutrient leaching. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 302-311, 2008.

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

HÖLSCHER, D.; MÖLLER, R.F.; DENICH, M.; FÖLSTER, H. Nutrient input–output budget of shifting agriculture in Eastern Amazonia. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Heidelberg, v. 47, p. 49-57, 1997.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; BRANDÃO-JUNIOR, O.; KASCHUK, G.; SOUZA, R.A. Soil microbial activity and crop sustainability in a long-term experiment with three soil-tillage and two crop-rotation systems. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 42, p. 288-296, 2009.

INSAM, H.; AMOR, K.; RENNER, M.; CREPAZ, C. Changes in functional abilities of the microbial community during composting of manure. **Microbial Ecology**, New York, v. 31, p. 77-87, 1996.

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

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

KERN, D.C.; D'AQUINTO, G.D.; RODRIGUES, T.E.; FRAZÃO, F.; SOMBROEK, W.; MEYERS, T.M.; NEVES, E.G. Distribution of Amazonian Dark Earth in the Brazilian Amazon. In: LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GLASER, B.; WOODS, W.I. **Amazonian Dark Earths: origin, properties and management**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 5-77.

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

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

KURAMAE, E.; GAMPER, H.; VAN VEEN, J.; KOWALCHUK, G. Soil and plant factors driving the community of soil-borne microorganisms across chronosequences of secondary succession of chalk grasslands with a neutral pH. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 77, p. 285-294, 2011.

HABEKOST, M.; EISENHAUER, N.; SCHEN, S.; STEINBEISS, S.; WEIGELT, A.; GLEIXNER, G. Seasonal changes in the soil microbial community in a grassland plant diversity gradient four years after establishment. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 2588-2595, 2008.

LALIBERTÉ, E.; WELLS, J.A.; DECLERCK, F. et al. Land-use intensification reduces functional redundancy and response diversity in plant communities. **Ecology Letters**, Oxford, v. 13, p. 76-86, 2010.

LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. **Nucleic acid techniques in bacterial systematic**. New York: Wiley, 1991. p. 115-175.

LAUBER, C.L.; HAMADY, M.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale: a pyrosequencing-based assessment. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 75, p. 5111-5120, 2009.

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

LIANG, B.; LEHMANN, J.; SOHI, S.P. et al. Black carbon affects the cycling of non-black carbon in soil. **Organic Geochemistry**, Amsterdam, v. 41, p. 206-213, 2010.

LINDSTRÖM, J.E.; BARRY, R.P.; BRADDOCK, J.F. Bacterial community analysis: a kinetic approach to constructing potential C source utilization patterns. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 231-239, 1998.

LÜCKER, S.; WAGNER, M.; MAIXNER, F.; PELLETIER, E.; KOCH, H.; VACHERIE, B.; RATTEI, T.; DAMSTÉ, J.S.; SPIECK, E.; LE PASLIER, D.; DAIMS, H. A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 107, p. 13479-13484, 2010.

LUIZÃO, R.C.C.; BONDE, T.A.; ROSSWALL, T. Seasonal variation of soil microbial biomass - the effects of clearfilling a tropical rainforest and establishment of pasture in the Central Amazon. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, p. 805-813, 1992.

LUKOW, T.; DUNFIELD, P.F.; LIESACK, W. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 32, p. 241-247, 2000.

MALHI, Y.; ARAGÃO, L.E.O.C.; GALBRAITH, D. et al. Exploring the likelihood and mechanism of a climate-change-induced dieback of the Amazon rainforest. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 49, p. 20610-20615, 2009.

MALINGREAU, J.P.; EVA, H.D.; DE MIRANDA, E.E. Brazilian Amazon: A significant five year drop in deforestation rates but figures are on the rise again. **AMBIO**, Heidelberg, L2011. DOI: 10.1007/s13280-011-0196-7.

MARENCO, J.A. Extreme rainfall and the flood of the century in Amazonia 2009. In: ARNDT, D.S.; BARINGER M.O.; JOHNSON, M.R. (Ed.). **State of the Climate in 2009**. Special supplement of **Bulletin of the American Meteorological Society**, Easton, v. 91, p. 5149, 2010.

MCNAUGHTON, S.J. Biodiversity and function of grazing ecosystems. In: SCHULZE, E.D.; MOONEY, H.A. (Ed.). **Biodiversity and ecosystem function**. Weinheim: Springer-Verlag, 1994. p. 361-383.

MIURA, Y.; OKABE, S. Quantification of cell specific uptake activity of microbial products by uncultured Chloroflexi by microautoradiography combined with fluorescence in situ hybridization. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 42, p. 7380-7386, 2008.

NACKE, H.; THÜRMER, A.; WOLLHERR, A. et al. Pyrosequencing-based assesment of bacterial community structure along different management types in german forest and grassland soils. **PLoS ONE**, London, v. 6, p. 1-12, 2011.

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

NEHER, D.A. Soil community composition and ecosystem processes - Comparing agricultural ecosystems with natural ecosystems. **Agroforestry Systems**, Dordrecht, v. 45, p. 159-185, 1999.

O'NEILL, B.; GROSSMAN, J.; TSAI, S.M. et al. Bacterial community composition in Brazilian Anthrosol and adjacent soils characterized using culturing and molecular identification. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, p. 23-35, 2009.

ROESCH, L.F.W.; FULTHORPE, R.R.; RIVA, A. et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME Journal**, London, v. 1, p. 283-290, 2007.

ROUSK, J.; BROOKES, P.C.; BAATH, E. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth functional redundancy in carbon mineralization. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 75, p. 1589-1596, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSELL DW. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHMIDT, A.; HAFERBURG, G.; SENERIZ, M.; MERTEN, D.; BÜCHEL, G.; KOTHE, E. Heavy metal resistance mechanisms in Actinobacteria for survival in AMD contaminated soils. **Chemie der Erde**, Jena, v. 65, p. 131-144, 2005.

SCHLOSS, P.D. Evaluating different approaches that test whether microbial communities have the same structure. **The ISME Journal**, London, v. 2, p. 265-275, 2008.

SCHLOSS, P.D.; WESTCOTT, S.L.; RYABIN, T. et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 75, p. 7537-7541, 2009.

SANCHEZ, P.A.; BANDY, D.E.; VILLACHICA, J.H.; NICHOLAIDES, J.J. Amazon Basin soils: management for continuous crop production. **Science**, Washington, DC, v. 216, p. 821-827, 1982.

SINGLETON, D.R.; FURLONG, M.A.; RATHBUN, S.L.; WHITMAN, W.B. Quantitative comparisons of 16 rDNA sequence libraries from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, p. 4373-4376, 2001.

STEINER, C.; DAS, K.C.; GARCIA, M.; FÖRSTER, B.; ZECH, W. Charcoal and smoke extract stimulate the soil microbial community in a highly weathered xanthic ferralsol. **Pedobiologia**, Jena, v. 51, p. 359-366, 2008.

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

TRIPATHI, N.; SINGH, R.S. Cultivation impacts nitrogen transformation in Indian forest ecosystems. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Heidelberg, v. 77, p. 233-243, 2007.

VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 703-707, 1987.

VARTOUKIAN, S.R.; PALMER, R.M.; WADE, W.G. The division 'Synergistes'. **Anaerobe**, Amsterdam, v. 13, p. 99-106, 2007.

WANG, Q.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M.; COLE, J.R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 73, p. 5261-5267, 2007.

WOODS, W.I.; MCCANN, J.M. The anthropogenic origin and persistence of Amazonian dark earths. In: UNIVERSITY OF TEXAS. **The yearbook of the conference of Latin American Geographers**. Austin, TX, 1999. v. 25, p. 7-14.

YOUSSEF, N.H.; ELSHAHED, M.S. Diversity rankings among bacterial lineages in soil. **The ISME Journal**, London, v. 3, p. 305-313, 2009.

ZAVALLONI, C.; ALBERTI, G.; BIASIOL, S.; VEDOIVE, G.D.; FORNASIER, F.; LIU, J.; PERESSOTTI, A. Microbial mineralization of biochar and wheat straw mixture in soil: A short-term study. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 50, p. 45-51, 2011.



### 3 COMUNIDADES BACTERIANAS DA RIZOSFERA DE PLANTAS LEGUMINOSAS NA TERRA PRETA DE ÍNDIO

#### RESUMO

O tipo de planta é um papel determinante na estrutura das comunidades microbianas do solo, pois as plantas são as principais fontes específicas de carbono e de energia. Ainda não é bem conhecida como a rizosfera na presença de diferentes tipos de solos podem afetar as comunidades bacterianas, principalmente em condições tropicais úmidas. Pouco é conhecido sobre o efeito de espécies de plantas leguminosas em Terra Preta de Índio (TPI) nas comunidades microbianas da rizosfera. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos de duas espécies de plantas leguminosas nativas, que frequentemente ocorrem na região Amazônica em sítios florestais (*Mimosa debilis*) e em áreas de clareiras (*Senna alata*), nas comunidades bacterianas da rizosfera da TPI e solo adjacente (Argissolo amarelo). A estrutura da comunidade bacteriana foi avaliada utilizando a técnica de Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP) e a composição da comunidade bacteriana foi acessada por sequenciamento em larga escala (pirosequenciamento), e os resultados analisados em conjunto com as características abióticas do solo e biomassa da planta. Em ambos os solos, a análise de T-RFLP mostrou claramente menor riqueza e diversidade das comunidades bacterianas na rizosfera de *S. alata* quando comparadas com *M. debilis* e solo controle (sem planta). Diferenças na composição de alguns filos bacterianos da rizosfera de *M. debilis* e *S. alata* mostraram efeitos da região da raiz que contribuíram para moldar as comunidades bacterianas. Adicionalmente, os filos mais abundantes (*Acidobacteria*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria*) foram mais influenciados pelo tipo de solo do que pelas espécies de plantas. Estes resultados mostram que a interação entre espécies de plantas e tipo de solo contribuíram para moldar as comunidades bacterianas na TPI.

Palavras-chave: Terra Preta de Índio. Rizosfera. Bactéria. T-RFLP. Pirosequenciamento.



## **RHIZOSPHERE BACTERIAL COMMUNITIES OF LEGUMINOUS PLANTS IN AMAZONIAN DARK EARTH**

### **ABSTRACT**

Plant type is one determinant factor in structuring soil microbial community, as plants are the main sources of specific forms of carbon and energy. Still it is not well known how the rhizosphere from highly contrasting soil types may affect bacterial communities, especially under humid tropical conditions. Knowledge on the effects of native leguminous plant species in Amazonian Dark Earth (ADE) rhizosphere microbial communities is still not known. Therefore, the aim of this study was to assess the effects of two leguminous plant species, which frequently occur in the Amazon region in forest sites (*Mimosa debilis*) and open areas (*Senna alata*), on rhizosphere bacterial communities of ADE and its adjacent soil (Haplic Acrisol). Bacterial community structure was evaluated using the Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) and bacterial community composition by high-throughput sequencing (pyrosequencing), and resulting data analyzed together with soil abiotic characteristics and plant biomass. In both soil types, T-RFLP analysis showed a clear rhizosphere effect of *S. alata* on richness and diversity of bacterial communities which were lower when compared to *M. debilis* and the control soil (without plant). Differences in composition of some rhizosphere bacterial phyla from *M. debilis* and *S. alata* showed that root zones effects contributed to shape these bacterial communities. Furthermore, the most abundant phyla (Acidobacteria, Actinobacteria and Proteobacteria) were mostly influenced by soil type than by plant species. These results showed that the interaction of plant species and soil type all contributed to shape the bacterial communities of ADE.

Key-words: Amazonian Dark Earth. Rhizosphere. Bacteria. T-RFLP. Pyrosequencing.

### 3.1 Introdução

O tipo de planta é um fator determinante para moldar a estrutura de comunidades microbianas do solo, pois as plantas são responsáveis pelas principais fontes de carbono e energia (GARBEVA; van VEEN; van ELSAS, 2004). Desse modo, a atividade do sistema das raízes pode estar igualmente envolvida na deposição de componentes orgânicos em solos. Os exudatos das raízes são conhecidos como um dos principais fatores que afetam as comunidades microbianas. As raízes das plantas liberam componentes orgânicos solúveis, como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, atraindo provavelmente as comunidades microbianas. A rizosfera é o solo presente na região da raiz que está sujeito diretamente à influência das raízes das plantas, e é caracterizado por elevada atividade microbiana (HILTNER, 1904). O habitat das raízes das plantas e próximo da raiz é uma região muito complexa, a qual a maior parte dos micro-organismos presentes ainda é desconhecida e não cultiváveis (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995).

A estrutura e função das comunidades microbianas da rizosfera são influenciadas por diversos fatores. Alguns estudos têm mostrado que mudanças na composição das comunidades microbianas estão associadas à diferenças em enzimas presentes nos solos e que estão envolvidas nos ciclos do C e N (KOURTEV; EHRENFELD; HAGGBLOM, 2002; MARSCHNER; GRIERSON; RENGEL, 2005). A presença das plantas pode também favorecer o seu próprio crescimento por ser capaz de alterar as propriedades do solo (e.g. viabilidade de nutrientes) assim como ativar a atividade biológica do solo a qual também pode inibir o crescimento de outras plantas (NIU et al., 2007). Além disso, existe evidência de que os micro-organismos estão envolvidos em diversos processos na rizosfera, como por exemplo, a mobilização de nutrientes na região da rizosfera (SCHILLING et al., 1998; DEUBEL; GRANSEE, 1996), e que os exudatos das plantas afetam a interação entre os exudatos das raízes e os micro-organismos (DEUBEL; GRANSEE; MERBACH, 2000). Diversos estudos foram conduzidos com o intuito de avaliar o impacto de diferentes espécies de plantas nas comunidades microbianas da rizosfera. Rizodépósitos podem ser altamente específicos para determinada espécie de planta e acredita-se que este pode seletivamente enriquecer a rizosfera com micro-organismos capazes de utilizar diversos compostos orgânicos (DUINEVELD et al., 1998; 2001).

Alguns outros estudos observaram a seleção de grupos específicos na rizosfera de plantas hospedeiras do fungo patogênico *Verticillium dahlia* (SMALLA et al., 2001), plantas pioneiras ou nativas da Holanda (KOWALCHUK et al., 2002), e espécies de bactéria e arqueia associadas à supressão de doenças (MENDES et al., 2011). Muitos desses estudos na rizosfera têm confirmado a influência das raízes das plantas na estrutura e composição das comunidades microbianas. No entanto, outros estudos têm mostrado um forte impacto das propriedades do solo na estrutura da comunidade microbiana da rizosfera (GIRVAN et al., 2003; NUNAN et al., 2005) enquanto outros têm indicado a importância tanto das espécies de plantas quanto das características dos solos (ALVEY et al., 2003; MARSCHNER et al., 2001).

Ainda não é bem conhecido como diferentes espécies de plantas podem selecionar comunidades microbianas da rizosfera de solos com propriedades contrastantes, principalmente sob condições tropicais úmidas. Os efeitos de plantas leguminosas nativas da Amazônia cultivadas em solos ricos com carvão (i.e. Terra Preta de Índio - TPI) nas comunidades bacterianas da rizosfera ainda é desconhecido. Os tecidos de plantas leguminosas capazes de nodular e de espécies de plantas não noduladoras tendem a ser mais ricas em N do que a maior parte das plantas não leguminosas (MCKEY, 1994), o que provavelmente ocasionará mudanças nas comunidades microbianas da rizosfera. Além disso, as TPIs são solos altamente férteis que foram criados intencionalmente ou não intencionalmente por populações pré-Colombianas e são capazes de se manter férteis mesmo após contínuo uso agrícola (LEHMANN et al., 2003; TEIXEIRA; MARTINS, 2003).

Portanto, o principal objetivo desse estudo foi acessar o efeito de duas plantas leguminosas nativas da região amazônica, que ocorrem frequentemente em áreas de floresta (*Mimosa debilis*) e áreas de clareira (*Senna alata*), cultivadas em TPI e seu solo adjacente (Argissolo amarelo, ACH) nas comunidades bacterianas da rizosfera. A estrutura da comunidade bacteriana foi avaliada pela técnica do Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP) e a composição dessas comunidades por sequenciamento em larga escala (pirosequenciamento).

## **3.2 Materiais e Métodos**

### **3.2.1 Experimento em casa de vegetação**

Os solos para o experimento da rizosfera foram coletados na Estação Experimental do Caldeirão pertencente à Embrapa Amazônia Ocidental, Iranduba, Amazonas. Os solos foram coletados em duas áreas de floresta secundária (uma na TPI e outra no solo adjacente, ACH) e em duas áreas com plantio de mandioca (uma na TPI e outra no solo adjacente, ACH). Informação detalhada sobre a descrição e classificação dos solos encontra-se na Seção Materiais e Métodos (página 31, capítulo 2). As amostras foram coletadas em tubos de PVC (10 cm de diâmetro e 15 cm de altura) e estabelecidas em triplicatas para cada tratamento (duas espécies de plantas nativas e um solo controle sem planta) do mesocosmo. O experimento foi estabelecido em casa de vegetação da Embrapa Amazônia Ocidental. Duas espécies leguminosas nativas foram selecionadas para o cultivo em experimento de mesocosmo, sendo uma tipicamente encontrada em áreas de floresta (*Mimosa debilis*) e outra em áreas de clareiras (*Senna alata*). Antes do sementeamento, as sementes (provenientes do banco de sementes do INPA-Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas) foram esterilizadas por breve imersão em álcool 70%, e para aumentar o poder de germinação estas foram tratadas com água quente a 100°C ou por escarificação mecânica. As sementes foram germinadas diretamente no mesocosmo e regadas diariamente até atingir a capacidade de retenção de água do solo. O experimento de mesocosmo foi mantido sob temperatura e condições de luminosidade locais. Após 90 dias de crescimento, as plantas foram cuidadosamente removidas dos mesocosmos e os solos aderentes à raiz foram considerados como solos da rizosfera.

### **3.2.2 Propriedades químicas da rizosfera e solo controle e peso da biomassa seca da parte aérea**

Amostras de solos foram retiradas de cada mesocosmo em novembro de 2008 para determinar o efeito da presença das raízes nas propriedades químicas do solo. Após as plantas serem cuidadosamente retiradas dos mesocosmos, estas foram agitadas vigorosamente dentro de sacos plásticos sendo estes os solos enviados para a determinação das propriedades químicas do solo. As amostras de solos foram analisadas em triplicatas para pH (H<sub>2</sub>O, 1:1),

extratores de Al, Ca e Mg (1M KCl), extratores de Cu, Fe, K, Mn, Na, P e Zn (solução dupla de ácido sulfúrico a 0,025M e ácido clorídrico a 0,05M, Mehlich-1), C orgânico do solo (C-solo) (método Walkely-Black; matéria orgânica do solo (MO) = C-solo x 1,724) e capacidade de troca de cátions (CTC) (soma de todos os cátions trocáveis mais o Al e H trocáveis) (EMBRAPA, 1998). As plantas foram colhidas após 90 dias, e a biomassa seca da parte aérea foi determinada após secagem a 60°C por 48h.

### **3.2.3 Análise das propriedades químicas e biomassa seca da parte aérea**

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a  $P < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa STATISTICA v.10 (StatSoft, Tulsa, Ok, USA).

### **3.2.4 Extração de DNA da rizosfera e solos controle**

A extração de DNA da rizosfera e solos controle foram realizadas em triplicatas para cada amostra utilizando o kit de extração de DNA *MoBio PowerSoil DNA* de acordo com as instruções indicadas pelo fabricante (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA, USA). A pureza e a quantidade do DNA extraído foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 UV/vispectrophotometer, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany). O DNA obtido foi armazenado a -20°C.

### **3.2.5 T-RFLP do gene 16S rRNA de bactéria**

A estrutura da comunidade de bactéria foi determinada pela técnica de T-RFLP. Os primers utilizados para as reações de amplificação, o mix da reação (25 µL) e condições do termociclador estão descritos na Seção Material e Métodos (página 33, capítulo 2). Informações detalhadas sobre as análises dos dados de T-RFLP encontram-se na Seção Material e Métodos (página 35, capítulo 2).

### 3.2.6 Pirosequenciamento do gene 16S rRNA de bactéria

Sequências parciais do gene 16S rRNA foram obtidas a partir de pirosequenciamento utilizando os primers 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') e 806R (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3') tendo como alvo a região V3 (comprimento do fragmento ~ 350 pb) do gene 16S rRNA (LAUBER et al., 2008). Além disso, cada primer continha o adaptador GT *linker* da Roche 454-B *pyrosequencing*, enquanto o primer 806R continha o adaptador GG *linker* também da Roche 454-A. Cada primer continha um *barcode* de 12 pb. As reações de amplificação foram realizadas em triplicatas em mix contendo 2,5x de tampão, 0,2 mM of cada dNTP, 0,5 µM de cada primer (Alpha DNA, Montreal, Canada), 10 ng de DNA e 0,056 U de *FastStart High Fidelity PCR System enzyme blend* (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) e água MilliQ até atingir o volume final de 25 µL. As condições do termociclador foram 95°C por 5 min, seguidos de 25 ciclos a 95°C por 30s, 53°C por 1 min, 59°C por 45s, e extensão final de 72°C por 10 min. Cada produto de PCR foi purificado utilizando o kit da *Qiagen PCR purification kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA) e quantificados em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Os produtos purificados foram enviados para pirosequenciamento à MacroGen Inc. Company (South Korea) em sequenciador *Genome Sequencer FLX System* (454 Life Sciences, Branford, CT, USA).

### 3.2.7 Análise de pirosequenciamento

Os dados de pirosequenciamento foram processados utilizando o pipeline QIIME v. 1.2.1 (CAPORASO et al., 2010). As sequências foram extraídas do arquivo *Standard Flowgram Format* (SFF) utilizando a plataforma *Galaxy* (GOECKS; NEKRUTENKO; TAYLOR, 2010). O comprimento médio das sequências foram entre 200 a 350 pb com índice de qualidade inferior a 20. Erros nas sequências introduzidos durante o pirosequenciamento foram detectados com o programa Denoiser 0.91 (REEDER; KNIGHT, 2010). Sequências quiméricas foram checadas utilizando a implementação UCHIME (EDGAR et al., 2011). Sequências de qualidade foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) com *cutoff* de 97% utilizando o programa UCLUST v. 1.2.21 (EDGAR, 2010). A taxonomia das sequências foi atribuída a sequências representativas do *Ribosomal Database Project* (RDP) *classifier*. Análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) foi utilizada

para verificar possíveis diferenças entre a composição de bactérias na rizosfera e solo controle. Correlações entre os grupos filogenéticos, propriedades do solo e biomassa seca da parte aérea foram testadas pelo coeficiente de correlação de Spearman. As análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA v. 10 (StatSoft, Tulsa, USA).

### **3.3 Resultados**

#### **3.3.1 Propriedades do solo e da rizosfera e biomassa seca da parte aérea**

A presença das raízes das plantas teve um efeito substancial nas propriedades químicas do solo, especialmente devido à presença das plantas (Tabela 3.1). Decréscimos significativos foram observados nos teores de Ca, CTC, K, Mg, Mn, Na, C-solo e matéria orgânica (MO) em TPI cultivada com *M. debilis* e *S. alata* quando comparada ao solo controle (vasos sem planta). Além disso, a presença das raízes causou um aumento na concentração de Cu e Fe nas TPIs. Resultados similares ao da TPI não foram observados em ACH, independente da espécie de planta, mas foi observado no teor de Na. Ainda em ACH, os conteúdos de Mn e Zn mostraram um aumento significativo em *S. alata*.

Após 90 dias, a parte aérea das plantas também foi coletada, e após secagem foi feita pesagem da biomassa seca da parte aérea. As médias da biomassa seca das duas plantas estudadas e cultivadas em TPI e ACH apresentam-se na Tabela 3.2. Plantas cultivadas na TPI apresentaram maior biomassa seca quando comparadas com as plantas cultivadas em ACH. Além disso, diferenças significativas na biomassa seca foram observadas entre *M. debilis* e *S. alata* cultivadas em TPI, mas não em ACH.

Tabela 3.1 - Propriedades do solo da rizosfera e solo controle da Terra Preta de Índio e solo adjacente (Argissolo amarelo, ACH)

Propriedades do solo	Terra Preta de Índio			Solo adjacente (ACH)		
	<i>M. debilis</i>	<i>S. alata</i>	Controle	<i>M. debilis</i>	<i>S. alata</i>	Controle
Al	0,03±0,02	0,05±0,04	0,00±0,01	1,71±0,22	1,41±0,18	1,84±0,16
Ca	3,74±0,12 b	3,97±0,09 b	5,39±0,48 a	0,18±0,06	0,32±0,16	0,14±0,06
CTC	4,70±0,15 b	5,16±0,11 b	6,98±0,62 a	2,04±0,30	1,94±0,34	2,15±0,22
Cu	1,19±0,12 a	1,26±0,18 a	0,78±0,11 b	0,08±0,01	0,70±1,01	0,11±0,02
Fe	24±3 a	27±4 a	18±3 b	237±51	183±120	228±11
K	103±1 b	102±1 b	106±1 a	102±1	102±1	103±1
Mg	0,87±0,08 b	1,08±0,06 b	1,47±0,13 a	0,10±0,01	0,13±0,03 a	0,10±0,02 b
Mn	57,13±8,93 b	73,88±5,58 b	87,26±10,27 a	0,75±0,06 b	17,96±27,41 a	1,27±0,22 a
Na	102±0 b	101±1 b	103±1 a	104±1 b	102±1	103±1
P	117±24	136±43	132±9	4±0	5±1	8±5
pH <sub>água</sub>	5,32±0,17	5,18±0,18	5,46±0,13	3,59±0,12	3,81±0,18	3,67±0,34
C-solo	13,40±0,72 b	13,39±1,09 b	17,89±0,72 a	8,92±1,05	9,27±1,54	9,67±1,01
MO	23,04±1,24 b	23,02±1,88 b	30,77±1,88 a	15,35±1,82	15,95±2,65	16,63±1,74
Zn	16,43±2,28	15,18±3,05	18,37±0,67	4,34±3,10 b	13,49±4,84 a	2,42±2,63 b

<sup>a</sup> Al, Ca, CTC, Mg (cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>); C-solo, MO (g kg<sup>-1</sup>); Cu, Fe, K, Mn, Na, P, Zn (mg dm<sup>-3</sup>).

<sup>b</sup> Abreviações: CTC, capacidade de troca de cátions; C-solo, carbono orgânico do solo; MO, matéria orgânica do solo.

<sup>c</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (teste de Tukey,  $P < 0,05$ ).



Tabela 3.2 - Peso seco da biomassa da parte aérea de *M. debilis* e *S. alata* cultivadas na Terra Preta de Índio e solo adjacente (Argissolo amarelo, ACH)

Solos	Plantas	
	<i>Mimosa debilis</i>	<i>Senna alata</i>
Terra Preta de Índio	2,67±0,40 a	1,60±0,21 b
Solo adjacente (ACH)	0,54±0,28 c	0,81±0,02 c

### 3.3.2 Estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera e solo controle

A análise de T-RFLP do gene 16S rRNA foi utilizada para investigar a estrutura das comunidades de bactérias da rizosfera e solo controle na TPI (solo rico em nutrientes e carvão) e ACH (solo pobre em nutrientes e sem a presença de carvão). A análise de ordenação MDS, a partir dos dados de T-RFLP, indicou claramente que a rizosfera e o solo controle influenciaram as estruturas das comunidades bacterianas. O perfil de T-RFLP também mostrou um forte efeito das propriedades do solo na estrutura das comunidades bacterianas da rizosfera. As mudanças observadas na estrutura das comunidades bacterianas da rizosfera foram confirmadas por PERMANOVA mostrando diferenças significativas dependendo da espécie de planta e tipo de solo ( $P = 0,001$ ).

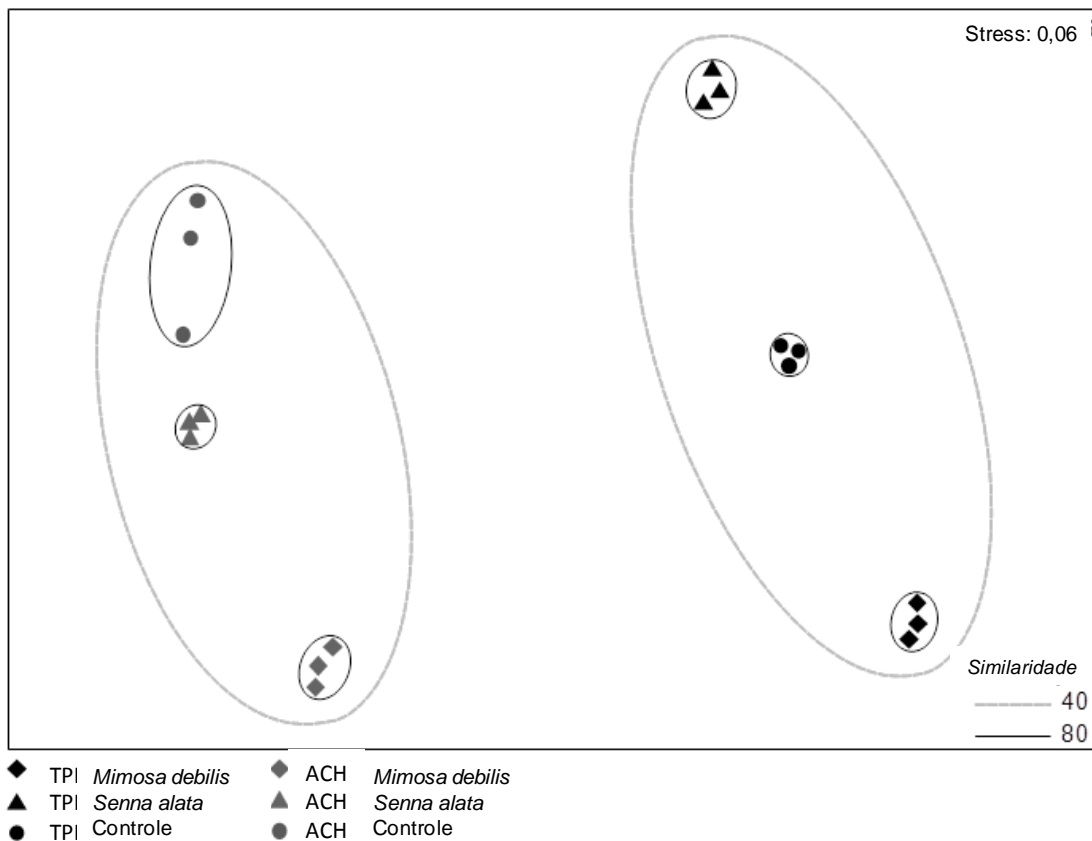


Figura 3.1 - Análise de ordenação de escala multidimensional (MDS) baseada no coeficiente de similaridade de Bray Curtis (transformação via raiz quadrada) das comunidades de bactéria da rizosfera e solo controle em Terra Preta de Índio (TPI) e solo adjacente (Argissolo amarelo, ACH)

Os padrões observados pela análise de MDS e PERMANOVA foram também verificados pela Análise de Similaridade (ANOSIM). O teste ANOSIM também apresentou diferenças significativas ( $R = 1$ ,  $P < 0,001$ ) na estrutura das comunidades bacterianas da rizosfera e solo controle para todas as amostras estudadas.

Apesar do efeito dominante do solo, a partir dos dados obtidos pelo T-RFLP, claras diferenças foram observadas entre a rizosfera e o solo controle principalmente na riqueza de T-RFs e no índice de diversidade de Shannon (Tabela 3.3). Houve um significativo decréscimo na riqueza de T-RFs e diversidade na rizosfera de *S. alata* quando comparada a *M. debilis* e ao solo controle, independente do tipo de solo. A riqueza de T-RFs e o índice de diversidade de Shannon foram similares entre *M. debilis* e o solo controle.

Tabela 3.3 - Número total de T-RFs e índices de riqueza ( $d$ ) e diversidade de Shannon ( $H'$ ) das comunidades de bactéria da rizosfera e solo controle em Terra Preta de Índio (TPI) e solo adjacente (Argissolo amarelo, ACH)

Plantas e solos	Número total de T-RFs	$d$	$H'$
Terra Preta de Índio			
<i>Mimosa debilis</i>	56	13,03 ab	3,94
<i>Senna alata</i>	39	11,32 b	3,74
Controle	58	13,64 a	3,90
Solo adjacente (ACH)			
<i>Mimosa debilis</i>	50	12,10 a	3,73 a
<i>Senna alata</i>	47	9,51 b	3,50 b
Controle	57	13,56 a	3,89 a

### 3.3.4 Composição bacteriana da rizosfera e solo controle

As sequências classificadas para a rizosfera e solo controle foram afiliadas em 13 diferentes filos e estão apresentadas na Tabela 3.4. Os filos mais abundantes (> 5%) variaram de acordo com o tipo de solo. Os filos dominantes na TPI foram *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia* e *Bacteroidetes*. Para ACH, os filos mais abundantes foram *Proteobacteria*, *Acidobacteria* e *Actinobacteria*. Entre os filos raros (< 1%) encontram-se *Chlamydiae*, *Chloroflexi* e *Cyanobacteria* observados em ambos os solos.

Tabela 3.4 - Composição das comunidades de bactéria da rizosfera e solo controle em Terra Preta de Índio (TPI) e solo adjacente (Argissolo amarelo, ACH)

Filos	TPI	TPI	TPI	ACH	ACH	ACH
	<i>S. alata</i>	<i>M. debilis</i>	Controle	<i>S. alata</i>	<i>M. debilis</i>	Controle
<i>Acidobacteria</i>	9,68±1,90	11,61±0,78	9,37±0,83	23,74±4,70	31,74±5,86	28,72±6,84
<i>Actinobacteria</i>	7,17±2,02	6,69±0,39	6,68±0,66	13,18±3,57	9,76±1,74	11,33±1,71
<i>Bacteroidetes</i>	7,27±3,22	6,42±1,39	3,69±0,75	2,62±0,18a	1,68±0,40b	1,21±0,66b
<i>Chlamydiae</i>	0,16±0,14	0,22±0,10	0,32±0,09	0,62±0,47	0,56±0,47	0,54±0,40
<i>Chloroflexi</i>	0,21±0,13	0,12±0,08	0,12±0,08	0,00±0,00	0,06±0,03	0,01±0,01
<i>Cyanobacteria</i>	0,09±0,10	0,13±0,10	0,10±0,08	0,08±0,03	0,11±0,12	0,04±0,07
<i>Firmicutes</i>	4,92±2,84	1,44±0,55	1,03±0,18	0,90±0,11b	0,71±0,19b	1,44±0,38a
<i>Gemmatimonadetes</i>	0,82±0,11b	1,20±0,06b	1,49±0,42a	0,20±0,08	0,55±0,15	0,58±0,35
<i>Nitrospira</i>	1,93±0,29	2,25±0,24	2,52±0,68	0,00±0,00	0,06±0,05	0,14±0,10
<i>Planctomycetes</i>	2,40±0,63b	2,56±0,37b	3,79±0,35a	1,26±0,22	1,04±0,10	1,59±1,10
<i>Proteobacteria</i>	33,41±2,58	33,36±0,57	30,13±3,46	41,94±2,94	38,00±5,29	33,12±4,65
<i>Verrucomicrobia</i>	6,19±0,64b	8,22±1,33b	11,22±1,26a	3,61±0,68	3,05±1,54	3,43±0,98
WS3	1,62±0,61a	0,44±0,31b	0,56±0,27ab	0,00±0,00	0,00±0,00	0,03±0,03
Outros	24,11±3,41	25,31±1,79	28,94±1,97	11,84±1,28	12,84±1,61	17,8±5,09

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (teste de Tukey,  $P < 0,05$ ).

A abundância dos diferentes filos bacterianos foi afetada dependendo da espécie de planta e tipo de solo. As abundâncias relativas de *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes* e *Verrucomicrobia* apresentaram um decréscimo significativo em TPI-*M. debilis* e TPI-*S. alata* quando comparada aos solos controle. Além disso, houve um aumento significativo na abundância relativa de WS3 em TPI-*S. alata*. Mudanças na abundância relativa de alguns filos em ACH mostraram comportamento diferente aos observados na TPI. Apenas dois filos foram influenciados pela rizosfera. *Bacteroidetes* apresentou um significativo aumento em ACH-*S. alata*, e um decréscimo na abundância relativa de *Firmicutes* foram observados em ACH-*M. debilis* e ACH-*S. alata*. Curiosamente, houve um aumento significativo de *Proteobacteria* em ACH-*M. debilis* e ACH-*S. alata* quando comparado a TPI-*M. debilis* e TPI-*S. alata*.

### **3.3.5 Relação entre a estrutura e a composição da comunidade bacteriana com as propriedades do solo e biomassa seca da parte aérea**

Os padrões de T-RFLP da rizosfera e solo controle mostraram diferenças significativas na estrutura da comunidade bacteriana (PERMANOVA,  $P = 0,001$ ). O procedimento BEST foi aplicado para determinar quais propriedades do solo melhor explicam as diferenças observadas na estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera. Quando todas as amostras foram incluídas na análise, as propriedades do solo Al e P foram as que se correlacionaram com a estrutura da comunidade bacteriana (correlação de Spearman,  $Rho = 0,604$ ,  $P = 0,001$ ). E quando analisadas separadamente, dependendo do tipo de solo, a estrutura da comunidade bacteriana na TPI se correlacionou com Mg e Mn (correlação de Spearman,  $Rho = 0,363$ ,  $P = 0,300$ ), e de ACH se correlacionou com Mg, Mn e P (correlação de Spearman,  $Rho = 0,275$ ,  $P = 0,402$ ). No entanto, as correlações obtidas separadamente por tipo de solo não apresentaram diferenças significativas.

Com a intenção de relacionar a composição da comunidade bacteriana da rizosfera com as propriedades do solo e biomassa seca da parte aérea, foi aplicada a correlação separadamente para TPI e ACH (Tabela 3.5). Ao contrário dos resultados de T-RFLP, a correlação entre a abundância dos filamentos, propriedades do solo e biomassa seca da parte aérea apresentaram correlações significativas para diferentes filamentos em TPI e ACH.

Tabela 3.5 - Correlação de Spearman entre filios de bactérias da rizosfera e solos controle com as propriedades do solo

Filos	Al	Ca	CTC	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	C-solo	MO	Zn	Biomassa
Terra Preta de Índio													
<i>Acidobacteria</i>		-0,767*	-0,817**				-0,783*						0,763*
<i>Bacteroidetes</i>								-0,683*	-0,755*				
<i>Cyanobacteria</i>						-0,748*							
<i>Firmicutes</i>					0,840**					-0,667*	-0,667*		
<i>Gemmatimonadetes</i>				-0,667*									
<i>Planctomycetes</i>			0,683*			0,916***	0,700*		0,843**				
<i>Verrucomicrobia</i>				-0,683*		-0,840**				0,733*	0,733*		
Solo adjacente (ACH)													
<i>Bacteroidetes</i>	-0,767*						0,706*					0,733*	
<i>Chlamydiae</i>		0,729*	0,733*				0,790*						
<i>Chloroflexi</i>								0,694*					
<i>Cyanobacteria</i>													0,749*
<i>Firmicutes</i>													0,848**
<i>Gemmanotinadetes</i>									-0,858**			-0,733*	
<i>Nitrospira</i>								0,831**	0,740*				
WS3		0,720*										0,707*	

<sup>a</sup> \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ ; <sup>b</sup> Abreviações: CTC, capacidade de troca de cátions; C-solo, carbono orgânico do solo; MO, matéria orgânica do solo.

Para TPI, por exemplo, *Acidobacteria* apresentou correlação negativa com Ca, CTC e Mg, mas positiva com a biomassa seca da parte aérea. *Bacteroidetes* mostrou correlação negativa com Mn e Na. *Firmicutes* apresentou forte correlação positiva com Fe e se correlacionou negativamente com C-solo e MO. *Planctomycetes* apresentou correlação positiva com K, seguida de CTC, Mg e Na. *Verrucomicrobia* se correlacionou negativamente com Cu e K, e se correlacionou positivamente com C-solo e MO. Em ACH, *Bacteroidetes* se correlacionou negativamente com Al e positivamente com Mg e Zn. *Firmicutes* mostrou forte correlação com a biomassa seca da parte aérea. *Chlamydiae*, *Chloroflexi*, *Nitrospira* e *WS3* apresentaram correlação apenas com a propriedade do solo de ACH. *Chlamydiae* se correlacionou positivamente com Ca, CTC e Mg, e *Chloroflexi* com Mn. *Gemmanotinadetes* teve forte correlação negativa com Na, e *Nitrospira* correlação positiva com Mn. *WS3* se correlacionou positivamente com Ca e Zn.

### 3.4 Discussão

#### 3.4.1 Variação nas propriedades do solo e biomassa seca da parte aérea

A presença das raízes das plantas teve um substancial efeito nas propriedades químicas dos solos estudados, especialmente na TPI (Tabela 3.1). Maior parte dessas propriedades do solo mostraram uma redução em seu conteúdo nos solos influenciados pela raiz na TPI, independente da espécie de planta. As propriedades químicas das raízes, que consequentemente podem influenciar a nutrição mineral das plantas, já foram apresentadas para diversas espécies de plantas (HINSINGER; GILKES, 1996; MARSCHNER et al., 1986). A diminuição no conteúdo de K, por exemplo, também foi observado na rizosfera de *B. napus* (KUCHENBUCH; JUNGK, 1982) e acredita-se que essa diminuição em K pode ter sido pela consequente utilização desse nutriente pelas plantas (HINSINGER; JAILLARD, 1993). Outro estudo mostrou uma maior concentração em Mn nas raízes de *L. albus* (DINKELAKER; RÖMHELD; MARSCHNER, 1989). A mesma tendência foi observada apenas para Na em ACH nas duas plantas estudadas, indicando que as raízes das plantas tiveram um menor efeito nas propriedades químicas de ACH. Curiosamente, houve um aumento no teor de Cu e Fe em ambas as plantas cultivadas na TPI, e em Zn quando cultivada em ACH-*S. alata*. Dinkelaker, Römheld e Marschner (1989) também observaram um aumento na viabilidade de Fe e Zn na rizosfera. É também conhecido que fitosideróforos liberados pelas

raízes das plantas aumentam a viabilidade de Fe e Zn (VON WIRÉN; RÖMHELD; MARSCHNER, 1993; NORVELL et al., 1993; ZHANG, 1993). McGrath, Shen e Zhao (1997) hipotetizaram que o solo da rizosfera tende a possuir uma elevada concentração de Zn quando comparado ao solo controle sem a presença da raiz, devido ao menor pH observado na rizosfera. Outro resultado interessante nesse estudo foi o decréscimo significativo no conteúdo de C-solo e MO tanto em *M. debilis* quanto em *S. alata*. Bambara e Ndakidemi (2010) observaram, por exemplo, que a presença de *Rhizobium* causou um decréscimo na acidez do solo, aumentando assim o pH. Solos ácidos são conhecidos por limitar a absorção de alguns nutrientes importantes como o P (DAKORA; PHILLIPS, 2002) e na decomposição de materiais orgânicos no solo (MOTAVALLIET et al., 1995). De fato, TPI apresenta elevados valores de pH e suporta uma quantidade significativa de nutrientes importantes para a planta como o P e N (LEHMANN et al., 2003) e parece que essa característica da TPI influenciou positivamente o crescimento das plantas leguminosas estudadas (Tabela 3.1).

### **3.4.2 Influência das plantas leguminosas na estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera**

Vários estudos têm sido realizados para explorar a influência da rizosfera na estrutura das comunidades bacterianas (KOWALCHUK et al., 2002; MARSCHNER; CROWLEY; YANG, 2004; SMALLA et al., 2001); no entanto, maior parte dessas pesquisas são em plantas agrícolas ou em regiões temperadas. Nesse estudo, foi acessada a estrutura da comunidade bacteriana, a partir da técnica de T-RFLP, da rizosfera de duas plantas nativas da Amazônia cultivadas em TPI e ACH. A análise de ordenação MDS mostrou claramente uma alteração na estrutura da comunidade bacteriana devido a presença das plantas tanto em TPI quanto em ACH (Figura 3.1), sendo possível detectar uma forte influência do solo assim como da planta. Em revisões realizadas por Garbeva, van Veen e van Elsas (2004), o tipo de planta e o tipo de solo influenciam a comunidade microbiana do solo de uma forma complexa na qual o tipo de planta, o tipo de solo ou os dois são fatores determinantes em moldar a estrutura desses micro-organismos. A diferença na quantidade e composição dos exudatos radiculares é importante para determinar diferenças nas comunidades bacterianas da rizosfera (MARSCHNER; GRIERSON; RENGEL, 2005). Alguns estudos têm mostrado que as propriedades dos solos influenciam fortemente a estrutura das comunidades bacterianas (JESUS et al., 2010; KURAMAE et al., 2011), e que diferentes tipos de solos são conhecidos



por possuir comunidades bacterianas distintas, os quais parecem ser independentes mesmo sob a presença de diferentes espécies de planta (DALMASTRI et al., 1999; KOWALCHUK et al., 2000). No entanto, Montealegre et al. (2002), mostrou que a planta leguminosa *Trifolium repens* induziu diferenças na estrutura da comunidade microbiana na rizosfera e solo controle.

Os índices de riqueza e diversidade calculados a partir dos dados de T-RFLP apresentaram resultados interessantes (Tabela 3.3). Houve um decréscimo na riqueza de T-RFs e no índice de diversidade de Shannon em *S. alata* cultivada tanto sob TPI quanto sob ACH em comparação com o solo controle, no entanto, o mesmo não foi observado para *M. debilis*. Kowalchuk et al. (2002) também observaram uma menor diversidade na rizosfera quando comparados ao solo controle sem planta, e sugeriu que a rizosfera pode selecionar micro-organismos específicos do solo os quais podem ser altamente dependentes das plantas e reproduzíveis para cada tipo de planta. Outros pesquisadores sugeriram que diferentes espécies de plantas se diferenciam na quantidade e qualidade dos recursos que estas retornam para os solos o que conseqüentemente irá afetar a composição das comunidades microbianas (SMALLA et al., 2001; WARDLE; WALKER; BARDGETT, 2004). Um recente estudo observou que os ácidos orgânicos possuem um papel importante em moldar as comunidades bacterianas do solo e isto pode, portanto, ter um significativo impacto no crescimento das plantas e indicar a importância dos exudatos radiculares em influenciar a estrutura dessas comunidades (SHI et al., 2011).

### **3.4.3 A composição de bactérias em associação com as raízes de plantas leguminosas**

Apesar da rizosfera ter sua importância ecológica bem conhecida, pouco se sabe sobre a interação de plantas leguminosas e as comunidades microbianas do solo. Em uma tentativa de caracterizar a composição da comunidade bacteriana na rizosfera de duas plantas leguminosas nativas da Amazônia, a técnica de pirosequenciamento foi utilizada para acessar essas comunidades bacterianas da rizosfera sob a também influência das propriedades químicas da TPI e ACH (Tabela 3.4). Maior parte dos filos detectados na rizosfera e solo controle foram *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia* e *Bacteroidetes*. Destes filos, quatro foram observados em outros estudos da rizosfera utilizando a técnica de pirosequenciamento (JESUS et al., 2010; KOLTON et al, 2011).

O tipo de solo apresentou uma forte influência na abundância de alguns filos. Outros estudos já apresentaram uma maior influência do solo ao invés da presença de plantas ou da rizosfera na distribuição dos micro-organismos do solo (JESUS et al., 2010; KURAMAE et al., 2011). No entanto, é amplamente aceito que as espécies de plantas exercem um forte efeito nos micro-organismos do solo (SMALLA et al., 2001; MARSCHNER; CROWLEY; YANG, 2004). *Bacteroidetes*, por exemplo, mostrou um significativo aumento em sua abundância em ACH-*S. alata*, e um pequeno aumento também foi observado em ACH-*M. debilis*. TPI apresentou também um pequeno aumento na abundância desse filo na rizosfera de *S. alata* e *M. debilis*, no entanto, essas diferenças não foram significativas. Corroborando com esses resultados, Kolton et al. (2011) observaram uma maior abundância relativa do filo *Bacteroidetes* na rizosfera de plantas cultivadas em solos com a presença de carvão. *Firmicutes* também pareceu ter sido influenciado pela presença das plantas e tipo de solo. ACH, por exemplo, apresentaram um significativo decréscimo desse filo em ambas as plantas estudadas. *Proteobacteria* também apresentou um significativo aumento em ACH quando comparada às comunidades bacterianas da rizosfera na TPI. *Firmicutes* e *Proteobacteria* já foram apresentados como filos relacionados à rizosfera (DEANGELIS et al., 2009). Curiosamente, um aumento significativo de *Proteobacteria* foi observado em ACH-*M. debilis* e ACH-*S. alata* quando comparado a TPI-*M. debilis* e TPI-*S. alata*, mas não nos solos controle. Aparentemente, a interação das raízes de *M. debilis* e *S. alata* com as propriedades de ACH contribuíram para essas diferenças observadas na abundância de *Proteobacteria*. Investigações futuras desse filo são importantes, pois *Proteobacteria* cobre uma enorme gama de níveis morfológicos e de diversidade fisiológica que podem ter um papel importante nos ciclos do C, N e S (ACOSTA-MARTINEZ et al., 2010; KERSTERS et al., 2006). *Verrucomicrobia* também foi influenciado pela rizosfera, porém, apenas na TPI (Tabela 3.4). Um significativo decréscimo em *Verrucomicrobia* foi observado na rizosfera de ambas as plantas quando comparado ao solo controle. Corroborando com esse resultado, uma menor abundância de *Verrucomicrobia* foi observada na rizosfera de trigo (SANGUIN et al., 2006).

#### **3.4.4 Relação entre as comunidades bacterianas da rizosfera e as propriedades do solo**

A relação entre a estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera e as propriedades do solo, quando analisadas separadamente para TPI e ACH, não mostraram diferenças significativas utilizando os dados obtidos pela técnica de T-RFLP. No entanto, a composição da comunidade bacteriana da rizosfera, independente do tipo de solo, apresentou correlações

com as propriedades dos solos estudados utilizando a técnica de pirosequenciamento (Tabela 3.5).

Em TPI, observou-se uma forte correlação positiva entre *Planctomyces* e K seguida por Na, sugerindo que esta correlação pode estar relacionada aos solos controle, pois maiores concentrações de K e Na foram observadas nesses solos (Tabela 3.1). Similarmente, uma menor abundância de *Planctomyces* foi observada na rizosfera de trigo quando comparada ao solo controle sem influência da raiz (SANGUIN et al., 2006). Contrário a esses resultados, uma maior abundância de *Planctomyces* foi encontrada na rizosfera de *T. caeruleus* do que no solo controle (GREMION; CHATZINOTAS; HARMS, 2003). Por outro lado, o filo *Firmicutes* apresentou significativa correlação negativa com C-solo e MO indicando a influência da rizosfera na distribuição desse filo (Tabela 3.5). CLEVELAND et al. (2007) constataram também que o C-solo influenciou a abundância de *Firmicutes*, sugerindo que membros desse filo respondem a adição de C-solo. Além disso, *Verrucomicrobia* apresentou correlação positiva com C-solo e MO. Acosta-Martínez et al. (2010) observaram também correlação positiva entre *Verrucomicrobia* e CBM, indicando um envolvimento desse filo no ciclo do C.

### 3.5 Conclusões

Este estudo apresentou diferenças distintas de alguns filios bacterianos da rizosfera de plantas nativas leguminosas da Amazônia, assim como a influência do tipo de solo. Além disso, os filios mais abundantes (*Acidobacteria*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria*) foram mais influenciados pelo tipo de solo do que pelas espécies de plantas. Em ambos os solos estudados, a análise de T-RFLP apresentou um claro efeito da rizosfera de *S. alata*, apresentando uma menor riqueza e diversidade das comunidades bacterianas quando comparados com *M. debilis* e solo controle. Estes resultados demonstram que as interações entre as espécies de plantas e o tipo de solo contribuem para moldar a comunidade dos microrganismos do solo. Portanto, futuros estudos serão necessários para melhor compreender a interação das espécies de plantas e propriedades químicas e físicas do solo, e produtividade das plantas com enfoque em regiões tropicais úmidas.

## Referências

- ACOSTA-MARTINEZ, V.; DOWD, S.E.; BELL, C.; LASCANO, R.; BOOKER, J.D.; ZOBECK, T.M.; UPCHURCH, D.R. Microbial community comparison as affected by dryland cropping systems and tillage in a semiarid sandy soil. **Diversity**, Bethesda, v. 2, p. 910-931, 2010.
- ALVEY, S.; YANG, C.-H.; BUERKERT, A.; CROWLEY, D.E. Cereal/legume rotation effects on rhizosphere bacterial community structure in west african soils. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 37, p. 73-82, 2003.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 59, p. 143-169, 1995.
- BAMBARA, S.; NDAKIDEMI, P.A. Changes in selected soil chemical properties in the rhizosphere of *Phaseolus vulgaris* L. supplied with *Rhizobium* inoculants, molybdenum and lime. **Scientific Research and Essays**, Victoria Island, Lagos, v. 5, p. 679-684, 2010.
- CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, New York, v. 7, p. 335-336, 2010.
- CLEVELAND, C.C.; NEMERGUT, D.R.; SCHMIDT, S.K.; TOWNSEND, A.R. Increases in soil respiration following labile carbon additions linked to rapid shifts in soil microbial community composition. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 82, p. 229-240, 2007.
- DAKORA, F.D.; PHILLIPS, D.A. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 245, p. 35-47, 2002.
- DALMASTRI, C.; CHIARINI, L.; CANTALE, C.; BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S. Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations. **Microbial Ecology**, New York, v. 38, p. 273-284, 1999.
- DEANGELIS, K.M.; BRODIE, E.L.; DESANTIS, T.Z.; ANDERSEN, G.L.; LINDOW, S.E.; FIRESTONE, M.K. Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots. **The ISME Journal**, London, v. 3, p. 168-178, 2009.
- DEUBEL, A.; GRANSEE, A. Mechanismen der Phosphatmobilisierung aus Calciumphosphaten durch zwei Bakterienstämme. In: MERBACH, W. (Ed.). **Pflanzliche Stoffaufnahme und Mikrobielle Wechselwirkungen in der Rhizosphäre**. Stuttgart: B.G. Teubner Verlagsgesellschaft, 1996. p. 119-126.
- DEUBEL, A.; GRANSEE, A.; MERBACH, W. Transformation of organic rhizodeposition by rhizosphere bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 163, p. 387-392, 2000.
- DINKELAKER, B.; RÖMHELD, V.; MARSCHNER, H. Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.). **Plant, Cell and Environment**, Nottingham, v. 12, p. 285-292, 1989.

DUINEVELD, B.M.; ROSADO, A.S.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VEEN, J.A. Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of the chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, p. 4950-4957, 1998.

DUINEVELD, B.M.; KOWALCHUK, G.A.; KEIJZER, A.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VEEN, J.A. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, p. 172-178, 2001.

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

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

EMBRAPA. **Análises químicas para avaliação da fertilidade do solo**. Rio de Janeiro: EMBRAPA, CNPSo, 1998.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 243-70, 2004.

GIRVAN, M.S.; BULLIMORE, J.; PRETTY, J.N.; OSBORN, A.M.; BALL, A.S. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 1800-1809, 2003.

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

GREMION, F.; CHATZINOTAS, A.; HARMS, H. Comparative 16S rDNA and 16S rRNA sequence analysis indicates that Actinobacteria might be a dominant part of the metabolically active bacteria in heavy-contaminated bulk and rhizosphere soil. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 896-907, 2003.

HILTNER, L. Über neuere erfahrungen und probleme auf dem gebiet der bodenbakteriologie und unter besonderer berucksichtigung der grundung und brache. **Arbeiten der Deutsch Landwirtschafts-Gesellschaft**, Stuttgart, v. 98, p. 59-78, 1904.

HINSINGER, P.; JAILLARD, B. Root-induced release of interlayer potassium and vermiculization of phlogopite as related to potassium depletion in the rhizosphere of ryegrass. **Journal of Soil Science**, Oxford, v. 44, p. 525-534, 1993.

HINSINGER, P.; GILKES, R.J. Mobilization of phosphate from phosphate rock and alumina-sorbed phosphate by the roots of ryegrass and clover as related to rhizosphere pH. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 47, p.533-544, 1996.

JESUS, E. DA C.; SUSILAWATI, E.; SMITH, S.L.; WANG, Q.; CHAI, B.; FARRIS, R.; RODRIGUES, J.L.M.; THELEN, K.D.; TIEDJE, J.M. Bacterial communities in the rhizosphere of biofuel crops grown on marginal lands as evaluated by 16S rRNA gene pyrosequences. **Bioenergy Research**, New York, v. 3, p. 20-27, 2010.

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

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

KERSTERS, K.; DE VOS, P.; GILLIS, M.; SWINGS, J.; VANDAMME, P.; STACKEBRANDT, E. Introduction to the Proteobacteria. In: DWARKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The prokaryotes**. 3. ed. New York: Springer-Verlag, 2006. v. 5, p. 3-37.

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

KOURTEV, P.S.; EHRENFELD, J.G.; HAGGBLOM, M. Exotic plant species alter the microbial community structure and function in the soil. **Ecology**, Brooklyn, v. 83, p. 3152-3166, 2002.

KOWALCHUK, G.A.; STIENSTRA, A.W.; HEILIG, G.H.J.; STEPHEN, J.R.; WOLDENDORP, J.W. Changes in the community structure of ammonia-oxidizing bacteria during secondary succession of calcareous grasslands. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 2, p. 99-110, 2000.

KOWALCHUK, G.A.; BUMA, D.S.; BOER, W.DE., KLINKHAMER, P.G.L., VAN VEEN, J.A. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 81, p. 509-520, 2002.

KUCHENBUCH, R.O.; JUNGK, A. A method for determining concentration profiles at the soil-root interface by thin slicing rhizospheric soil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 68, p. 391-394, 1982.

KURAMAE, E.E.; YERGEAU, E.; WONG, L.C.; PIJL, A.S.; VAN VEEN, J.A.; KOWALCHUK, G.A. Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 12-24, 2011.

MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V.; HORST, W.J.; MARTIN, P. Root-induced changes in the rhizosphere: Importance for the mineral nutrition of plants. **Zeitschrift Pflanzenernahrung Bodenkunde**, Stuttgart, v. 149, p. 441-456, 1986.

MARSCHNER, P.; YANG, C.H.; LIEBEREI, R.; CROWLEY, D.E. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p.1437-1445, 2001.

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; YANG, C.H. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 261, p. 199-208, 2004.

MARSCHNER, P.; GRIERSON, P.F.; RENGEL, Z. Microbial community composition and functioning in the rhizosphere of three *Banksia* species in native woodland in Western Australia. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 28, p. 191-201, 2005.

MCGRATH, S.P.; SHEN, Z.G.; ZHAO, F.J. Heavy metal uptake and chemical changes in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi ochroleucum* grown in contaminated soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 188, p. 153-159, 1997.

MCKEY, D. Legumes and nitrogen: the evolutionary ecology of a nitrogen-demanding lifestyle. In: SPRENT, J.I.; MCKEY, D. (Ed.). **Advances in Legume Systematics 5: The Nitrogen Factor**. Kew, UK: Royal Botanic Gardens, 1994. p. 211-228.

MENDES, R.; KRUIJT, M.; DE BRUIJN, I.; DE KERS, E.; VAN DER VOORT, M.; SCHNEIDER, J.H.M.; PICENO, Y.M.; DESANTIS, T.Z.; ANDERSEN, G.L.; BAKKER, P.A.H.M. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science**, Washington, DC, v. 332, p. 1097-1100, 2011.

MOTAVALLI, P.P.; PALM, C.A.; PARTON, W.J.; ELLIOTT, E.; FREY, S.D. Soil pH and organic C dynamics in tropical forest soils: **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, p. 1589-1599, 1995.

MONTEALEGRE, C.M.; VAN KESSEL, C.; RUSSELLE, M.P.; SADOWSKY, M.J. Changes in microbial activity and composition in a pasture ecosystem. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 243, p. 197-207, 2002.

NIU, H.B.; LIU, W.X.; WAN, F.H.; LIU, B. An invasive aster (*Ageratina adenophora*) invades and dominates forest understories in China: altered soil microbial communities facilitate the invader and inhibit natives. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 294, p. 73-85, 2007.

NORVELL, W.A.; WELCH, R.M.; ADAMS, M.L.; KOCHLAN, L.V. Reduction of Fe(III), Mn(III), and Cu (II) chelates by roots of pea (*Pisum sativum* L.) or soybean (*Glycine max*). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 155/156, p. 123-126, 1993.

NUNAN, N.; DANIELL, T.J.; SINGH, B.K.; PAPERT, A.; MCNICOL, J.W.; PROSSER, J.I. Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils, characterized using molecular techniques. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 71, p. 6784-6792, 2005.

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

SANGUIN, H.; REMENANT, B.; DECHESNE, A.; THIOULOUSE, J.; VOGEL, T.M.; NESME, X.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; GRUNDMANN, G.L. Potential of a 16S rRNA-based taxonomic microarray for analyzing the rhizosphere effects of maize on *Agrobacterium* spp. and bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 72, p. 4302-4312, 2006.

SCHILLING, G.; GRANSEE, A.; DEUBEL, A.; LEŽOVIČ, G.; RUPPEL, S. Phosphorus availability, root exudates and microbial activity in the rhizosphere. **Zeitschrift Pflanzenernahrung Bodenkunde**, Stuttgart, v. 161, p. 465-478, 1998.

SHI, S.S.; RICHARDSON, A.E.; O'CALLAGHAN, M.; DEANGELIS, K.M.; JONES, E.E.; STEWART, A.; FIRESTONE, M.K.; CONDRON, L.M. Effects of selected root exudates components on soil bacterial communities. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 77, p. 600-610, 2011.

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

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

VON WIRÉN, N.; RÖMHELD, V.; MARSCHNER, H. Evaluation of strategy I mechanism in iron efficient maize cultivars. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 155/156, p. 445-448, 1993.

WARDLE, D.A.; WALKER, L.R.; BARDGETT, R.D. Ecosystem properties and forest decline in contrasting long-term chronosequences. **Science**, Washington, DC, v. 305, p. 509-513, 2004.

ZHANG, F.S. Mobilization of iron and manganese by plant-borne and synthetic metal chelators. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 155/156, p. 111-114, 1993.





#### 4 EFEITOS DO USO DA TERRA E SAZONALIDADE NAS COMUNIDADES DE BACTÉRIAS DESNITRIFICANTES EM TERRA PRETA DE ÍNDIO NA AMAZÔNIA CENTRAL BRASILEIRA

##### RESUMO

Mudança no uso da terra representa um dos maiores impactos nos ecossistemas terrestres causando um declínio ou perda da diversidade biológica. Outro principal causador de mudanças são os eventos de alterações climáticas. Esses efeitos são particularmente importantes em regiões úmidas por conta da acidez natural e baixa fertilidade da maior parte dos solos tropicais. Na região Amazônica, no entanto, a existência de pequenas manchas de Terra Preta de Índio (TPI) vem ganhando considerável atenção devido sua elevada fertilidade e resiliência ao manejo do solo. Um importante processo que influencia a fertilidade do solo é a desnitrificação. Este processo microbiológico é importante em solos e é conhecido por ser um significativo sumidouro e/ou fonte de emissões de óxido nítrico e óxido nitroso. Nesse contexto, foram estudadas as comunidades desnitrificantes (*nirK* e *nosZ*) em TPI e solo adjacente (Argissolo amarelo) em diferentes sistemas de uso da terra e sazonalidade. Para determinar a abundância relativa dos genes *nirK* e *nosZ*, utilizou-se a análise de PCR quantitativa, e para acessar a estrutura das comunidades, foi usada a técnica de Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP). A abundância relativa de *nirK* não foi afetada pelo uso da terra independente do tipo de solo, embora, a influência da sazonalidade foi observada em TPI. Alterações da estrutura das comunidades das bactérias desnitrificantes foram observadas para ambos os tipos de solos, sendo principalmente associados à mudanças no uso da terra e sazonalidade. As comunidades desnitrificantes na TPI foram mais afetadas pelo uso da terra do que pela sazonalidade, e em ACH foram mais influenciadas pelas variações da sazonalidade. Estes resultados sugerem que as comunidades desnitrificantes da TPI parecem ser mais resistentes ao estresse do que ACH. Este é um importante aspecto a ser mais bem estudado devido à preocupação sobre as mudanças climáticas futuras.

Palavras-chave: Terra Preta de Índio. Uso da terra. Sazonalidade. Desnitrificantes. qPCR. T-RFLP.

## EFFECTS OF LAND USE AND SEASONALITY ON DENITRIFYING COMMUNITIES OF AMAZONIAN DARK EARTH IN CENTRAL BRAZILIAN AMAZON

### ABSTRACT

Changes in land use represent one of the major impacts on terrestrial ecosystems causing decrease or loss of biological diversity. Another change driver is current events of climate change. These effects are particularly important in humid regions because of the natural acidity and low fertility of most of tropical soils. In the Amazon region, however, the existence of small patches of Amazonian Dark Earth (ADE) is gaining considerable attention because of their high fertility and resilience to soil management. An important process which influences soil fertility is denitrification. This microbiological process is important in soils and is known to be a significant sink and/or source of nitric oxide and nitrous oxide emissions. In this context, soil denitrifying communities (*nirK* and *nosZ*) in ADE and its adjacent soil (i.e. Haplic Acrisol) were examined to assess their response to land use and seasonality. To determine the relative abundance of *nirK* and *nosZ* genes, the quantitative PCR assay was used, and to assess the community structure, the Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) fingerprinting technique was used. The relative abundance of *nirK* was not affected by land use independent of soil type, although, an influence of seasonality was observed in ADE. Alterations in the community structure of denitrifying bacteria were observed for both soil types, mostly with associated changes in land use and seasonality. Denitrifying communities of ADE seemed to be more affected by land use than season, and ACH was more influenced by seasonal variations. These results suggest that ADE denitrifier communities may be more resistant to stress than ACH. This is an important aspect to be further studied due to the current concern on future climate change.

Key-words: Amazonian Dark Earth. Land use. Seasonality. Denitrifiers. qPCR. T-RFLP.

## 4.1 Introdução

Mudança no uso da terra representa um dos principais impactos nos ecossistemas terrestres, causando mudanças drásticas como o decréscimo ou perda de diversidade biológica (SCHULZE et al., 2004; MICHALSKI; PERES, 2007). Outro fator chave causador de impactos negativos na biodiversidade são os eventos de mudanças climáticas (MALHI et al., 2008). No entanto, poucos estudos têm destacado a importância de integrar esses causadores das mudanças climáticas em levantamentos de biodiversidade (BALMFORD; COWLING, 2006; BROOK, 2008; THUILLER et al., 2008). Além disso, mudanças no uso da terra foram indicadas como um dos principais causadores em afetar a biodiversidade global, seguido das mudanças climáticas, deposição de N, introdução de espécies exóticas e mudanças nas concentrações de CO<sub>2</sub> (SALA; CHAPIN; ARMESTO, 2000). Outra preocupação crescente é de como as conseqüentes mudanças causadas pelo aquecimento global e mudança de uso da terra irão afetar a emissão de gases traço como o CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O (LEVY; CANNELL; FRIEND, 2004; LILLY et al., 2009).

As emissões de N<sub>2</sub>O, em particular, é um potente gás do efeito estufa com um potencial de aquecimento global 300 vezes maior do que o CO<sub>2</sub> (FORSTER et al., 2007). A desnitrificação (nitrito e nitrito são reduzidos a formas gasosas de N pelos micro-organismos) constitui um importante processo do ciclo do N, o qual influencia a fertilidade do solo e água assim como a química da atmosfera (KNOWLES, 1982; ZUMFT, 1992). Os micro-organismos são os principais responsáveis pelas diferentes reações envolvidas no ciclo do N, e os processos microbiológicos de desnitrificação e nitrificação são as principais fontes de emissão de N<sub>2</sub>O provenientes de solos agrícolas; além disso, o processo de desnitrificação tem sido postulado como o processo dominante nas emissões de N<sub>2</sub>O (AULAKH; RENNIE, 1985; MATHIEU et al., 2006).

O processo de desnitrificação é impulsionado principalmente por bactérias anaeróbicas facultativas as quais utilizam compostos oxidáveis de N como receptores de elétrons alternativos para a produção de energia (ZUMFT, 1997). As bactérias desnitrificantes são comuns em ambientes do solo e pertencem a diversos gêneros de bactéria (BRAKER; TIEDJE, 2003). Desde 1998, muitos estudos têm apresentado os genes *nosZ* (codifica a enzima óxido nitroso redutase), *nirK* (codifica a enzima cobre contendo nitrito redutase) e *nirS* (codifica a enzima citocromo *cdI* contendo nitrito redutase) como marcadores

moleculares para acessar bactérias desnitrificantes a partir de técnicas independentes de cultivo, acessando assim sua diversidade em diversos ambientes (BRAKER; FESEFELDT; WITZEL, 1998; BRAKER et al., 2000; 2001; PRIEMÉ; BRAKER; TIEDJE, 2002; STRES et al., 2004). Muitas revisões têm relatado a necessidade em relacionar a estrutura, abundância e função de comunidades de bactérias desnitrificantes com as taxas de desnitrificação para melhor avaliar a influência dessas bactérias no processo do ciclo do N (PHILIPPOT; HALLIN, 2005; PHILIPPOT, 2006). Além disso, distúrbios como mudanças de uso da terra e climáticas são bem conhecidos por impactar a estrutura, abundância e composição de microorganismos do solo (JANGID et al., 2008; JESUS et al., 2009; CASTRO et al., 2010). Acessar esses efeitos nas comunidades microbianas de solos tropicais úmidos é de particular importância por conta de sua natural acidez e baixa fertilidade. Além disso, existe uma crescente preocupação de que a mudança climática continuará afetando a estrutura e composição vegetal, aumentando a frequência de eventos de seca aumentando consequentemente os riscos de incêndios florestais (COCHRANE; BARBER, 2009).

Na região Amazônica, a fertilidade do solo é um fator limitante para o desenvolvimento da agricultura sustentável. No entanto, a existência de manchas de Terra Preta de Índio (TPI) na região tem ganhado considerável atenção por serem solos altamente férteis, possuem elevada resiliência ao manejo do solo, e não se degradam rapidamente mesmo sob condições tropicais úmidas ou sob o uso de atividades agrícolas (LEHMANN et al., 2003; TEIXEIRA; MARTINS, 2003). Além disso, estudos recentes têm demonstrado que a estrutura e composição da TPI diferem-se de seus solos de origem (GROSSMAN et al. 2010; NAVARRETE et al., 2010), apresentando maior diversidade em suas comunidades (O'NEILL et al., 2009). Outra característica contrastante da TPI é a presença de elevadas quantidades de carvão, o qual se acredita ser um dos principais responsáveis em melhorar a produtividade agrícola (RONDON et al., 2007), além de promover estratégias de mitigação contra o aquecimento global através do sequestro de C (LEHMANN; GAUNT; RONDON, 2006) e na redução da emissão de  $N_2O$  em solos (SINGH et al., 2010). Portanto, um fator importante ainda a ser investigado nas TPIs é o papel de suas propriedades do solo em influenciar as comunidades microbianas envolvidas nos ciclos biogeoquímicos.

Nesse contexto, o principal objetivo desse estudo foi investigar a estrutura e abundância de comunidades de bactérias desnitrificantes (*nirK* e *nosZ*) em TPIs e solos adjacentes sob o efeito do uso da terra e mudanças de sazonalidade. Foram utilizadas as técnicas moleculares

de Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP) para acessar a estrutura das comunidades de bactérias desnitrificantes e PCR quantitativa (qPCR) para quantificar a abundância dos genes *nirK* e *nosZ*. As comunidades de bactérias desnitrificantes do solo têm sido exploradas com sucesso pela técnica de T-RFLP (ENWALL; HALLIN, 2009; BRAKER; SCHWARZ; CONRAD, 2010), e vários outros estudos têm utilizado a qPCR para quantificar a abundância de bactérias desnitrificantes em diferentes tipos de solos (HENRY et al., 2006; BAUDOIN et al., 2009).

## **4.2 Materiais e métodos**

### **4.2.1 Área de estudo, amostragem e propriedades químicas do solo**

A descrição detalhada das áreas de estudo e amostragem estão disponíveis na Seção Materiais e Métodos (página 31, capítulo 2). Brevemente, a área de estudo está localizada na Embrapa Amazônia Ocidental (Estação Experimental do Caldeirão, Iranduba, AM). Para acessar a influência do uso da terra e sazonalidade nas comunidades de bactérias desnitrificantes na Terra Preta de Índio (TPI) e seu solo adjacente (Argissolo amarelo, ACH), foi selecionado um sítio sob floresta secundária (FS) e outro sob plantio de mandioca (PM) para cada solo estudado. Em cada sítio, o ponto central de amostragem foi selecionado aleatoriamente e a partir desse ponto três pontos numa distância de 5 m foram selecionados para a coleta de amostras de solos não perturbadas. Em seguida as amostras foram mantidas em gelo seco até o seu transporte no laboratório e mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Amostras adicionais foram coletadas para as análises químicas do solo (secas ao ar) e medições da biomassa microbiana (mantidas a  $4^{\circ}\text{C}$ ).

### **4.2.2 Extração de DNA do solo**

A extração do DNA do solo foi realizada em triplicata utilizando o *kit MoBio PowerSoil DNA extraction* seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante (Mo Bio Laboratories, USA). O DNA extraído foi visualizado sob luz UV após corrida em gel de agarose 1% e coloração por brometo de etídeo. O DNA foi mantido até sua utilização a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A concentração do DNA foi determinada por espectrofotômetro *NanoDrop ND-100 spectrophotometer* (NanoDrop Technologies). A razão 260/280 nm calculada pelo espectrofotômetro *NanoDrop* foi utilizada para avaliar a pureza do DNA.

### 4.2.3 PCR quantitativa

O número de cópias dos genes *nirK* e *nosZ* foram acessadas por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando o kit *QuantiTect™ SYBR® Green PCR Master* em *iCycler iQ Detection System (Bio-Rad)*. Primeiramente, verificou-se a presença de inibidores no DNA do solo. Antes de iniciar os ensaios de qPCR, a presença de inibidores foi examinada pela diluição do DNA do solo e misturando-o com uma quantidade conhecida de DNA plasmidial. As condições da reação de qPCR para amplificação do gene *nirK* (primers nirK876/nirK1040) e gene *nosZ* (primers nosZ2F/nosZ2R) estão descritas na Tabela 3.1. As reações de qPCR foram realizadas em volume de 25 µL contendo 12,5 µL de *master mix*, 10 pmol de cada primer, e 10 ng de DNA do solo. As curvas padrão foram construídas utilizando 10 diluições em série (variando de  $10^2$  a  $10^7$  cópias) de DNA plasmidial contendo os genes *nirK* e *nosZ* provenientes de cepas de bactérias desnitrificantes conhecidas.

### 4.2.4 Análise da PCR quantitativa

As reações de qPCR foram realizadas em triplicatas. Inibidores não foram observados em nenhuma das amostras. Todos os resultados obtidos por qPCR foram analisados utilizando estatística descritiva. Diferenças na abundância das bactérias desnitrificantes foram verificadas a partir do teste de Tukey ao nível de significância de 5%. A correlação de Spearman foi também utilizada com o intuito de investigar possíveis correlações entre a abundância de bactérias desnitrificantes e as propriedades do solo. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA v10 (StatSoft Inc., Tulsa, USA).

### 4.2.5 T-RFLP

A estrutura das comunidades de bactérias desnitrificantes foi analisada pela técnica de T-RFLP. Os primers utilizados e as condições no termociclador estão descritas na Tabela 4.1. Para detecção dos amplicons utilizando a técnica de T-RFLP, o primer *forward* foi marcado com *6-carboxyfluorescein* (6-FAM) na extremidade 5'. As reações de PCR para cada amostra foram realizadas em triplicatas, em mix de reação contendo 5 ng de DNA genômico, 200 µM de dNTP (Roche Molecular Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 400 ng BSA µL<sup>-1</sup> (Roche Molecular Diagnostics), 10 pmol de cada primer e 1.25 U de REDAccuTaq LA DNA polymerase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) em 1X de tampão

providenciado pelo fabricante, e água ultrapura Milli-Q até o volume final de 25 µL. Em seguida, os produtos de PCR foram combinados e submetidos à corrida em gel de agarose 1%. A banda de interesse foi excisada e purificada com o kit *Wizard Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) e cortadas com as enzimas de restrição *HaeIII* e *HhaI* (New England Biolabs, Frankfurt, Germany) para os genes *nirK* e *nosZ*, respectivamente. Os produtos digeridos foram purificados utilizando o kit *Spin post-reaction purification columns* (Sigma-Aldrich). Os fragmentos terminais de restrição (T-RFs) foram separados em sequenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

#### 4.2.6 Análise de T-RFLP

Informações detalhadas sobre a análise de T-RFLP encontram-se na Seção Material e Métodos (página 35, capítulo 2). Brevemente, a análise de ordenação MDS foi utilizada para acessar os efeitos do uso da terra e sazonalidade nas bactérias desnitrificantes dos genes *nirK* e *nosZ*. A análise de dissimilaridade SIMPER foi usada para investigar a contribuição dos T-RFs nas diferenças encontradas entre as comunidades dos genes *nirK* e *nosZ* sob diferentes uso da terra e sazonalidade. Os efeitos do uso da terra e sazonalidade foram confirmados pela análise permutacional PERMANOVA, enquanto os efeitos das propriedades do solo foram acessados pela análise de coordenação de análises principais (CAP) realizadas separadamente para cada estação (chuvosa e seca) e genes desnitrificantes (*nirK* e *nosZ*). Os índices de riqueza, uniformidade e diversidade foram calculados utilizando os dados de fragmentos terminais de restrição (T-RFs). O índice de riqueza Margalef ( $d$ ) fornece uma medida de riqueza de espécies que é aproximadamente normalizado em relação ao tamanho da amostra (MARGALEF, 1958). O índice de uniformidade de Pielou ( $J'$ ) reflete a distribuição de grupos individuais entre os ribotipos (PIELOU, 1966). O índice de diversidade de Shannon considera o número de espécies presentes e sua importância relativa dentro do conjunto de amostras (MAGURRAN, 1988). As análises de estatística multivariada e os índices de diversidade e riqueza foram realizados nos programas PRIMER 6 e PERMANOVA *add-on* (CLARKE; GORLEY, 2006; ANDERSON; GORLEY; CLARKE, 2008).



Tabela 4.1 - Primers utilizados e condições no termociclador para amplificação dos genes *nirK* e *nosZ*

Primers	Sequência do primer (5'-3')	Gene alvo	Condições no termociclador	Referências
qPCR				
nirK876	ATYGGCGGVAYGGCGA	<i>nirK</i>	95°C, 15 min, 1 cycle; 95°C for 15s, 63°C for 30s (-1°C by cycle), 72°C for 30s, 6 cycles; 95°C for 15s, 58°C for 30s; 72°C for 30s, 40 cycles; 80°C for 15s, 1 cycle	Henry et al., 2004
nirK1040	GCCTCGATCAGRTRTRTGTT	<i>nirK</i>		Henry et al., 2004
nosZ2F	CGCRACGGCAASAAGGTSMSSGT	<i>nosZ</i>	95oC, 15s, 1 cycle; 94oC for 15s, 60oC for 30s, 72oC for 30s, 40 cycles; 75oC for 7s, 1 cycle	Henry et al., 2006
nosZ2R	CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA	<i>nosZ</i>		Henry et al., 2006
T-RFLP				
nirK1F	GGMATGGTKCCSTGGCA	<i>nirK</i>	94oC, 5 min, 1 cycle; 94oC for 30s, 57oC for 40s (-0.5oC by cycle), 72oC for 45s, 10 cycles; 94oC for 30s, 55oC for 40s, 72oC for 45s, 30 cycles; 72oC for 7 min, 1 cycle	Braker et al., 1998
nirK5R*	GCCTCGATCAGRTRTRTGTT	<i>nirK</i>		Braker et al., 1998
nosZ1188*	CGYTGTTCMTCGACAGCCAG	<i>nosZ</i>	94oC, 5 min, 1 cycle; 95oC for 1 min, 57oC for 1 min (-0.5oC by cycle), 72oC for 1 min, 10 cycles; 94oC for 1 min, 56oC for 1 min, 72oC for 1 min, 25 cycles; 72oC for 10 min, 1 cycle	Kloos et al., 2001
nosZ1869	CATGTGCAGNGCRTGGCAGAA	<i>nosZ</i>		Kloos et al., 2001

\* Primer marcado com FAM

## 4.3 Resultados

### 4.3.1 Abundância dos genes *nirK* e *nosZ*

A abundância dos genes de bactérias desnitrificantes (*nirK* and *nosZ*) foi determinada para cada área (TPI e ACH) sob diferentes usos da terra (FS, floresta secundária; PM, plantio de mandioca) e sazonalidade (chuva e seca). A eficiência da qPCR para o gene *nirK* foi de 93% com o valor de  $R^2$  de 0,996, e para *nosZ* foi de 100% com o valor de  $R^2$  de 0,983. Um pico foi observado nas curvas de *melting* para ambos os genes *nirK* e *nosZ*.

A abundância do gene *nirK* variou de  $1,8 \times 10^4$  a  $5,9 \times 10^4$  cópias  $g^{-1}$  solo seco durante a estação chuvosa e de  $2,6 \times 10^5$  a  $8,1 \times 10^5$  cópias  $g^{-1}$  solo seco durante a estação seca (Figura 4.1). A abundância média do gene *nirK* diferiu em PM durante a estação chuvosa para ambos os solos estudados. Durante a estação seca, o gene *nirK* apresentou maior abundância sob FS tanto em TPI quanto em ACH. No entanto, essas observações não apresentaram diferenças significativas independente do solo e do uso da terra. O segundo propósito em quantificar a abundância do gene *nirK* foi o de estimar diferenças devido às mudanças sazonais. Nesse caso, foi possível observar a influência da sazonalidade na abundância do gene *nirK* em FS na TPI e ACH, o qual mostrou um aumento significativo no número de cópias do gene *nirK* durante a estação seca.

Para o gene *nosZ*, a abundância variou de  $4,1 \times 10^6$  a  $1,2 \times 10^7$  de cópias  $g^{-1}$  de solo seco durante a estação chuvosa e na estação seca de  $3,4 \times 10^6$  a  $9,6 \times 10^6$  de cópias  $g^{-1}$  de solo seco (Figura 4.1). TPI-FS apresentou maior número de cópias do gene *nosZ* quando comparado aos outros sítios durante a estação chuvosa. Durante a estação seca, o número de cópias do gene *nosZ* foi menor na TPI sob PM e maior nos outros sítios. Além disso, foi observado menor número de cópias do gene *nosZ* em ACH tanto sob FS quanto PM durante a estação seca. No entanto, as variações observadas na abundância do gene *nosZ* não apresentaram diferenças significativas independente do tipo de solo, uso da terra e sazonalidade.

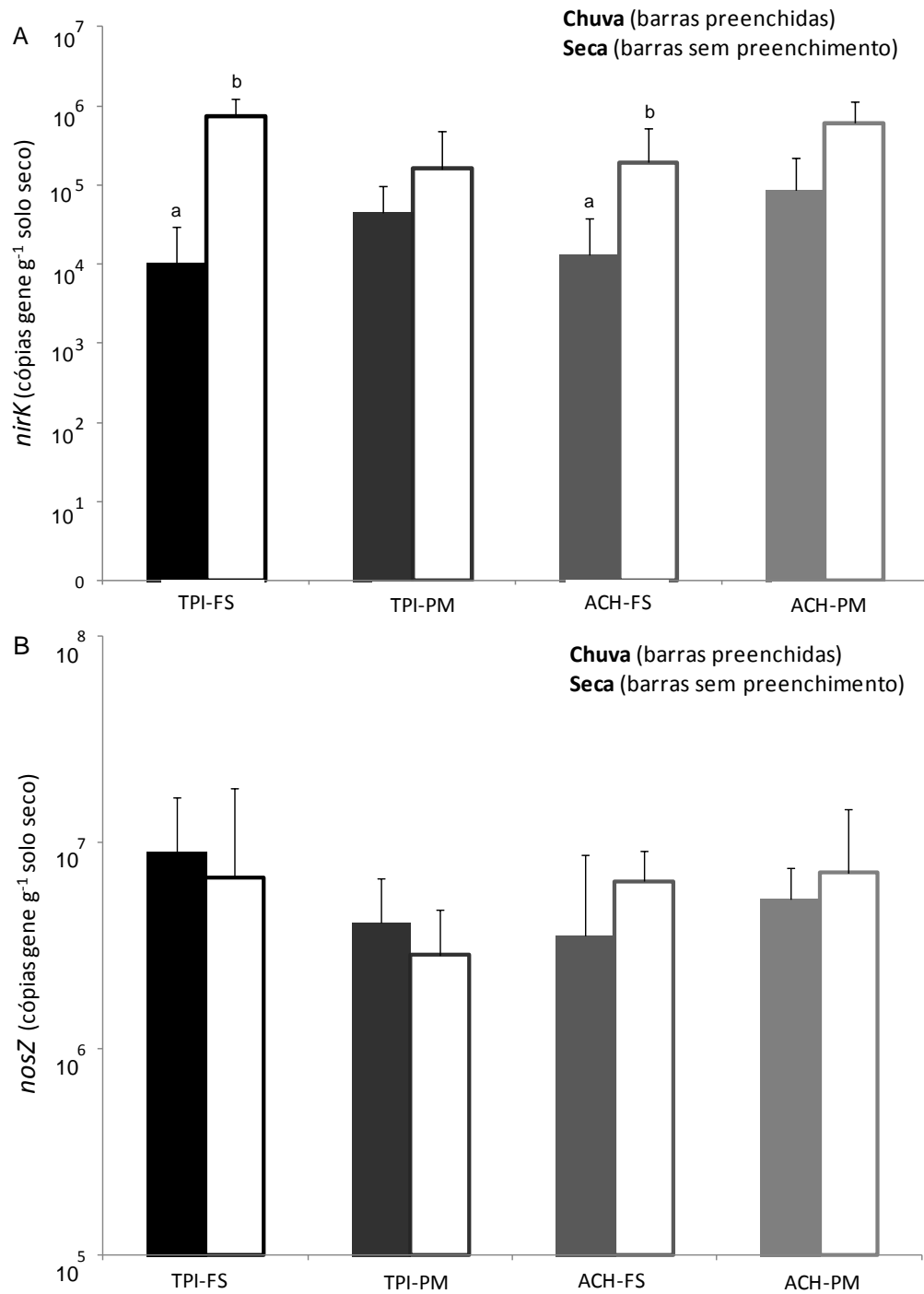


Figura 4.1 - Quantificação dos genes *nirK* (A) e *nosZ* (B) utilizando a técnica de qPCR. Barras de erro representam o desvio-padrão (n=6). Barras contendo as mesmas letras não diferem entre si pelo teste deTukey ( $P < 0,05$ )

### 4.3.2 Análise de T-RFLP dos genes *nirK* e *nosZ*

A análise de T-RFLP foi utilizada para acessar a estrutura das comunidades desnitrificantes sob diferentes uso da terra e sazonalidade. A análise de ordenação MDS, a partir dos dados de T-RFLP, revelou agrupamentos distintos na estrutura das comunidades dos genes *nirK* e *nosZ* em TPI e ACH (Figura 4.2). A ordenação MDS também mostrou clara separação devido ao uso da terra e sazonalidade para todos os solos estudados. A estrutura da comunidade de *nirK* na TPI foi separada em claros agrupamentos de acordo com o uso da terra e sazonalidade, assim como em ACH. Além disso, o efeito do uso da terra pareceu ser maior durante a estação seca. Para o gene *nosZ*, a estrutura da comunidade em ACH pareceu ser mais influenciada pela sazonalidade quando comparada a TPI. Ao contrário, a estrutura da comunidade de *nosZ* na TPI pareceu ter sido mais influenciada pelo uso da terra, especialmente durante a estação seca. A análise de PERMANOVA entre os diferentes sítios estudados confirmou que o solo ( $P=0,001$ ), uso da terra ( $P=0,001$ ) e sazonalidade ( $P=0,001$ ) tiveram significativas efeitos na estrutura das comunidades dos genes *nirK* e *nosZ*.

As diferenças observadas entre as estruturas das comunidades dos genes *nirK* e *nosZ* também foram acessadas pela análise de dissimilaridade SIMPER (Tabela 4.2), o qual revelou níveis de dissimilaridade entre 65,24% a 41,82% para o gene *nirK* e de 75,54% a 37,85% para o gene *nosZ*. A quantidade de T-RFs responsáveis em discriminar as mudanças causadas pelo uso da terra e sazonalidade (chuva - C, seca - S), para ambos os solos, foi aproximadamente seis para o gene *nirK* e oito para o gene *nosZ*. Alguns dados de dissimilaridade entre os perfis de T-RFLP foram relativamente altos (>50-65%) mostrando um forte efeito do uso da terra na TPI durante a estação seca assim como em ACH durante a estação chuvosa. Para as comunidades do gene *nosZ*, a dissimilaridade em ACH durante as duas estações foi também relativamente alta (>50-76%) (ACH-PM-C vs. ACH-PM-S) indicando um efeito da sazonalidade em ACH.

A média do número de T-RFs, o índice de riqueza de Margalef ( $d$ ), o índice de uniformidade de Pielou ( $J'$ ) e o índice de diversidade de Shannon ( $H'$ ) para todos os sítios estudados e sazonalidade para os genes *nirK* e *nosZ* estão apresentados na Tabela 4.3. A estrutura das comunidades desnitrificantes mostraram variados números de T-RFs para os genes *nirK* e *nosZ* dependendo do tipo de solo, uso da terra e sazonalidade. Amostras de TPI apresentaram diferenças significativas na riqueza dos genes *nirK* e *nosZ*. Além disso, a

sazonalidade também pareceu afetar a riqueza das bactérias desnitrificantes. Durante ambas as estações, houve uma diminuição da riqueza de T-RFs nas comunidades do gene *nirK* da FS quando comparado com PM. Este mesmo padrão foi observado para ACH somente durante a estação seca. Na estação chuvosa, a riqueza do gene *nosZ* na TPI diminuiu de FS para PM, no entanto, durante a estação seca houve um aumento da riqueza do gene *nosZ* da FS quando comparado com PM. Os sítios ACH não apresentaram diferenças na riqueza do gene *nosZ* independente do uso da terra e sazonalidade. A uniformidade das espécies, apresentada pelo índice de Pielou, foi maior nas comunidades do gene *nirK* na TPI-FS durante a estação seca. No entanto, a uniformidade das espécies não apresentou variação durante a estação chuvosa para o gene *nirK*, enquanto para o gene *nosZ* foram observadas um maior valor no índice de Pielou na TPI-PM durante as duas estações. A diversidade das comunidades do gene *nirK*, representada pelo índice de Shannon, não mostrou diferenças durante a estação chuvosa. Uma maior diversidade foi observada na TPI-FS durante a estação seca, juntamente com menores valores observados em ACH-PM. Nenhuma diferença foi observada na diversidade do gene *nirK* em TPI-PM e ACH-FS. Para o gene *nosZ*, houve um aumento na diversidade de TPI-PM durante ambas as estações. Os sítios ACH não apresentaram diferenças na diversidade do gene *nosZ* independente do uso da terra e sazonalidade.

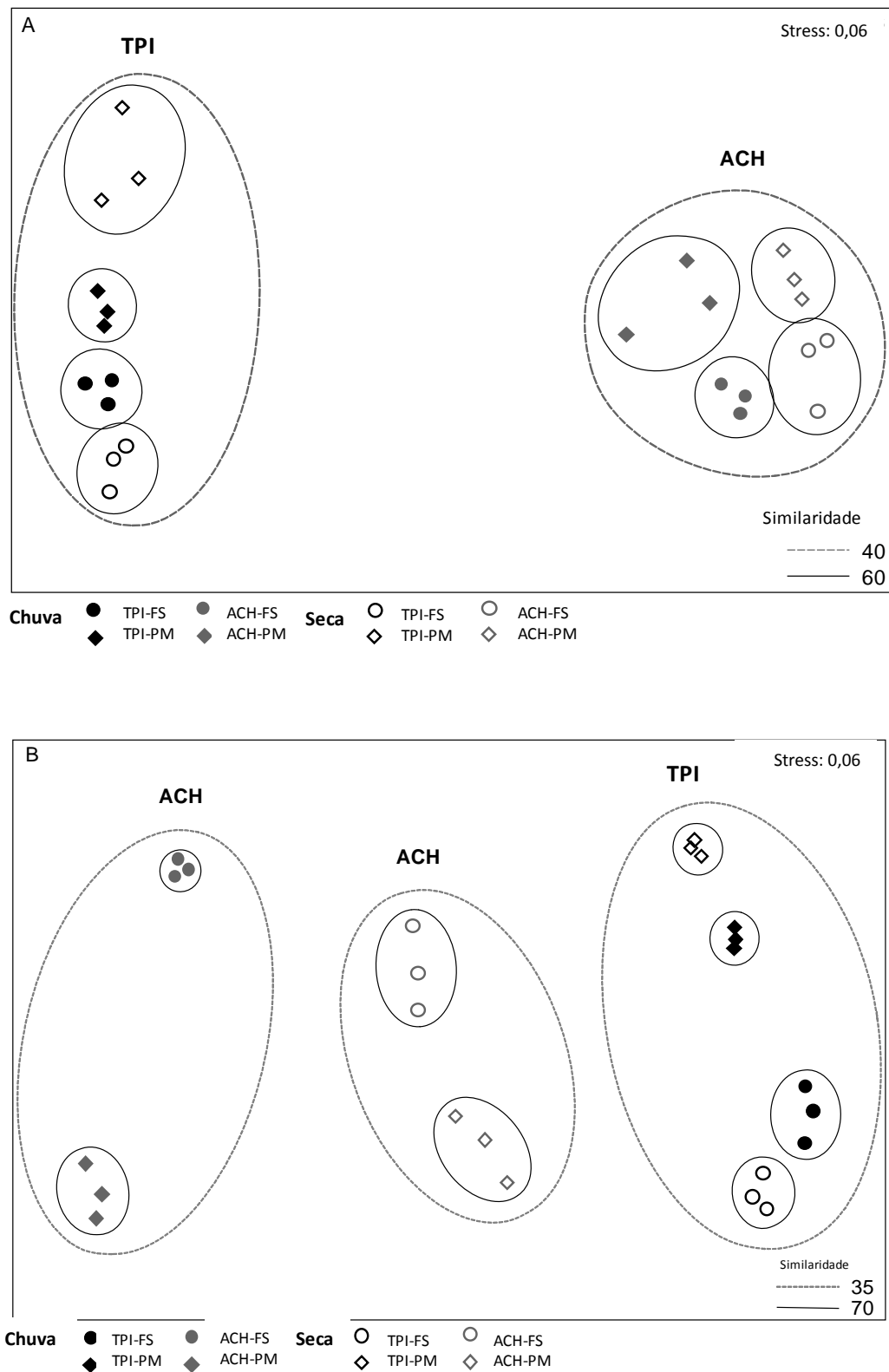


Figura 4.2 - Análise de ordenação de escala multidimensional (MDS) baseada no coeficiente de similaridade de Bray Curtis (transformação via raiz quadrada) dos dados de T-RFLP das comunidades dos genes *nirK* (A) e *nosZ* (B) na Terra Preta de Índio (TPI) e solo adjacente (Argissolo amarelo, ACH) sob floresta secundária (FS) e plantio de mandioca (PM) durante as estações chuvosa e seca

Tabela 4.2 - Análise de porcentagem de similaridade (SIMPER) baseada nos dados de T-RFLP dos genes *nirK* e *nosZ* em Terra Preta de Índio (TPI) e solo adjacente (Argissolo amareco, ACH) sob floresta secundária (FS) e plantio de mandioca (PM) durante as estações chuvosa (C) e seca (S), e número de T-RFs presentes/ausentes/comuns

Grupos	% Dissimilaridade	Número de T-RFs		
		presentes	ausentes	comuns
<i>nirK</i>				
TPI-FS-S vs. TPI-PM-S	65,24	10	5	6
ACH-FS-C vs. ACH-PM-C	51,53	3	6	5
ACH-PM-C vs. ACH-PM-S	48,04	7	2	4
ACH-FS-C vs. ACH-FS-S	48,04	5	7	5
TPI-FS-C vs. TPI-PM-C	47,74	8	2	6
TPI-PM-C vs. TPI-PM-S	47,66	5	6	4
TPI-FS-C vs. TPI-FS-S	42,02	7	8	8
ACH-FS-S vs. ACH-PM-S	41,82	7	0	6
<i>nosZ</i>				
ACH-PM-C vs. ACH-PM-S	75,54	8	8	3
TPI-FS-S vs. TPI-PM-S	64,12	9	11	5
ACH-FS-C vs. ACH-PM-C	61,41	6	8	4
ACH-FS-C vs. ACH-FS-S	51,88	6	6	5
ACH-FS-S vs. ACH-PM-S	47,89	6	7	7
TPI-FS-C vs. TPI-PM-C	45,18	9	9	11
TPI-PM-C vs. TPI-PM-S	43,94	8	5	9
TPI-FS-C vs. TPI-FS-S	37,85	7	7	11

Tabela 4.3 - Número total de T-RFs, índices de riqueza ( $d$ ), uniformidade ( $J'$ ) e diversidade ( $H'$ ) dos genes *nirK* e *nosZ* em Terra Preta de Índio (TPI) e solo adjacente (Argissolo amarelo, ACH) durante as estações chuvosa e seca

Áreas e sazonalidade	Número total de T-RFs	$d$	$J'$	$H'$
<b>Chuva - <i>nirK</i></b>				
TPI-FS	16	4,3±0,3a	0,89±0,02	2,46±0,14
TPI-PM	10	2,8±0,5b	0,89±0,01	2,03±0,18
ACH-FS	11	3,3±0,8ab	0,80±0,05	1,94±0,34
ACH-PM	11	3,3±0,8ab	0,83±0,04	2,02±0,14
<b>Seca - <i>nirK</i></b>				
TPI-FS	16	4,3±0,3a	0,92±0,01a	2,56±0,05a
TPI-PM	10	2,9±0,2b	0,89±0,03b	2,07±0,06b
ACH-FS	13	3,8±0,6ab	0,84±0,04b	2,18±0,25b
ACH-PM	5	1,5±0,2c	0,85±0,02b	1,41±0,06c
<b>Chuva- <i>nosZ</i></b>				
TPI-FS	23	4,7±0,3a	0,66±0,01	2,07±0,06a
TPI-PM	26	5,5±0,3b	0,76±0,01	2,49±0,04b
ACH-FS	15	3,0±0,1c	0,65±0,03	1,75±0,06c
ACH-PM	15	3,1±0,3c	0,73±0,05	1,98±0,18ac
<b>Seca - <i>nosZ</i></b>				
TPI-FS	16	3,3±0,1a	0,70±0,00a	1,96±0,03a
TPI-PM	20	4,2±0,3b	0,85±0,02b	2,55±0,03b
ACH-FS	17	3,4±0,3a	0,68±0,06a	1,90±0,23a
ACH-PM	16	3,2±0,3a	0,68±0,02a	1,88±0,05a

### 4.3.3 Correlação entre as propriedades do solo e as comunidades desnitrificantes

Diferenças significativas foram observadas na abundância do gene *nirK* somente nos sítios TPI-FS e ACH-FS devido à sazonalidade. Portanto, foi verificada a possível correlação entre a abundância do gene *nirK* e as propriedades químicas do solo para acessar quais propriedades podem explicar as diferenças observadas devido à sazonalidade. A correlação de Spearman foi utilizada para acessar essas possíveis correlações (Tabela 4.4). Para TPI-FS, a abundância do gene *nirK* se correlacionou negativamente com P, Ca, Mg, CTC e CBM indicando que a diminuição na quantidade dessas propriedades do solo podem ter influenciado no aumento do número de cópias do gene *nirK* durante a estação seca. A



abundância do gene *nirK* para ACH-FS se correlacionou negativamente com C-solo, MO, P, Mg, Al, CTC e CBM. Novamente, a diminuição na quantidade dessas propriedades do solo pode ter proporcionado o aumento no número de cópias do gene *nirK*. Além disso, a abundância do gene *nirK* em ACH-FS apresentou correlação positiva com NBM.

Tabela 4.4 - Correlação de Spearman entre a abundância do gene *nirK*, quantificada por qPCR, e propriedades do solo

<i>nirK</i> abundância	C-solo	MO	P	Ca	Mg	Al	CTC	CBM	NBM
TPI-FS			-0,602*	-0,777**	-0,664*		-0,777**	-0,834***	
ACH-FS	-0,792**	-0,792**	0,674*		-0,721**	-0,622*	-0,792**	-0,580*	0,848***

<sup>a</sup> \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$

<sup>b</sup> CTC, capacidade de troca de cátions; CBM, carbono da biomassa microbiana; NBM, nitrogênio da biomassa microbiana

O procedimento BIO-ENV que inclui a correlação de Spearman foi utilizado para identificar quais propriedades do solo melhor explicam as variações observadas na estrutura das comunidades dos genes *nirK* e *nosZ* de acordo com o uso da terra. Portanto, a análise de BIO-ENV foi realizada separadamente para cada gene e sazonalidade. A estrutura da comunidade do gene *nirK*, durante a estação chuvosa, se correlacionou fortemente com Al, pH e NBM ( $Rho = 0,896$ ,  $P = 0,001$ ). Por outro lado, na estação seca, a estrutura da comunidade do gene *nirK* apresentou forte correlação com Al, Ca e NBM ( $Rho = 0,883$ ,  $P = 0,001$ ). Para o gene *nosZ*, a estrutura das comunidades se correlacionaram com Al, CTC, CBM, NBM e P durante a estação chuvosa ( $Rho = 0,896$ ,  $P = 0,001$ ). Durante a estação seca, a estrutura da comunidade do gene *nosZ* se correlacionou com o pH e P ( $Rho = 0,741$ ,  $P = 0,001$ ).

A análise CAP foi utilizada para ilustrar a relação entre as estruturas das comunidades dos genes *nirK* e *nosZ* com as propriedades do solo previamente selecionadas pela análise de BIO-ENV. A análise CAP apresenta os vetores indicando a correlação (Spearman) entre a estrutura da comunidade do gene *nirK* e as propriedades do solo (Figura 4.3). Na estação chuvosa, *nirK* se correlacionou positivamente com o pH e NBM, e negativamente com o Al. Novamente, durante a estação seca, o Al se correlacionou negativamente com a estrutura da comunidade do gene *nirK*, enquanto que o NBM se correlacionou positivamente. Além disso, a estrutura da comunidade do gene *nirK* também se correlacionou positivamente com o Ca.

Para o gene *nosZ*, a estrutura da comunidade se correlacionou positivamente com Al, CTC, CBM e P, mas negativamente com NBM durante a estação chuvosa (Figura 4.3). Durante a estação seca, a estrutura da comunidade do gene *nosZ* se correlacionou positivamente com o pH e P.

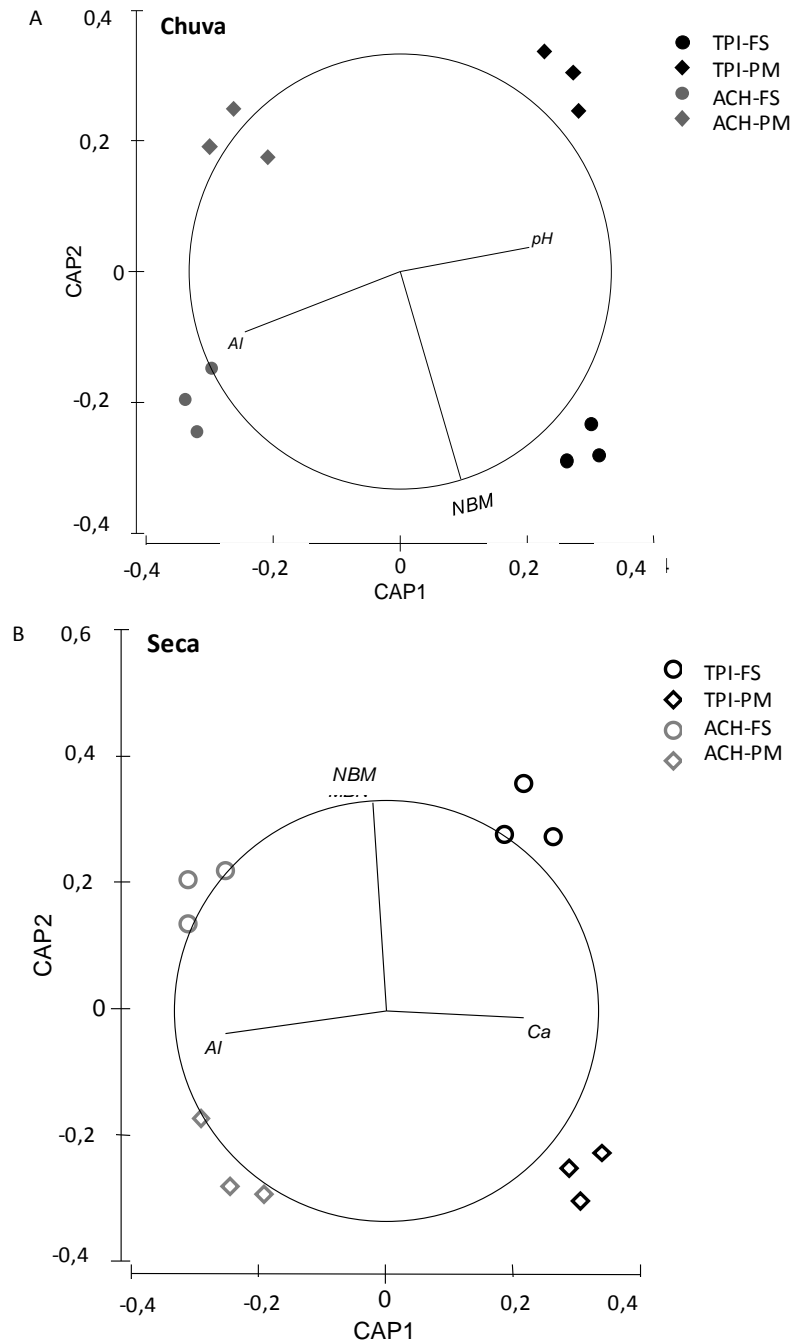


Figura 4.3 - Análise canônica de coordenadas principais (CAP) de dados de T-RFLP da comunidade do gene *nirK* na Terra Preta de Índio (TPI) e solo adjacente (Argissolo amarelo, ACH) sob floresta secundária (SF) e plantio de mandioca (PM) durante as estações chuvosa e seca. Vetores representam correlação entre propriedades do solo

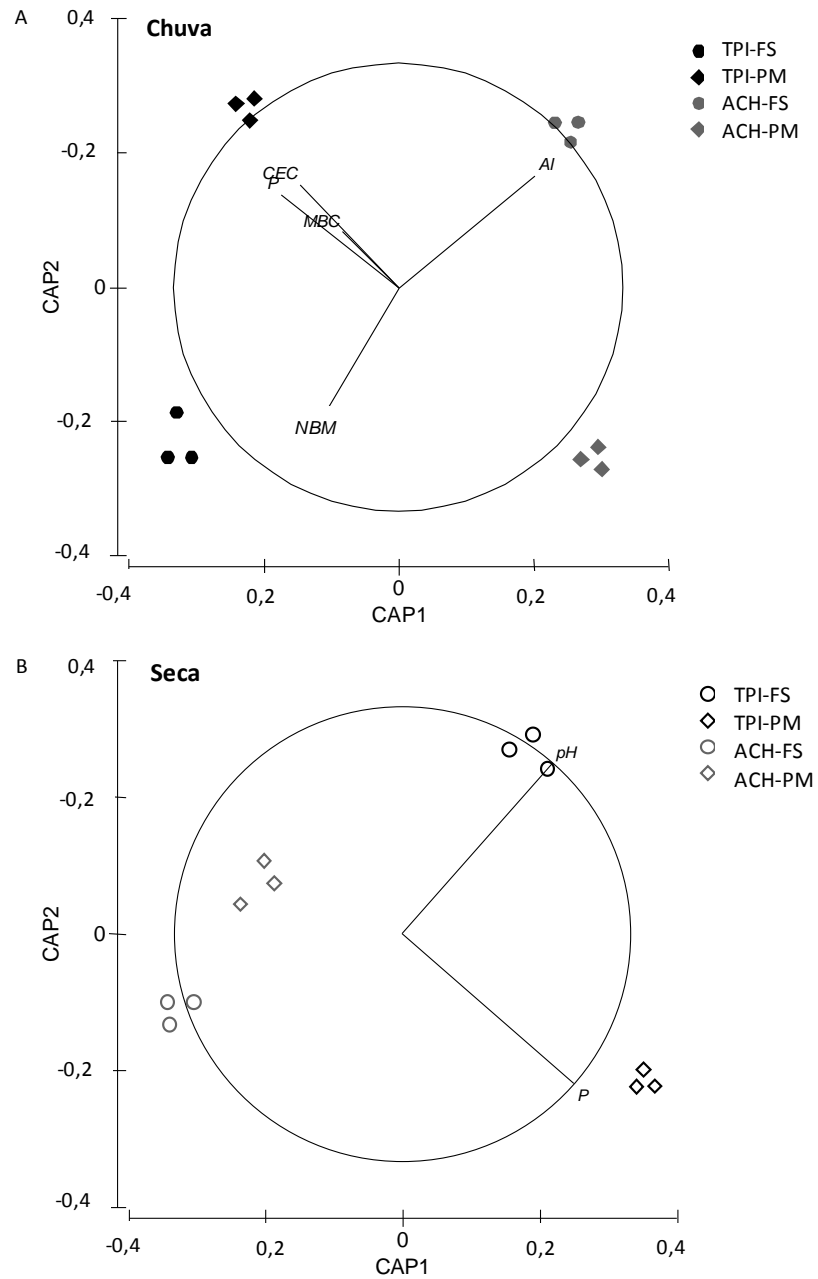


Figura 4.4 - Análise canônica de coordenadas principais (CAP) de dados de T-RFLP da comunidade do gene *nosZ* na Terra Preta de Índio (TPI) e solo adjacente (Argissolo amarelo, ACH) sob floresta secundária (SF) e plantio de mandioca (PM) durante as estações chuvosa e seca. Vetores representam correlação entre propriedades do solo

## 4.4 Discussão

### 4.4.1 Abundância das bactérias desnitrificantes

A abundância de bactérias desnitrificantes foi estimada por qPCR visando quantificar os genes *nirK* e *nosZ*. A abundância dos genes *nirK* e *nosZ* estão em concordância com o número de cópias já observados para esses genes por HENRY et al. (2006). Apesar das diferenças consideráveis nas propriedades do solo em TPI e ACH, poucas diferenças foram observadas na abundância dos genes *nirK* e *nosZ*. Outros estudos também mostraram nenhuma correlação entre a abundância dos genes *nirK* e *nosZ* e as propriedades do solo (PHILIPPOT et al., 2009; DANDIE et al., 2011). Apesar desse estudo apresentar pela primeira vez dados sobre a abundância de comunidades desnitrificantes em solos da Amazônia, os resultados encontrados mostraram que a abundância desses genes não apresentam mudanças independentes do uso da terra ou das propriedades do solo. Estes resultados corroboram com outros estudos que também não encontraram diferenças na abundância das comunidades desnitrificantes entre solos agrícolas e zonas ripárias (DANDIE et al., 2011), e que a abundância do gene *nosZ* não foi afetada pelo cultivo em solos de áreas úmidas (MA et al., 2008). No entanto, a abundância do gene *nirK* sofreu variações devido a sazonalidade (Figura 4.1). Apesar dessas diferenças terem sido observadas apenas em FS para ambos os solos, outros estudos também observaram mudanças na abundância do gene *nirK* devido à variações sazonais (DANDIE et al., 2008; YOSHIDA et al., 2009). Dandie et al. (2008) encontraram maior número de cópias do gene *nirK* no início da primavera do que no final do outono, e Yoshida et al. (2009) observaram uma diminuição no número de cópias do gene *nirK* após alagamento do solo. De fato, este estudo mostrou uma significativa diminuição na abundância do gene *nirK* durante a estação chuvosa. Este resultado sugere que a umidade do solo tem um importante papel na abundância do gene *nirK* e conseqüentemente poder ter um efeito nos processos do ciclo do nitrogênio.

#### 4.4.2 Efeitos do uso da terra e sazonalidade na estrutura das comunidades de bactérias desnitrificantes

Foram identificadas diferenças significativas na estrutura das comunidades de bactérias desnitrificantes quando associadas ao uso da terra para ambos os solos estudados (Figura 4.2). Diversos estudos mostraram um significativo impacto na estrutura de comunidades desnitrificantes devido ao uso da terra, como por exemplo, na estrutura da comunidade do gene *nosZ* entre áreas de agricultura e zonas de vegetação ripária nativa (RICH; MYROLD, 2004). De forma similar, a estrutura da comunidade do gene *nirK* diferiu significativamente entre áreas de agricultura e zonas ripárias (DANDIE et al., 2011). Variações sazonais também parecem ter um papel importante em moldar a estrutura das comunidades desnitrificantes em TPI e ACH (Figura 4.2). Em ACH, as estruturas das comunidades dos genes *nirK* e *nosZ* pareceram ser mais influenciadas pela sazonalidade quando comparadas com a TPI (Tabela 4.2). A influência de flutuações sazonais nas comunidades de bactérias desnitrificantes também foi observada em outros estudos (WOLSING; PRIEMÉ, 2004; BREMER et al., 2007; PASTORELLI et al., 2011). Estes resultados indicam que a estrutura das comunidades desnitrificantes em TPI possam ser mais resistentes a eventos de estresse, como variações na temperatura e umidade do solo.

Outro resultado interessante é o da presença da cobertura florestal que pode ter contribuído em prevenir o decréscimo na riqueza e diversidade do gene *nirK* quando influenciado por uma menor umidade do solo e elevadas temperaturas, como ocorre durante a estação seca (Tabela 4.3). Agosto de 2009, na Amazônia Central, apresentou média mensal menor de precipitação quando comparadas as médias anteriores nessa região (Seção Materiais e Métodos, página 29, capítulo 2). TPI-PM apresentou valores de riqueza e diversidade similares a ACH-FS, sugerindo uma tolerância da comunidade do gene *nirK* na TPI ao estresse (e.g. baixa umidade do solo e elevada temperatura). Nesse caso, a presença de grandes quantidades de carvão na TPI pode estar protegendo essas comunidades contra eventos de estresse ambiental. Em uma revisão sobre as propriedades biológicas do carvão, foi proposto que a presença e o tamanho dos poros do carvão podem servir como habitat para os micro-organismos do solo protegendo-os da predação e dessecação (THIES; RILLIG, 2009). Além disso, a riqueza e diversidade do gene *nosZ* foi maior na TPI-PM (Tabela 4.3).

Este resultado parece estar relacionado ao manejo do solo, indicando que sistemas agrícolas suportam uma maior diversidade de comunidades do gene *nosZ* (STRES et al., 2004). No entanto, o mesmo padrão não foi observado para ACH-PM sugerindo que apenas as atividades agrícolas não podem explicar a maior riqueza e diversidade observadas nas comunidades do gene *nosZ*. O oposto foi encontrado para a comunidade do gene *nirK*, o qual apresentou uma menor riqueza e diversidade em ACH-PM, especialmente durante a estação seca. O pH do solo é conhecido por ser uma propriedade do solo com poder seletivo nas comunidades desnitrificantes, fator este que pode ter contribuído para a menor riqueza do gene *nirK* observada em ACH (solo com pH ácido) (PRIEMÉ; BRAKER; TIEDJE, 2002).

#### **4.4.3 Relação entre a abundância e estrutura de bactérias desnitrificantes com as propriedades do solo**

Neste estudo, não foi observada correlação significativa entre a abundância dos genes *nirK* e *nosZ* com as propriedades do solo. De forma similar, correlações entre a abundância dos genes *nirK* e *nosZ* com as variáveis ambientais não foram observadas em pastagens (PHILIPPOT et al., 2009), e em zonas ripárias (DANDIE et al., 2011). A única exceção foi a diferença na abundância do gene *nirK*, o qual apresentou menor abundância em FS durante a estação seca tanto para TPI quanto para ACH (Figura 4.1). Os conteúdos de C-solo e MO apresentaram menores valores em ACH-FS durante a estação seca (Tabela 2.1, página 38, capítulo 2) e apresentaram correlação negativa com a abundância do gene *nirK* em ACH-FS *nirK* (Tabela 4.4). Além disso, os menores valores observados no conteúdo de P, Mg, Al e CTC durante a estação seca pareceu ter influenciado a abundância do gene *nirK*. Houve também correlação positiva entre a abundância do gene *nirK* com o NBM em ACH-FS, a qual pode estar relacionada com a elevada quantidade de NBM observada durante a estação seca (Tabela 2.1, página 38, capítulo 2).

A estrutura da comunidade do gene *nirK* mostrou correlação com o pH do solo durante a estação chuvosa (Figura 4.3), corroborando com resultados similares obtido por DANDIE et al. (2011). O pH do solo é geralmente considerado como a principal propriedade do solo em influenciar a estrutura de comunidades microbianas do solo e acredita-se que esta propriedade pode explicar uma grande proporção das diferenças observadas nas estruturas das comunidades microbianas (LAUBER et al., 2009). No entanto, outras propriedades do solo também podem estar envolvidas em explicar mudanças nas estruturas das comunidades do

gene *nirK* como, por exemplo, o teor de Al que pode ser o responsável em moldar a estrutura das comunidades do gene *nirK* em ACH. A toxicidade é geralmente uma das maiores preocupações para a produção agrícola em solos ácidos tropicais (HAUG; VITORELLO, 1997) e é susceptível de influenciar a estrutura de micro-organismos em solos da Amazônia (JESUS et al., 2009). Outros estudos têm mostrado que a toxicidade de Al não é somente uma preocupação para a produção agrícola, mas também para bactérias e fungos que habitam esses solos (GUIDA et al., 1991; ZEL et al., 1993). A análise de CAP confirmou a correlação entre a estrutura das comunidades desnitrificantes e o NBM, com exceção do gene *nosZ* durante a estação seca. Outro estudo também observou correlação entre a comunidade microbiana e o CBM e NBM em pastagens da América do Sul, sugerindo que as mudanças observadas nos genes funcionais foram associadas às alterações nos estoques de C e N (BERTHRONG et al., 2009). O teor de P também pareceu ser um fator importante em moldar a estrutura das comunidades do gene *nosZ* (Figura 4.4). Bárta et al. (2010) observaram que as comunidades do gene *nirK* foram fortemente dependentes à disponibilidade de P. De fato, o conteúdo de P na TPI contrasta com os valores observados em ACH (Tabela 2.1, página 38, capítulo 2) e alguns pesquisadores acreditam que a principal fonte de P nas TPIs são provenientes de apatita biogênica (e.g. espinha de peixe, ossos de mamíferos e carapaças de tartarugas) e de ossos humanos (rituais funerários) (LIMA et al., 2002; SCHAEFER et al., 2004).

#### 4.5 Conclusões

Apesar das comunidades de bactérias desnitrificantes terem sido estudadas em diversos tipos de solos, este é o primeiro estudo em acessar essas comunidades em solos da Amazônia. Os resultados deste estudo mostraram a influência da sazonalidade nas abundâncias das comunidades do gene *nirK* em ambos os solos estudados (TPI e ACH) sob floresta secundária. Além disso, as mudanças ocorridas nas propriedades do solo devido às variações na sazonalidade parecem ter influenciado a abundância do gene *nirK*. Curiosamente, as diferenças nas propriedades dos solos entre TPI e ACH e o uso da terra não afetaram a abundância da comunidade do gene *nirK*. No entanto, alterações nas estruturas das comunidades dos genes *nirK* e *nosZ* foram observadas em TPI e ACH em associação com o uso da terra e sazonalidade. Este estudo demonstrou claramente que as estruturas das comunidades desnitrificantes responderam tanto a mudanças de uso da terra como na sazonalidade. TPI pareceu ser mais afetada pelo uso da terra do que pela sazonalidade, e ACH foi mais influenciado pelas variações da sazonalidade. Estes resultados sugerem que as

comunidades desnitrificantes na TPI podem ser mais resistentes ao estresse de mudanças na temperatura e umidade do solo do que ACH. Esta é uma característica importante para futuramente ser melhor investigada na TPI devido a preocupação atual com os futuros impactos das mudanças climáticas na biodiversidade dos ecossistemas.

## Referências

ANDERSON, M.J.; GORLEY, R.N.; CLARKE, K.R. **PERMANOVA + for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods**. Plymouth, UK: PRIMER-E, 2008.

AULAKH, M.S.; RENNIE, D.A. Gaseous nitrogen losses from conventional and chemical summerfallow. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 65, p. 195-203, 1985.

BALMFORD, A., COWLING, R.M. Fusion or failure? The future of conservation biology. **Conservation Biology**, Cambridge, v. 20, p. 692-695, 2006.

BÁRTA, J., APPLOVÁ, M., VANĚK, D., KRIŠTŮFKOVÁ, M., ŠANTRŮČKOVÁ, H. Effect of available P and phenolics on mineral N release in acidified spruce forest: connection with lignin-degrading enzymes and bacterial and fungal communities. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 97, p. 71-87, 2010.

BAUDOIN, E., PHILIPPOT, L., CHÈNEBY, D., CHAPUIS-LARDY, L., FROMIN, N., BRU, D., RABARY, B., BRAUMAN, A. Direct seeding mulch-based cropping increases both the activity and the abundance of denitrifier communities in a tropical soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 1703-1709, 2009.

BERTHRONG, S.T., SCHADT, C.W., PIÑEIRO, G., JACKSON, R.B. Afforestation alters the composition of functional genes in soil and biogeochemical processes in South American grasslands. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 75, p. 6240-6248, 2009.

BRAKER, G., FESEFELDT, A., WITZEL, K-P. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, p. 3769-3775, 1998.

BRAKER, G., ZHOU, J., WU, L., DEVOL, A.H., TIEDJE, J.M. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 2096-2104, 2000.



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

BRAKER, G.; TIEDJE, J.M. Nitric oxide reductase (*norB*) genes from pure cultures and environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 3476-3483, 2003.

BRAKER, G.; SCHWARZ, J.; CONRAD, R. Influence of temperature on the composition and activity of denitrifying soil communities. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 73, p. 134-148, 2010.

BREMER, C.; BRAKER, G.; MATTHIES, D.; REUTER, A.; ENGELS, C.; CONRAD, R. Impact of plant functional group, plant species, and sampling time on the composition of *nirK*-type denitrifier communities in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 73, p. 6876-6884, 2007.

BROOK, B.W. Synergies between climate change, extinctions and invasive vertebrates. **Wildlife Research**, Victoria, v. 35, p. 249-252, 2008.

CASTRO, H.F.; CLASSEN, A.T.; AUSTIN, E.E.; NORBY, R.J.; SCHADT, W. Soil microbial community responses to multiple experimental climate change drivers. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 76, p. 999-1007, 2010.

CLARKE, K.R.; GORLEY, R.N. **PRIMER v6**: User Manual/Tutorial. Plymouth, UK: PRIMER-E, 2006.

COCHRANE, M.A., BARBER, C.P. Climate change, human land use and future fires in the Amazon. **Global Change Biology**, Oxford, v. 15, p. 601-612, 2009.

DANDIE, C.E., BURTON, D.L., ZEBARTH, B.J., HENDERSON, S.L., TREVORS, J.T., GOYER, C. Changes in bacterial denitrifier community abundance over time in an agricultural field and their relationship with denitrification activity. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 74, p. 5997-6005, 2008.

HAUG, A.R.; VITORELLO, V. Cellular aspects of aluminum toxicity in plants. In: YAFUI, M.; STRONG, M.J.; OTA, K.; VERITY, M.A. (Ed.). **Mineral and metal neurotoxicology**. Boca Raton: CRC Press, 1997. p. 35-41.

HENRY, S., BAUDOIN, E., LÓPEZ-GUTIÉRREZ, J.C., MARTIN-LAURENT, F., BRAUMAN, A., PHILIPPOT, L. Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 59, p. 327-335, 2004.

HENRY, S., BRU, D., STRES, B., HALLET, S., PHILIPPOT, L. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 72, p. 5181-5189, 2006.

DANDIE, C.E., WERTZ, S., LECLAIR, C.L., GOYER, C., BURTON, D.L., PATTEN, C.L., ZEBARTH, B.J., TREVORS, J.T. Abundance, diversity and functional gene expression of denitrifier communities in ACHacent riparian and agricultural zones. **Microbial Ecology**, New York, v. 77, p. 69-82, 2011.

ENWALL, K., HALLIN, S. Comparison of T-RFLP and DGGE techniques to assess denitrifier community composition in soil. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 48, p. 145-148, 2008.

FORSTER, P.; RAMASWAMY, V.; ARTAXO, P. et al. Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing. In: SOLOMON, S. et al. (Ed.). **Climate Change 2007: The physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change.** Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2007. p. 212.

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

GUIDA, L., SAIDI, Z., HUGHES, M.N., POOLE, R.K. Aluminium toxicity and binding to *Escherichia coli*. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 156, p. 507-512, 1991.

JANGID, K., WILLIAMS, M.A., FRANZLUEBBERS, A.J., SANDERLIN, J.S., REEVES, J.H., JENKINS, M.B., ENDALE, D.M., COLEMAN, D.C., WHITMAN, W.B. Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 2843-2853, 2008.

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

KLOOS, K., MERGEL, A., ROSCH, C., BOTHE, H. Denitrification within the genus *Azospirillum* and other associative bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, p. 991-998, 2001.

KNOWLES, R. Denitrification. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 46, p. 70, 1982.

LAUBER, C.L., HAMADY, M., KNIGHT, R., AND FIERER, N. Soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale: a pyrosequencing-based assessment. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 75, p. 5111-5120, 2009.

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

- LEHMANN, J., GAUNT, J., RONDON, M. Biochar sequestration in terrestrial ecosystems: a review. **Mitigation and Adaptation Strategy for Global Change**, New York, v. 11, p. 403-427, 2006.
- LIMA, H.N., SCHAEFER, C.E.R., MELLO, J.W.V., GILKES, R.J., KER, J.C. Pedogenesis and pre-Colombian land use of "Terra Preta Anthrosols" ("Indian black earth") of Western Amazonia. **Geoderma**, Amsterdam, v. 110, p. 1-17, 2002.
- LEVY, P.E., CANNELL, M.G.R., FRIEND, A.D. Modelling the impact of future changes in climate, CO<sub>2</sub> concentration and land use on natural ecosystems and the terrestrial carbon sink. **Global Environmental Change**, Amsterdam, v. 14, p. 21-30, 2004.
- LILLY, A., BALL, B.C., MCTAGGART, I.P., DEGROOTES, J. Spatial modeling of nitrous oxide emissions at the national scale using soil, climate and land use information. **Global Change Biology**, Oxford, v. 15, p. 2321-2332, 2009.
- MA, W.K., BEDARD-HAUGHN, A., SICILIANO, S.D., FARRELL, R.E. Relationship between nitrifier and denitrifier community composition and abundance in predicting nitrous oxide emissions from ephemeral wetland soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 1114-1123, 2008.
- MAGURRAN, E. **Ecological diversity and its measurement**. Princeton, N.J.: Princeton University Press, 1988.
- MALHI, Y., ROBERTS, J.T., BETTS, R.A., KILLEEN, T.J., LI, W., NOBRE, C.A. Climate change, deforestation, and the fate of the Amazon. **Science**, Washington, DC, v. 319, p. 169-172, 2008.
- MARGALEF, R. Information theory in ecology. **Journal of General Systems**, London, v. 3, p. 36-71, 1958.
- MATHIEU, O., HÉNAULT, C., LÉVÊQUE, J., BAUJARD, E., MILLOUX, M.J., ANDREUX, F. Quantifying the contribution of nitrification and denitrification to the nitrous oxide flux using <sup>15</sup>N tracers. **Environmental Pollution**, London, v. 144, p. 933-940, 2006.
- MICHALSKI, F., PERES, C.A. Disturbance-mediated mammal persistence and abundance-area relationships in Amazonian forest fragments. **Conservation Biology**, Cambridge, v. 21, p. 1626-1640, 2007.
- NAVARRETE, A.A., CANNAVAN, F.S., TAKETANI, R.G., AND TSAI, S.M. A molecular survey of the diversity of microbial communities in different Amazonian agricultural model systems. **Diversity**, Bethesda, v. 2, p. 787-809, 2010.
- O'NEILL, B., GROSSMAN, J., TSAI, S.M., GOMES, J.E., LEHMANN, J., PETERSON, J., *ET AL.* Bacterial community composition in Brazilian Anthrosol and ACHacent soils characterized using culturing and molecular identification. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, p. 23-35, 2009.
- PASTORELLI, R., LANDI, S., TRABELSI, D., PICCOLO, R., MENGONI, A., BAZZICALUPO, M., PAGLIAI, M. Effects of soil management on structure and activity of denitrifying bacterial communities. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 49, p. 46-58, 2011.

PIELOU, E.C. The measurement of diversity in different types of biological collections. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 13, p. 131-144, 1966.

PHILIPPOT, L., HALLIN, S. Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 8, p. 234-239, 2005.

PHILIPPOT, L. Use of functional genes to quantify denitrifiers in the environment. **Biochemical Society Transactions**, Essex, v. 34, p. 101-104, 2006.

PHILIPPOT, L., CUHEL, J., SABY, N.P.A., CHÈNEBY, D., CHRONÁKOVÁ, A., BRU, D., ARROUAYS, D., MARTIN-LAURENT, F., SIMEK, M. Mapping field-scale spatial patterns of size and activity of the denitrifier community. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 11, p. 1518-1526, 2009.

PRIEMÉ, A., BRAKER, G., TIEDJE, J.M. Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, p. 1893-1900, 2002.

RICH, J.J.; MYROLD, D.D. Community composition and activities of denitrifying bacteria from ACHacent agricultural soil, riparian soil, and creek sediment in Oregon, USA. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1431-1441, 2004.

RONDON, M.A.; LEHMANN, J.; RAMÍREZ, J.; HURTADO, M. Biological nitrogen fixation by common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) increases with bio-char additions. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 43, p. 699-708, 2007.

SALA, O.E.; CHAPIN, F.S.; ARMESTO, J.J. Biodiversity - global biodiversity scenarios for the year 2100. **Science**, Washington, DC, v. 287, p. 1770-1774, 2000.

SCHAEFER, C.E.G.R., LIMA, H.N., GILKES, R.J., MELLO, J.W.V. Micromorphology and electron microprobe analysis of phosphorus and potassium forms of an Indian Black Earth (IBE) Anthrosol from Western Amazonia. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v. 42, p. 401-409, 2004.

SCHULZE, C.H.; WALTERT, M.; KESSLER, P.J.A. et al. Biodiversity indicator groups of tropical land-use systems: comparing plants, birds, and insects. **Ecological Applications**, Washington, DC, v. 14, p. 1321-1333, 2004.

SINGH, B.P., HATTON, B.J., SINGH, B., COWIE, A.L., KATHURIA, A. Influence of biochars on nitrous oxide emission and nitrogen leaching from two contrasting soils. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 39, p. 1224-1235, 2010.

STRES, B., MAHNE, I., AVGUŠTIN, TIEDJE, J.M. Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene fragments differ between native and cultivated Michigan soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 70, p. 301-309, 2004.

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

THIES, J.E., RILLIG, M.C. Characteristics of biochar: biological properties. In: LEHMANN, J.; JOSEPH, S. (Ed.). **Biochar for environmental management**. Westerville, OH: International Biochar Initiative, 2009.

THUILLER, W.; ALBERT, C.; ARAUJO, M.B. et al. Predicting global change impacts on plant species distributions: Future challenges. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Amsterdam, v. 9, p. 137-152, 2008.

YOSHIDA, M., ISHII, S., OTSUKA, S., SENOO, K. Temporal shifts in diversity and quantity of *nirS* and *nirK* in a rice paddy field soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 2044-2051, p. 2009.

WOLSING, M., PRIEMÉ, A. Observation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T-RFLP of *nir* gene fragments. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 48, p. 261-271, 2004.

ZEL, J., SVETEK, J., CRNE, H., SCHARA, M. Effects of aluminum on membrane fluidity of the mycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 89, p. 172-176, 1993.

ZUMFT, W.G. The denitrifying prokaryotes. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. **The prokaryotes**. 2. ed. Edited by. New York: Springer-Verlag, 1992. p. 554-582.

ZUMFT, W.G. Cell biology and molecular basis of denitrification. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 61, p. 533-616, 1997.