

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE
Campus SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO
AMBIENTAL

MARÍLIA DE SOUZA BENTO

**INFLUÊNCIA DA SECA E INUNDAÇÃO NAS COMUNIDADES MICROBIANAS
METANOGÊNICAS E METANOTRÓFICAS EM PLANÍCIES ALUVIAIS DE RIOS
DE ÁGUAS NEGRA, BARRENTA E CLARA DA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Sorocaba

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE
Campus SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO
AMBIENTAL

MARÍLIA DE SOUZA BENTO

**INFLUÊNCIA DA SECA E INUNDAÇÃO NAS COMUNIDADES MICROBIANAS
METANOGÊNICAS E METANOTRÓFICAS EM PLANÍCIES ALUVIAIS DE RIOS
DE ÁGUAS NEGRA, BARRENTA E CLARA DA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental da UFSCar, *Campus* Sorocaba, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

Orientação: Dr Acacio Aparecido Navarrete

Co-orientação: Profa. Dra. Janaína Braga do Carmo

Sorocaba
2019

Bento, Marília de Souza

Influência da seca e inundação nas comunidades microbianas metanogênicas e metanotróficas em planícies aluviais de rios de águas negra, barrenta e clara da Amazônia brasileira / Marília de Souza Bento. -- 2019.
71 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador: Dr Acacio Aparecido Navarrete

Banca examinadora: Dra. Vania Neu, Dra. Cristina Rossi Nakayama

Bibliografia

1. Comunidade microbiana ativa. 2. Produção e consumo de metano. 3. Áreas inundáveis da Amazônia. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano – CRB/8 6979



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Marília de Souza Bento, realizada em 31/05/2019:

Acacio Aparecido Navarrete

Prof. Dr. Acacio Aparecido Navarrete
UFSCar

Acacio Aparecido Navarrete

P/ Profa. Dra. Vania Neu
UFRA

Acacio Aparecido Navarrete

P/ Profa. Dra. Cristina Rossi Nakayama
USP

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) Vania Neu, Cristina Rossi Nakayama e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ao) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.

Acacio Aparecido Navarrete

Prof. Dr. Acacio Aparecido Navarrete

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Claudio e Marisa, e ao meu irmão Tiago. Motivadores, apoiadores e minha base para tudo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sem Ele nenhuma conquista em minha vida seria possível, incluindo a execução deste trabalho.

Ao meu orientador Acacio Navarrete, por acreditar em mim e que graças às suas orientações, força criativa, apoio moral, intelectual e emocional, fez com que este trabalho fosse bem-sucedido.

Aos meus pais, Claudio e Marisa, pelo apoio de todas as formas, financeira e emocionalmente, em todas as minhas fases acadêmicas até aqui. Agradeço ao meu irmão, Tiago, por todo apoio e motivação que me dá em todos os momentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro no início do mestrado (Código de Financiamento 001).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por financiar esta pesquisa no âmbito do Auxílio à Pesquisa – Jovem Pesquisador (Proc. FAPESP 2016/16687-3), conceder bolsa de Mestrado no país (Proc. FAPESP 2017/06415-9) e Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior – BEPE (Proc. FAPESP 2018/02277-3), cooperando com a minha formação profissional.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Janaína, que desde meu estágio profissionalizante, anterior ao mestrado, tem me auxiliado, dando suporte em tudo que precisei.

Aos meus amigos Camila, Caroline, Dayane e Danilo por me acompanharem desde o início do mestrado, dando suporte sempre que necessário e fazendo essa jornada mais leve.

Ao Dr. Leonardo, por todo apoio técnico e amizade em diversas etapas deste trabalho.

À Profa. Dra. Vania Neu por todo apoio durante as coletas no Estado do Pará, sempre solícita e muito gentil.

Ao INPA, em especial ao Pesquisador Bruce Forsberg e ao senhor João que nos auxiliou intensamente nas coletas no Estado do Amazonas.

À UFSCar-Sorocaba por todo suporte e estrutura disponibilizada para a realização deste trabalho, em especial os Laboratório de Fertilidade do Solo, Laboratório BioClima, Laboratório de Geoprocessamento e Laboratório de Microbiologia Ambiental onde parte das análises foram feitas.

Ao CENA-USP e ao Centro de Genômica Ambiental-USP por todo apoio nas análises realizadas em suas dependências.

Ao Netherlands Institute of Ecology (NIOO-KNAW), Holanda, por todo suporte durante o meu estágio no exterior. Em especial ao pesquisador Dr Paul Bodelier por ter me recebido, orientado e passado um pouco de sua vasta experiência durante os três meses em que estive lá.

Ao Mattias De Hollander e a Fleur Gawehns pela paciência e solicitude no suporte na área de Bioinformática.

Ao Dr Sainur Samad que mesmo enfrentando dificuldades pessoais foi solícito em apoiar-me durante meu estágio BEPE.

Aos amigos queridos que fiz na Holanda, Daniela, Letusa, Valéria, Germán, Azkia, Betty, Gilbert, Lordina, Carol e Thamires. À minha querida amiga Vanja por me receber em sua casa na Holanda durante minha estadia.

Ao meu melhor amigo Justin Simonis, que tem me apoiado intensamente há um ano como namorado, amigo e colega de pesquisa na Biotecnologia.

A todos que de alguma forma contribuíram com minha formação e com este trabalho.

“É certo que o ser humano precisa de um espaço fechado onde possa fixar suas raízes e, como uma semente, vir a ser. Mas também precisa da grande Via Láctea no alto do céu e dos vastos espaços marinhos, embora nem as estrelas nem o oceano sirvam às suas necessidades diárias” (Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

BENTO, Marília de Souza. *Influência da seca e inundação nas comunidades microbianas metanogênicas e metanotróficas em planícies aluviais de rios de águas negra, barrenta e clara da Amazônia brasileira*. 2019. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Centro de Ciências e Tecnologias para Sustentabilidade, Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2019.

Os solos de áreas inundáveis contribuem de maneira significativa com o balanço global de metano (CH₄). Nesse sentido, este trabalho foi delineado para avaliar a influência da seca e inundação nas comunidades microbianas ativas envolvidas na produção e consumo de CH₄ em áreas inundáveis florestais e sob sistemas agrícolas tradicionais em planícies aluviais de rios amazônicos de águas negra, barrenta e clara. Análises moleculares baseadas em RNA e no gene 16S rRNA, e análises físicas e químicas do solo foram feitas para revelar a composição das comunidades metanogênicas e metanotróficas ativas presentes no solo e investigar as relações entre essas comunidades microbianas e os fatores físicos e químicos de solos inundáveis sob floresta e sistema agrícola tradicional, amostrados em diferentes profundidades (0-15 cm e 15-30 cm) em dois períodos sazonais (seco e chuvoso). Micro-organismos pertencentes à ordem Methanocellales dominaram as comunidades metanogênicas ativas em solos da planície aluvial de rio de água negra, enquanto essas comunidades foram dominadas por Methanomasiliicoccales em planícies aluviais dos rios de águas barrenta e clara. As comunidades metanotróficas ativas em solos das planícies aluviais com os diferentes tipos de água foram dominadas por micro-organismos pertencentes à classe NC10. Essa classe de bactérias reúne organismos que realizam a assimilação de nitrato e nitrito para oxidação anaeróbica do CH₄. A variação observada na composição das comunidades metanogênicas e metanotróficas ativas entre as diferentes amostras provenientes das planícies aluviais de rios amazônicos foi explicada em 53,3 % e 22,6 %, respectivamente, pelos fatores edáficos analisados. Quando interpretados conjuntamente, os resultados desse estudo abrem possibilidades para interpretações acerca da produção e no consumo de CH₄ em áreas inundáveis da Amazônia a partir de características particulares das planícies aluviais de rios e águas negra, barrenta e clara dessa região, dissociando-as entre si em função das comunidades microbianas metanogênicas e metanotróficas ativas e de fatores edáficos, e não apenas pelo tipo de água.

Palavras-chave: Metano. Gene 16S rRNA. Comunidade microbiana ativa. Áreas inundáveis. Águas amazônicas.

ABSTRACT

BENTO, Marília de Souza. *Influence of dry and flooding on methanogenic and methanotrophic microbial communities in Amazonian black, white and clear floodplains*. 2019. 71 f. Dissertation (Master in Biotechnology and Environmental Monitoring) - Center for Science and Technology for Sustainability, Federal University of São Carlos, Sorocaba, 2019.

Soils from wetland areas contribute significantly to the global methane (CH₄) budget. In this sense, this work was designed to evaluate the influence of dry and flooding in the active microbial communities involved in the production and consumption of CH₄ in wetland areas under forest and traditional farming system in Amazonian black, white and clear floodplains. Molecular RNA- and 16S ribosomal RNA gene-based analyzes, and soil physicochemical analyzes were performed to reveal the soil methanogenic and methanotrophic microbial communities and investigate the relationships between these microbial communities and the physicochemical factors of soil from forest sites and traditional agricultural systems in two different soil layers (0-15 cm and 15-30 cm) and in two seasonal periods (dry and wet season). Microorganisms belonging to the order Methanocellales dominated the active methanogenic communities in soils of the black floodplain, while these communities were dominated by Methanomassiliicoccales in white and clear floodplains. The methanotrophic communities active in floodplain soils with the different water types were dominated by microorganisms belonging to the NC10 class. This class of bacteria assembles organisms that perform the assimilation of nitrate and nitrite for anaerobic oxidation of CH₄. The observed variation in the composition of the active microbial methanogenic and methanotrophic communities among the different samples from Amazonian floodplains was explained in 53.3 % and 22.6 %, respectively, by the edaphic factors analyzed. Taken together, the results of this study open possibilities for interpretations about the production and consumption of CH₄ in wetland areas of Amazonia based on the particular characteristics of the black, white and clear floodplains, dissociating them among themselves based on active methanogenic and methanotrophic microbial communities and edaphic factors, and not just by water type.

Keywords: Methane. 16S rRNA gene. Active microbial community. Wetland areas. Amazonian water types.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo do metano em zonas úmidas.....	19
Figura 2 – Comportamento sazonal da precipitação total, temperatura máxima média e temperatura média mínima na estação pluviométrica de Manaus - AM.....	25
Figura 3 – Comportamento sazonal da precipitação total, temperatura máxima média e temperatura média mínima na estação pluviométrica de Baião – PA.....	27
Figura 4 – Uso e cobertura nas áreas I, II e III.....	28
Figura 5 – Amostrador de solo composto por tubo e conexão roscável em policloreto de vinila (PVC) utilizado para coleta de amostras de solo no período seco. A. Tubo e conexão roscável; B. Amostrador parcialmente penetrado no solo; C. Partes do amostrador desconectadas após coleta e seccionamento do perfil do solo.....	29
Figura 6 – Amostrador de fundo utilizado para coleta de amostras de solo no período chuvoso. A. Cabeça do núcleo com válvula de retenção; B. Alça em T e haste extensora acopladas à cabeça do núcleo; C. Aparato de extrusão.....	30
Figura 7 – Métricas ecológicas e abundância relativa das comunidades metanogênicas e metanotróficas ativas em amostras de solo coletadas em sítios florestais e em sistemas agrícolas tradicionais em planícies aluviais amazônicas de rios de águas negra, barrenta e clara durante período de seca e inundação. FLO, floresta; SAT, sistema agrícola tradicional; PNI, período não inundado; PI, período inundado; D1, camada 0-15 cm; D2, camada 15-30 cm.....	47
Figura 8 – Heatmaps da análise de agrupamento hierárquico para a abundância relativa de membros das comunidades metanogênicas (A) e metanotróficas (B) ativas em amostras de solo coletadas em sítios florestais (FLO) e sistemas agrícolas tradicionais (SAT) localizados na planície aluvial de rio de água negra da Amazônia durante período não inundado (PNI) e período inundado (PI). P1, ponto amostral 1; P2, ponto amostral 2; P3, ponto amostral 3; D1, camada 0-15 cm; D2, camada 15-30 cm.....	51
Figura 9 – Heatmaps da análise de agrupamento hierárquico para a abundância relativa de membros das comunidades metanogênicas (A) e metanotróficas (B) ativas em amostras de solo coletadas em sítios florestais (FLO) e sistemas agrícolas tradicionais (SAT) localizados na planície aluvial de rio de água barrenta da Amazônia durante período não inundado (PNI) e período inundado (PI). P1, ponto amostral 1; P2, ponto amostral 2; P3, ponto amostral 3; D1, camada 0-15 cm; D2, camada 15-30 cm.....	52
Figura 10 – Heatmaps da análise de agrupamento hierárquico para a abundância relativa de membros das comunidades metanogênicas (A) e metanotróficas (B) ativas em amostras de solo coletadas em sítios florestais (FLO) e sistemas agrícolas tradicionais (SAT) localizados na planície aluvial de rio de água clara da Amazônia durante período não inundado (PNI) e período inundado (PI). P1, ponto amostral 1; P2, ponto amostral 2; P3, ponto amostral 3; D1, camada 0-15 cm; D2, camada 15-30 cm.....	53

Figura 11 – Diagrama de ordenação de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada na matriz de distância UniFrac ponderada (weighted) para UTOs componentes das comunidades metanogênica (A) e metanotróficas (B) ativas em sítios florestais (FLO) e sistemas agrícolas tradicionais (SAT) localizados na planície aluvial de rio de água negra da Amazônia durante período não inundado (PNI) e período inundado (PI).....	56
Figura 12 – Diagrama de ordenação de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada na matriz de distância UniFrac ponderada (weighted) para UTOs componentes das comunidades metanogênica (A) e metanotróficas (B) ativas em sítios florestais (FLO) e sistemas agrícolas tradicionais (SAT) localizados na planície aluvial de rio de água barrenta da Amazônia durante período não inundado (PNI) e período inundado (PI).....	57
Figura 13 – Diagrama de ordenação de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada na matriz de distância UniFrac ponderada (weighted) para UTOs componentes das comunidades metanogênica (A) e metanotróficas (B) ativas em sítios florestais (FLO) e sistemas agrícolas tradicionais (SAT) localizados na planície aluvial de rio de água clara da Amazônia durante período não inundado (PNI) e período inundado (PI).....	58
Figura 14 – Diagrama de ordenação da análise de redundância (RDA) relacionando os fatores físicos e químicos do solo e as comunidades metanogênicas e metanotróficas em planícies aluviais de águas negra (PAAN), barrenta (PAAB) e clara (PAAC) da Amazônia durante período não inundado (PNI) e inundado (PI) revelada com base em sequenciamento do gene 16S rRNA.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

P.A. - Planície Aluvial

FLO - sítio de amostragem sob uso florestal

SAT - sítio de amostragem sob uso de Sistema Agrícola Tradicional

P1 - Ponto de amostragem 1

D1 - Profundidade 1

P2 - Ponto de amostragem 2

D2 - Profundidade 2

PNI - Período Não Inundado

PI - Período Inundado

RNA - Ácido Ribonucleico

UTO - Unidade Taxonômica Operacional

mg. kg⁻¹ - massa em miligramas do elemento químico por quilo de solo analisado

ppm - massa em micrograma do elemento químico contido em um grama de solo analisado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 HIPÓTESES CIENTÍFICAS	17
3 OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
4.1 AS ÁREAS INUNDÁVEIS DA AMAZÔNIA: UM ECOSISTEMA DE PAISAGEM DIVERSIFICADA E DINÂMICA	19
4.2 OS MICRO-ORGANISMOS COMO AGENTES PRODUTORES E MITIGADORES DAS EMISSÕES DE METANO EM ZONAS ÚMIDAS.....	20
4.3 FATORES FÍSICOS E QUÍMICOS DO AMBIENTE E SUAS RELAÇÕES COM METANOGÊNESE E METANOTROFIA	23
5 MATERIAIS E MÉTODOS	25
5.1 DESCRIÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO.....	25
5.2 AMOSTRAGEM DE SOLO	31
5.3 ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS DO SOLO.....	34
5.3.1 pH	34
5.3.2 Umidade	34
5.3.3 Carbono Orgânico Dissolvido (COD)	35
5.3.4 Carbono e Nitrogênio Totais	35
5.3.5 Sulfato	35
5.3.6 Nitrato e Amônio	36
5.3.6.1. Extração de Nitrato e Amônio	36
5.3.6.2 Quantificação do Nitrato	36
5.3.6.3 Quantificação do Amônio.....	36
5.3.7 Fósforo	37
5.3.8 Análise Granulométrica	37
5.4 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO TAXONÔMICA DE COMUNIDADES METANOGÊNICAS E METANOTRÓFICAS	38
5.4.1 Extração do RNA Genômico do Solo e Síntese de cDNA	38
5.4.2 Preparo de Bibliotecas e Sequenciamento de Amplicons do Gene 16S rRNA de Archaea e Bacteria em Plataforma MiSeq Illumina	38
5.4.3 Processamento e Análise de Sequências do Gene 16S rRNA de Membros	

Ativos da Comunidade Metanogênica e Metanotrófica	39
5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	40
5.5.1 Teste de Tukey	40
5.5.2 Cálculo de métricas ecológicas	41
5.5.3 Heatmaps da análise de agrupamento hierárquico.....	41
5.5.3 Análise de Similaridade	41
5.5.4 Análise de Coordenadas Principais (PCoA)	41
5.5.5 Análise de Redundância (RDA)	42
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DO SOLO.....	43
6.3 COMUNIDADES METANOGENÊNICAS E METANOTRÓFICAS PRESENTES NO SOLO	48
6.4 RELAÇÕES DAS COMUNIDADES METANOGENÊNICAS E METANOTRÓFICAS COM FATORES FÍSICOS E QUÍMICOS DO SOLO	61
7 CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

O metano (CH_4) é um importante gás de efeito estufa, que contribuiu para uma estimativa de 18% a 20% (KNITTEL, 2009; ZHUANG, 2009) para o aquecimento global. O metano tem impactos ambientais além daqueles de um gás de efeito estufa direto, através da química atmosférica que aumenta a abundância de ozônio troposférico (O_3) e diminui a dos radicais hidroxila (OH) e, portanto, capaz de interferir em muitos outros componentes atmosféricos (PRATHER, 2010).

De acordo com Ciais *et al* (2014) as áreas inundáveis naturais são as principais responsáveis pela variabilidade interanual global das emissões de CH_4 . Sendo as áreas úmidas da bacia amazônica fontes globalmente significativas de metano atmosférico (MELACK, 2004).

As planícies de inundação tornaram-se áreas prioritárias para conservação devido a capacidade de manutenção da biodiversidade (JUNK *et al.*, 2006), além de contribuir para o balanço global de água, carbono e enxofre na atmosfera (KIRK, 2004). As áreas inundáveis são responsáveis por aproximadamente 20% da emissão global de metano (CH_4) de 500 ± 100 Tg (10^{12} g) anualmente. Essas áreas são conhecidas como importante fonte emissora de CH_4 para a atmosfera e estima-se que compreendem cerca de 60% do fluxo de CH_4 de todas as zonas úmidas naturais tropicais (BARTLETT e HARRISS, 1993; BLOOM *et al.*, 2010; BRIDGHAM *et al.*, 2013).

O CH_4 é produzido naturalmente por micro-organismos em meios livres de oxigênio (anaeróbios) como áreas alagáveis, oceanos e no trato digestivo de cupins e ruminantes selvagens. Por outro lado, ações antrópicas também contribuem de maneira significativa para as emissões anuais de CH_4 (WUEBBLES; HAYHOE, 2002; SIMPSON *et al.*, 2006; XIE *et al.*, 2009). O fluxo de CH_4 no solo depende de processos microbianos ocorridos em situação de aerobiose ou anaerobiose no ciclo do carbono (WUEBBLER e HAYHOE, 2002). A produção de CH_4 ocorre devido a atividade de micro-organismos metanogênicos (GARRITY *et al.*, 2007), que em condições restritas de oxigenação reduzem compostos orgânicos utilizando o carbono como aceptor de elétrons. Além disso, o fluxo de CH_4 entre o solo e a atmosfera é influenciado pela disponibilidade de nitrogênio no sistema, de modo que solos fertilizados com nitrogênio têm revelado menor consumo de metano (OMONODE *et al.*, 2007). Contudo, a relação entre o nitrogênio-fertilizante e a redução no consumo de CH_4 ainda não foi totalmente explicada, mas pode ser causada por inibição induzida do nitrogênio na atividade dos micro-organismos que oxidam o CH_4 (MOSIER *et al.*, 2004), bem como

pelo aumento da atividade microbiana, que consome oxigênio e ocasiona a formação temporária de microssítios com baixa difusão de gases (TIEDJE *et al.*, 1984; HUANG *et al.*, 2004; MÜLLER *et al.*, 2004).

Os micro-organismos do solo são essenciais para o bom funcionamento e sustentabilidade dos ecossistemas (CHOUDHARY *et al.*, 2011; MIRANSARI, 2011). Além disso, uma elevada diversidade microbiana é essencial para a estabilidade dos ecossistemas, proporcionando diversidade funcional e manutenção dos processos ecológicos (BELL *et al.*, 2005). As mudanças na vegetação, bem como práticas agrícolas, podem afetar a composição da comunidade microbiana do solo e as suas propriedades físico-químicas. No entanto, os efeitos das práticas agrícolas sobre a microbiota do solo ainda precisam ser melhor analisados, já que as informações adquiridas ainda não são suficientes para responder de forma sistemática como o manejo agrícola do solo afeta a comunidade microbiana e a emissão de metano em áreas inundáveis tropicais (DING *et al.*, 2014).

A importância das áreas inundáveis tropicais para a emissão de CH₄ para a atmosfera e a carência de estudos que buscam compreender a contribuição das áreas inundáveis da Amazônia para o balanço global do CH₄ são reconhecidas pela comunidade científica nacional e internacional, enfatizando ainda a importância de estudos que tenham como base a avaliação dos membros ativos da comunidade microbiana envolvida na produção e consumo de metano em planícies aluviais de rios com diferentes tipos de água na Amazônia. Atualmente existe um número reduzido de estudos com enfoque na ecologia de comunidades metanogênicas e metanotróficas nesta região tropical, e estes estudos foram desenvolvidos com base em DNA isolado do solo, permitindo apenas uma avaliação potencial de tais comunidades microbianas (KNITTEL; BOETIUS, 2009; JI *et al.*, 2016; XU, 2016). Apesar da importância de tais estudos para o conhecimento da composição e diversidade destas comunidades, e das dificuldades técnicas envolvidas com avaliação da comunidade microbiana ativa com base em RNA em escala de paisagem, este trabalho utilizou abordagem molecular baseada em RNA isolado de amostras de solo provenientes de sítios florestais e sistemas agrícolas tradicionais de planícies aluviais de rios de águas negra, barrenta e clara para avaliar a influência da seca-inundação na composição de comunidades metanogênicas e metanotróficas em áreas inundáveis da Amazônia.

2 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

Com base no exposto acima foram definidas duas hipóteses científicas, as quais foram avaliadas no âmbito deste trabalho:

Hipótese I. Áreas inundáveis florestais e sob sistemas agrícolas tradicionais nas planícies aluviais de rios amazônicos de águas negra, barrenta e clara diferem quanto à composição das comunidades microbianas metanogênicas e metanotróficas ativas, com ocorrência e abundância diferenciadas de seus membros em diferentes profundidades e período sazonal.

Hipótese II. As características físicas e químicas do solo em áreas inundáveis florestais e sob sistemas agrícolas tradicionais nas planícies aluviais de rios de águas negra, barrenta e clara são as principais forçantes que determinam a composição das comunidades microbianas metanogênicas e metanotróficas presentes em diferentes profundidades de amostragem do solo e período sazonal entre as planícies aluviais inundáveis com os diferentes tipos de água na Amazônia.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a influência da seca e inundação nas comunidades microbianas envolvidas na produção e consumo de CH₄ em áreas inundáveis florestais e sob sistemas agrícolas tradicionais, em duas camadas de solo, nas planícies aluviais de rios amazônicos de águas negra, barrenta e clara.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A fim de avaliar as hipóteses descritas acima, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

a) Determinar a composição das comunidades metanogênica e metanotrófica ativas, envolvidas na produção e consumo de CH₄ em dois diferentes sistemas de usos da terra (floresta e sistema agrícola tradicional), em duas diferentes camadas de solo (0-15 cm e 15-30 cm), nos períodos de seca e inundação na região da Amazônia brasileira, em áreas inundáveis localizadas em planícies aluviais de rios de águas negra, barrenta e clara na Amazônia.

b) Determinar fatores físicos e químicos do solo em áreas inundáveis florestais e sob sistemas agrícolas tradicionais nas planícies aluviais de rios de águas negra, barrenta e clara na Amazônia, e correlacionar tais fatores do solo com a composição das comunidades metanogênica e metanotrófica ativas identificadas no mesmo solo, em duas diferentes camadas de solo (0-15 cm e 15-30 cm), nos períodos de seca e inundação na região da Amazônia.

4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 AS ÁREAS INUNDÁVEIS DA AMAZÔNIA: UM ECOSISTEMA DE PAISAGEM DIVERSIFICADA E DINÂMICA

As áreas inundáveis se caracterizam pela presença de água, solos anóxicos, saturados e diferentes tipos de vegetação adaptados a essas condições, sendo a metanogênese um processo importante nas áreas inundáveis de água doce. Nesse ambiente, o CH₄ é produzido como resultado da atividade de um grande e diversificado grupo de micro-organismos metanogênicos (Domínio *Archaea*). O CH₄ gerado pode ser difundido para a atmosfera ou pode ser oxidado por vários micro-organismos sob condições aeróbicas e anaeróbicas, tais micro-organismos interceptam e consomem este gás diminuindo sua emissão para a atmosfera. Tanto a produção quanto o consumo de CH₄ são regulados por fatores edáficos (JOHANSSON *et al.*, 2004). A interação desses processos com ambientes heterogêneos resulta em grandes variações nos fluxos de CH₄. As áreas inundáveis naturais e agrícolas de água doce representam aproximadamente 40% das fontes de CH₄ atmosférico (TORRES-ALVARADO, 2017). Neste mesmo trabalho o autor afirma a necessidade de estudos em áreas inundáveis tropicais, visto que grande parte dos estudos de consumo e produção do CH₄ é representada por áreas inundáveis boreais e temperadas.

Dentre as zonas úmidas amazônicas encontram-se as planícies aluviais, também conhecidas como várzeas ou áreas inundáveis (CHRISTOFOLETTI, 1981). Normalmente, as planícies aluviais ocorrem no médio e baixo curso de um rio, onde o relevo, mais arrasado pela erosão, apresenta pequeno gradiente (declividade) topográfico. A característica mais marcante das áreas inundáveis é o fato delas serem naturalmente susceptíveis a inundações. Em épocas de cheia, o canal fluvial extravasa e inunda a região da planície. Quando ocorre a inundação, além dos sedimentos provindos dos Andes, as águas barrentas do rio Solimões lançam enorme quantidade de nutrientes em suas planícies aluviais, o que torna o solo muito fértil para o plantio. No caso dos rios Negro e Tocantins as águas são pobres em sedimento, onde em época de chuvas têm-se um aporte muito grande de matéria orgânica alóctone vinda do ambiente terrestre, enriquecendo as planícies aluviais destes rios com nutrientes (EMBRAPA, 1999). As áreas inundáveis da Amazônia constituem um ecossistema de paisagem diversificada e dinâmica que há milhares de anos tem sido ocupado por populações humanas. As margens de grandes rios amazônicos tais como Negro, Solimões e Tocantins serviram de base para o desenvolvimento da agricultura de subsistência, com o cultivo de vegetais de rápida colheita por causa do regime dos rios, pelos nativos que ocupavam essas

áreas antes da colonização. Nos últimos 30 anos, a ocupação das áreas inundáveis da Amazônia tem se intensificado, especialmente com plantios de ciclo curto (cana-de-açúcar, rambutã, melancia, quiabo, mandioca, etc.), fibras (malva) e hortaliças (couve, maxixe, etc), além das atividades mais tradicionais de pesca, pecuária, fruticultura (cacau) e extração de madeira (VIEIRA, 1992).

Apesar dessa importância, no entanto, as áreas inundáveis tropicais estão pouco representadas em modelos regionais e globais com o objetivo de prever as emissões de CH₄ nessas escalas geográficas. No ano de 2014 foi documentado um primeiro passo no desenvolvimento de um modelo baseado em processo de emissões de CH₄ de áreas inundáveis tropicais para aplicações globais. Contudo, a microbiota do solo não foi considerada como componente na modelagem. Ao final, não foi possível reduzir a incerteza na magnitude das emissões de CH₄ da bacia amazônica (RINGEVAL, 2014). Xu *et al.* (2016) alertaram sobre a importância de melhorias nos modelos de CH₄ para os modelos do sistema terrestre e para a simulação adicional dos *feedbacks* do ciclo clima-carbono. Assim, justifica-se a necessidade de pesquisas em áreas pouco estudadas até o momento quanto à produção e consumo de CH₄ para tornar mais realista e original a modelagem das emissões de CH₄, na qual a inclusão da microbiota também seja avaliada no ciclo regional e global do carbono.

4.2 OS MICRO-ORGANISMOS COMO AGENTES PRODUTORES E MITIGADORES DAS EMISSÕES DE METANO EM ZONAS ÚMIDAS

O metano é um produto do processo de respiração que ocorre principalmente pelo uso de ácido acético (arqueias metanogênicas acetoclásticas) e hidrogênio e dióxido de carbono (arqueias metanogênicas hidrogenotróficas) (FENCHEL *et al.*, 1998; BRIDGHAM *et al.*, 2013). Isotopicamente, o CH₄ produzido pelas metanogênicas hidrogenotróficas tem menor $\delta^{13}\text{C}$ e maior δD ($\delta^{13}\text{C} = -110\text{‰}$ a -60‰ e $\delta\text{D} = -250\text{‰}$ a -170‰) em relação ao CH₄ produzido pelas metanogênicas acetoclásticas ($\delta^{13}\text{C} = -60\text{‰}$ a -50‰ e $\delta\text{D} = -4000\text{‰}$ a -250‰) (CHANTON *et al.*, 2005; WHITICAR, 1999). Moléculas mais leves são preferencialmente consumidas por micro-organismos metanotróficos, deixando um remanescente de CH₄ enriquecido em ¹³C e D em relação ao pool de CH₄ original (CHANTON *et al.*, 2005; WHITICAR, 1999). Nas zonas úmidas, o metano é produzido em condições anaeróbias (incluindo microssítios anaeróbios na zona oxigenada), e também por vias aeróbias não mediadas por micro-organismos em tecido vegetal (KEPPLER *et al.*, 2006; LAANBROEK, 2010). O CH₄ produzido pode ser difundido para a atmosfera ou pode ser oxidado por arqueias e bactérias sob condições aeróbias e anaeróbias, as quais consomem uma fração do

CH₄ produzido, diminuindo, assim, as emissões desse gás para a atmosfera (BASTVIKEN *et al.*, 2002). Dessa forma, a quantidade de CH₄ emitido a partir desses ecossistemas representa o balanço entre a produção de CH₄ (metanogênese) e a oxidação de CH₄ (metanotrofia) (BRIDGHAM *et al.*, 2013). Enquanto ambos os processos são regulados pela atividade microbiana, a dinâmica da vegetação controla o fluxo de CH₄ mediante a regulação do transporte do CH₄ do solo para a atmosfera, e influencia a produção e o consumo de CH₄ pelos micro-organismos (LAANBROEK, 2010) (Figura 1).

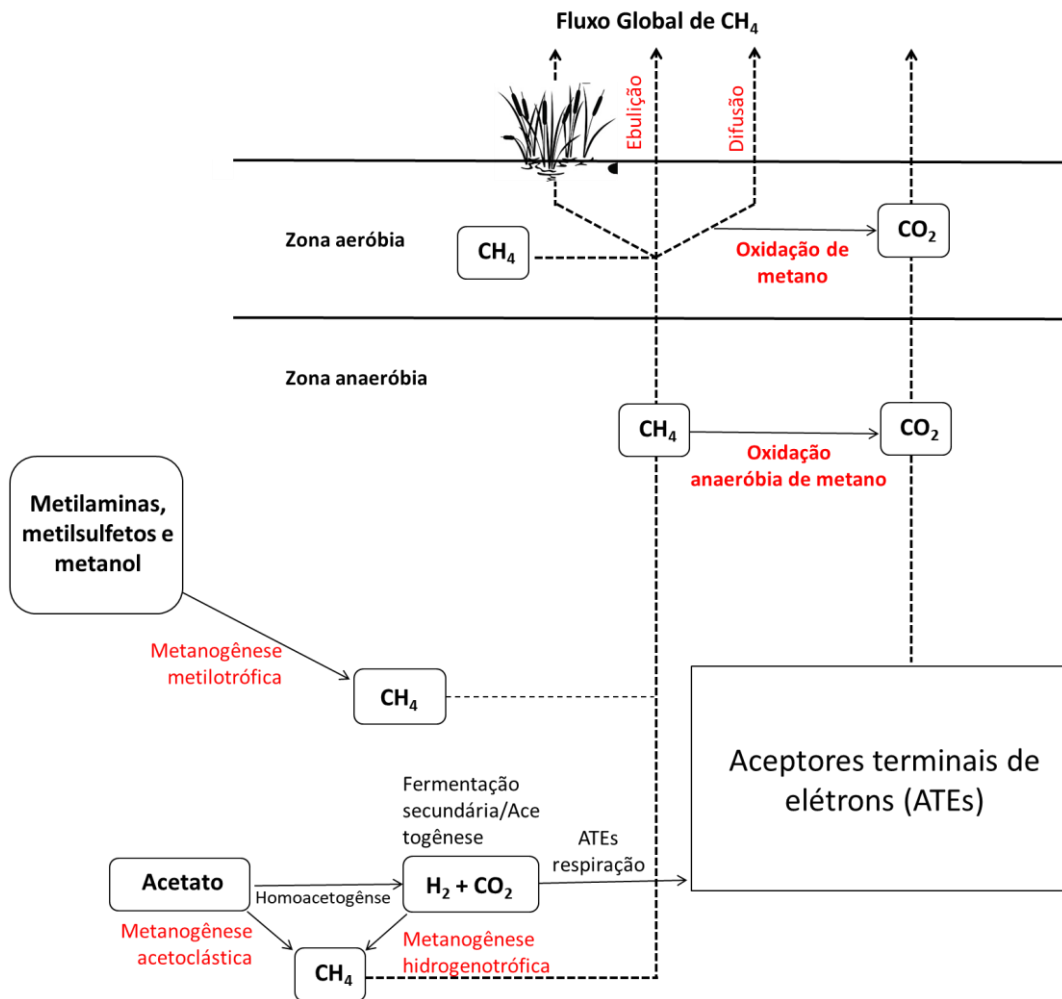


Figura 1. Ciclo do metano em zonas úmidas. (Adaptado de Bridgham *et al.*, 2013)

Os micro-organismos metanogênicos são responsáveis pela produção biológica de CH₄ (metanogênese). Eles costumam usar H₂/CO₂ e acetato como substratos sob condições anaeróbicas (WAGNER; LIEBNER, 2009). Parte do CH₄ produzido é oxidado por bactérias oxidadoras de metano (MOB, do inglês *Methane-Oxidizing Bacteria*) na superfície de solos óxicos e na oxiclina da coluna de água (BASTVIKEN *et al.*, 2004) ou por oxidação

anaeróbica (SCHUBERT et.al., 2012). Uma vez que a oxidação não é completa, parte do CH₄ permanece dissolvido e estocado nas águas intersticiais do solo e no hipolímnio, e outra parte é emitida para a atmosfera (BASTVIKEN *et al.*, 2004; SCHUBERT *et al.*, 2012).

A oxidação anaeróbica do CH₄ (AOM, do inglês *Anaerobic Oxidation of Methane*) é um importante sumidouro desse gás que desempenha um papel significativo no aquecimento global. A AOM foi primeiramente encontrada acoplada à redução de sulfato e mediada por *Archaea* metanotrófica anaeróbica (ANME, do inglês *Anaerobic Methane Oxidizing Archaea*) e bactérias redutoras de sulfato (SRB). ANME, frequentemente formando consórcios com SRB, são filogeneticamente relacionados a *Archaea* metanogênica. A ANME-1 é capaz de produzir CH₄. Subsequentemente, verificou-se que a AOM também pode ser associada à desnitrificação. Um dos micro-organismos conhecidos responsáveis por este processo é o '*Candidatus Methanoperedens nitroreducens*', pertencente ao gênero '*Candidatus Methanoperedens*' do domínio *Archaea* (CUI, 2015).

Bactérias aeróbicas metilotróficas utilizam metano (metanotróficos) ou seus derivados oxidados e substituídos (metilobactérias) como fontes de carbono e energia. Dois grandes grupos de metilotróficos podem ser distinguidos, dependendo da gama de substratos utilizáveis. Os metilotróficos obrigatórios podem utilizar apenas compostos de carbono, enquanto os metilotróficos facultativos utilizam, além disso, vários compostos de multicarbono. Existem três vias principais do metabolismo de C1: as vias da serina, da monofosfato de ribulose e da bifosfato de ribulose (TROTSENKO *et al.*, 2001).

A oxidação de metanol e metilamina por metilotróficos é um tanto incomum, ambos substratos são compostos C1 e ambos são mais reduzidos que o material celular. Assim, para cada molécula de glicose sintetizada (por exemplo), é necessária a oxidação de seis moléculas de substrato. Além disso, o metanol e a metilamina são, em conjunto, únicos por serem os únicos substratos orgânicos cuja oxidação não envolve as quinonas da membrana, proteínas de enxofre do ferro e citocromos do tipo b de cadeia média. As desidrogenases para a oxidação de metanol e metilamina são incomuns, não sendo acopladas à produção de NADH e sendo ambas quinoproteínas que passam elétrons para a cadeia de transporte de elétrons com um potencial redox relativamente alto. Uma consequência disso é que a porcentagem de fluxo de elétrons para o oxigênio durante o crescimento em metanol e metilamina a partir de NADH ou flavoproteínas é muito baixa (0 - 30%) comparado com a oxidação de substratos convencionais (100%). Entre 50% e 70% do fluxo de elétrons para o oxigênio é sempre por meio das cadeias de transporte de elétrons do metanol ou metilamina, e o que é especial sobre

o metabolismo energético em bactérias metilotróficas é a natureza das desidrogenases para a oxidação inicial desses substratos de crescimento. aceptores de elétrons e suas relações com as oxidases e síntese de ATP (ANTHONY, 1987).

4.3 FATORES FÍSICOS E QUÍMICOS DO AMBIENTE E SUAS RELAÇÕES COM METANOGÊNESE E METANOTROFIA

Ji *et al.* (2016) estudaram a relação de comunidades microbianas em solos de planícies aluviais da Amazônia com fatores físicos e químicos do solo. Os autores mostraram concentrações de sulfato e ferro férrico (Fe^{3+}), e valores de pH e $\delta^{13}\text{C}$ de carbono orgânico geralmente maiores em solo de planícies aluviais de rios de água barrenta do que de água negra e clara. Por sua vez, as concentrações de carbono, nitrogênio e taxas de produção de CH_4 foram menores em solos de planície aluvial de rio de água barrenta em relação aos solos de planícies aluviais de rios de águas clara e negra. Os autores afirmam ainda que a estrutura das comunidades microbianas de áreas inundáveis das planícies aluviais de rios com três diferentes tipos de água foi determinada pela heterogeneidade ambiental, pois à medida que os fatores físicos e químicos se diferem entre os três tipos de solos, a composição das comunidades microbianas também diferiu (JI *et al.*, 2016).

A oxidação de CH_4 em ambientes anaeróbicos pode ser associada à redução de sulfato, nitrato ou nitrito (CALDWELL *et al.*, 2008; ETTWIG *et al.*, 2008). Islas-Lima *et al.* (2004) demonstraram que a oxidação anaeróbica do CH_4 também pode ser associada à desnitrificação em culturas mantidas em reatores em batelada, e Raghoebarsing *et al.* (2006) enriqueceram um consórcio microbiano do sedimento de um canal holandês o observou a associação da oxidação de CH_4 à desnitrificação, demonstrando que esse processo ocorre em sedimentos anóxicos. Da mesma forma como esses conhecimentos foram sendo acumulados mediante observações geoquímicas, estudos recentes começaram a inferir sobre a oxidação anaeróbica de CH_4 associada à redução de ferro férrico e óxido de manganês com base em evidências geoquímicas.

Nauhaus *et al.* (2005) demonstraram que populações microbianas responsáveis pela oxidação anaeróbica de metano reduziram o ferro férrico e o óxido de manganês, porém essa redução não estava ligada à oxidação do metano. A oxidação anaeróbica de metano associada à redução de metais oxidados foi demonstrada em amostras ambientais e em cultura de enriquecimento de água doce, por meio da combinação da redução de Fe(III) e Mn(IV)

(compostos oxidantes aceptores de elétrons mais favoráveis termodinamicamente) à oxidação do metano pelas arqueias da ordem Methanosarcinales relacionadas à '*Candidatus M. nitroreducens*' (ETTWIG *et al.*, 2016). Os autores demonstraram relação da oxidação anaeróbica de metano com micro-organismos dependente de Fe(III) e Mn(IV), na qual os íons férrico solúvel (Fe(III), como Fe-citrato) e as formas nanoparticuladas de Fe(III) e Mn(IV) suportaram a atividade oxidante do CH₄, sendo produzido em quantidades estequiométricas o CO₂ e íons ferroso (Fe(II)) (ETTWIG *et al.*, 2016). Estudos mais recentes demonstraram a oxidação anaeróbica de metano ferro-dependente como aceptor de elétron na presença de abundante '*Candidatus M. nitroreducens*' (VAKSMAA *et al.*, 2017).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DESCRIÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO

As áreas de estudo estão localizadas em planícies aluviais sazonalmente inundadas pelas águas dos rios Negro, Solimões, no Estado do Amazonas, e Tocantins, no Estado do Pará, nas bacias Amazônica e do Tocantins-Araguaia. Considerando a classificação dos rios amazônicos com base na coloração e características físicas e químicas da água (SIOLI, 1984), as áreas de estudo foram identificadas com o propósito de permitir amostragem em planícies aluviais de rios de águas negra, barrenta e clara. Rios de águas negras drenam áreas florestais, e apresentam pH variando de 4 a 5, altas concentrações de carbono orgânico dissolvido (COD) (7 a 10 mg L⁻¹), baixos teores dos principais cátions totais e partículas suspensas (<10 mg mg L⁻¹); por sua vez, rios de águas barrentas/brancas apresentam pH próximo a 7, são relativamente ricas em Ca²⁺ e HCO⁻³ o que as classificam como carbonatadas; e os rios de águas claras apresentam menor taxa de erosão, com águas límpidas, com características químicas de transição entre os dois tipos anteriores e o pH variando entre 4,5 e 7,0 (SIOLI, 1960; STALLARD; EDMOND, 1983).

Durante os trabalhos de campo, a cidade de Manaus, estado do Amazonas, serviu de ponto de partida para as expedições de campo nas planícies dos rios Negro e Solimões, e a cidade de Baião, no estado do Pará, foi ponto de partida para as expedições de campo na planície aluvial do Rio Tocantins. Segue breve descrição das áreas de estudo.

I – Área de estudo na planície aluvial do Rio Negro

A área de estudo na planície aluvial do rio Negro está localizada a noroeste de Manaus (-3°00'41''S e -60°11'15''O). O rio Negro é um dos principais rios do estado do Amazonas e do Brasil, e está inserido em uma área de terrenos planos suscetíveis a inundações nos períodos de cheia, como é possível verificar na Figura 2. As localidades onde a altitude apresenta valores mais elevados estão a noroeste dos pontos de coleta, relacionadas à mudança de relevo da região. O clima da região, de acordo com a classificação de Köppen (1948) é Afi (Tropical úmido isotérmico), com verão quente e chuvoso e inverno mais seco. A linha de inundação da região está representada na Figura 2 com a cor cinza e mostra o limite aproximado da inundação nos períodos de cheia do rio, que possui uma vazão de 36000 m³/s. Verifica-se que os pontos de coleta estão localizados dentro da área de inundação e, portanto, suscetíveis a esse regime de cheias do rio. Com precipitação média histórica de 2307,4 mm

(1961-2019), e são inferiores a 100 mm no período de seca nos meses de julho a setembro. A paisagem regional é diversificada, apresentando em sua maior parte cobertura florestal primária e no restante, pequenas áreas agrícolas onde prevalece a agricultura de subsistência, cultivando principalmente cana-de-açúcar, rambutã, melancia e quiabo.

II – Área de estudo na planície aluvial do Rio Solimões

A área de estudo na planície aluvial do rio Solimões localiza-se ao sul da cidade de Manaus ($-3^{\circ}13'50''S$ e $-59^{\circ}59'26''O$). Os pontos de coleta no sítio de floresta estão localizados onde as cotas altimétricas variam de 20 a 30 m, já os pontos de coleta no sítio de cultivo agrícola tradicional estão entre as cotas de 10 e 20 m. O regime pluviométrico na região de inserção dessa área de estudo é marcado por meses em que a precipitação é extremamente elevada, com precipitação média histórica de 2307,4 mm (1961-2019), e são inferiores a 100 mm no período de seca nos meses de julho a setembro. Assim, esse regime de chuvas aliado a dinâmica fluvial do rio Solimões, que possui uma vazão de $53000 \text{ m}^3/\text{s}$, faz com que praticamente toda a área de estudo fique inundada no período de cheia do rio. Na Figura 2 a linha cinza demonstra os limites da inundação nos períodos de cheia e verifica-se que os pontos de coleta, apesar de estarem em cotas altimétricas mais elevadas, estão inseridos na área de inundação. A paisagem apresenta variações entre a cobertura florestal primária e áreas agrícolas, desmatadas há algum tempo para dar espaço à criação de gado, posteriormente ao cultivo de malta, tomate, entre outros. Durante a coleta de solo a área agrícola estava cultivada com mandioca.

Dados meteorológicos

Para as áreas de planície aluvial de rio de água negra e barrenta, a série temporal de pluviosidade, temperatura mínima e máxima englobando os dois períodos amostrais foram extraídos do Sistema de Informações HidroMeteorológicas (SIM) do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), especificamente das estações meteorológica automática de Manaus – AM (Tabela 1)

Tabela 1. Localização das estações meteorológicas automáticas de Manaus-AM, indicando as coordenadas geográficas, o período de coleta dos dados e da data de início de operação.

Local	Localização		Período de coleta dos dados		Data do início de operação da estação
	Latitude	Longitude	Início	Fim	
Manaus - AM	-3.103682°	-60.015461°	01.08.2017	31.07.2018	09/05/2000

A estação pluviométrica localizada em Manaus – AM permite tratar dos dados meteorológicos para as áreas de estudo nas planícies aluviais de rios de águas negra e barrenta. Esta estação registrou temperaturas mínimas entre 24,24 °C e 26,25 °C, e as máximas entre 31,45°C e 35,44°C para o período de agosto de 2017 a Julho de 2018. Os menores índices pluviométricos correspondem aos meses de agosto de 2017, julho de 2018 e outubro de 2017 (20,1, 54,1 e 148,1 mm, respectivamente), já os meses de dezembro de 2017 e fevereiro e abril de 2018 apresentaram os maiores índices (509,90 mm, 457,5 mm e 366,80 mm, respectivamente).

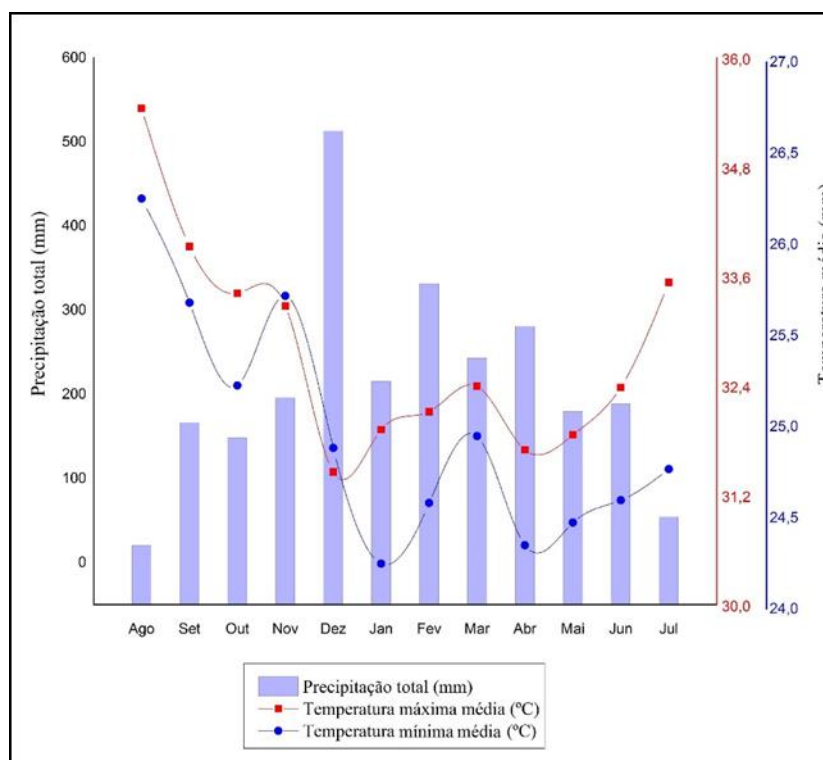


Figura 2. Comportamento sazonal da precipitação total, temperatura máxima média e temperatura média mínima na estação pluviométrica de Manaus - AM.

III – Área de estudo na planície aluvial do Rio Tocantins

A área de estudo na planície aluvial do rio Tocantins está localizada a sudoeste de Belém (-2°40'51''S e -49°39'05''O). A região apresenta elevação parecida com a da área descrita anteriormente, onde os pontos de coleta estão localizados entre as cotas altimétricas que variam de 10 a 30 m, com relação ao nível do mar. O clima, assim como o regime de chuvas e, conseqüentemente, as cheias, são característicos do clima Af (Tropical). A precipitação média histórica é de 2611±695 mm (1987-2016). A linha de inundação por sua vez é a menor entre as três áreas e isso se dá pela dinâmica do rio Tocantins, com sua vazão de 11145 m³/s, e devido às variações do relevo, foi esculpindo a paisagem de outra maneira, construindo pequenos canais ao longo do seu percurso e ilhas isoladas em meio ao seu leito, que ficam praticamente submersas durante as épocas de cheia. Essa área apresenta maior diversidade no relevo e, conseqüentemente, na declividade nesta região. O uso e cobertura do solo é marcado principalmente pela presença de floresta primária e predominância de sistemas agroflorestais, onde aparece o cultivo de cacau, como foi verificado em campo. Essas pequenas áreas se tornam imperceptíveis ao sensoriamento remoto, devido a densidade da cobertura florestal e, por isso, especificamente para esses pontos amostrais foi feita verificação da verdade terrestre em campo, afim de representar essas áreas na Figura 4, que demonstra o uso e cobertura do solo.

Dados meteorológicos

Para as áreas de planície aluvial de rio de água clara, a série temporal de pluviosidade, temperatura mínima e máxima englobando os dois períodos amostrais foram extraídos do Sistema de Informações HidroMeteorológicas (SIM) do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), especificamente das estações meteorológica automática de Cametá-PA (Tabela 2).

Tabela 2. Localização das estações meteorológicas automáticas de Cametá-PA, indicando as coordenadas geográficas, o período de coleta dos dados e da data de início de operação.

Local	Localização		Período de coleta dos dados		Data do início de operação da estação
	Latitude	Longitude	Início	Fim	
Cametá-PA	-2.239653°	-49.499827°	01/08/2017	31/07/2018	20/06/2008

A estação meteorológica próxima a área de estudo na planície aluvial de rio de água clara (Figura 3) registrou temperaturas médias mensais entre 24,40 e 35,44 °C. Os menores índices pluviométricos correspondem aos meses de novembro, agosto e outubro de 2017 (0,2 mm, 18,60 mm e 37,60 mm, respectivamente). Em contrapartida os meses de fevereiro, abril e maio de 2018 apresentaram os maiores índices pluviométricos (509,90 mm, 457,5 mm e 366,80 mm, respectivamente).

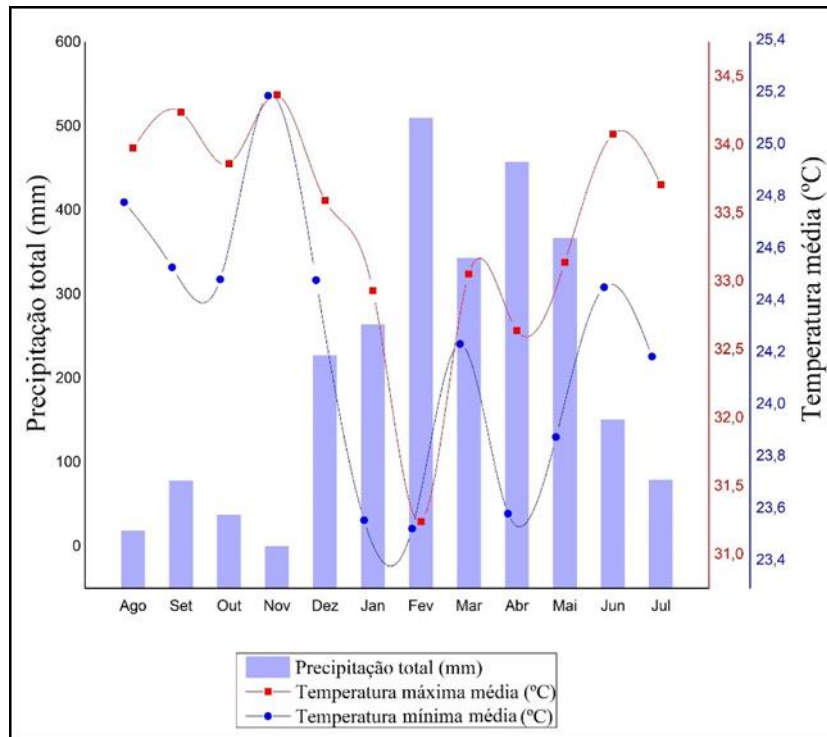
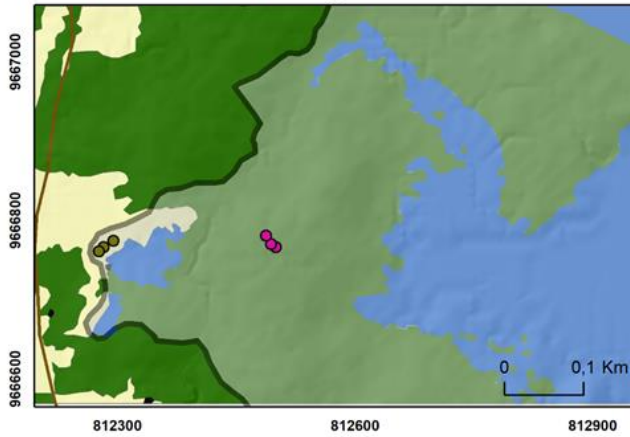


Figura 3. Comportamento sazonal da precipitação total, temperatura máxima média e temperatura média mínima na estação pluviométrica de Baião - PA.

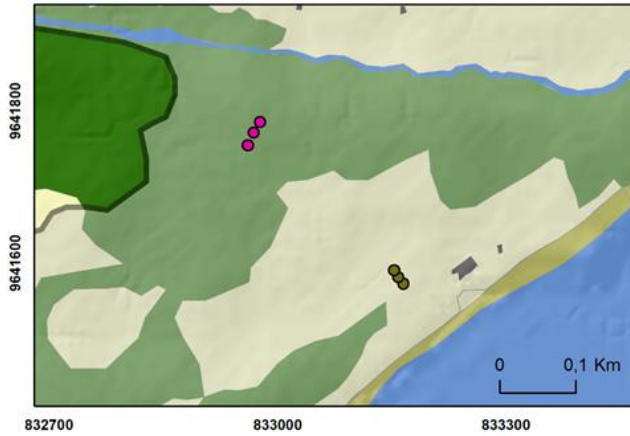
I - Uso e Cobertura - Rio Negro



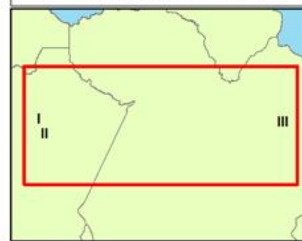
Localização na América do Sul



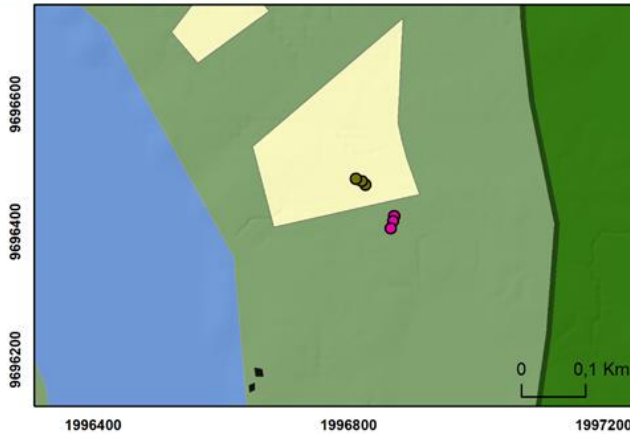
II - Uso e Cobertura - Rio Solimões



Localização no Brasil



III - Uso e Cobertura - Rio Tocantins



- Pontos em Sistema Agrícola Tradicional
- Pontos em Floresta
- Estrada de Terra
- Linha de Possível Inundação

Classes de Uso e Cobertura

- Sistema Agrícola Tradicional
- Área Construída
- Praia (areia)
- Floresta
- Água



Fontes:
Imagens Google Earth, 2018.
IBGE, 2018.

Figura 4. Uso e cobertura nas áreas I, II e III. Cores atenuadas indicam área de inundação.

5.2 AMOSTRAGEM DE SOLO

Amostras de solo foram coletadas no período seco (outubro de 2017) e chuvoso (maio de 2018) em sítios de amostragem sob floresta nativa primária e sistema agrícola tradicional nas planícies aluviais dos rios Negro (águas negras), Solimões (águas barrentas) e Tocantins (águas claras). Em cada sítio de amostragem foram definidos três pontos, identificados como 'Ponto 1 – P1', 'Ponto 2 – P2' e 'Ponto 3 – P3', com distância geográfica de 14 m entre si (Tabela 3). A partir de cada um dos três pontos amostrais foram coletadas amostras de solo na camada de 0 a 30 cm de profundidade a partir da superfície do solo, a qual foi dividida em duas seções (0-15 e 15-30 cm de profundidade) e colocadas em sacos plásticos para as análises físicas e químicas. A coleta do solo no período seco foi feita utilizando tubo de policloreto de vinila (PVC) (5 cm de diâmetro) com extremidade chanfrada, previamente esterilizado e apropriado para seccionamento da camada de solo, desenvolvido no âmbito deste projeto de pesquisa (Figura 5).



Figura 5. Amostrador de solo composto por tubo e conexão roscável em policloreto de vinila (PVC) utilizado para coleta de amostras de solo no período seco. A. Tubo e conexão roscável; B. Amostrador parcialmente penetrado no solo; C. Partes do amostrador desconectadas após coleta e seccionamento do perfil do solo.

No período chuvoso, em que os sítios amostrais encontravam-se inundados, o solo de fundo nos sítios de amostragem sob floresta nativa e sistema agrícola tradicional nas planícies

aluviais dos rios de águas negra, barrenta e clara foi coletado com o uso de um amostrador de fundo, consistindo basicamente de um tubo coletor de policarbonato (5 cm de diâmetro) com extremidade chanfrada, válvula de retenção e aparato de extrusão de seções do perfil de solo (Figura 6).

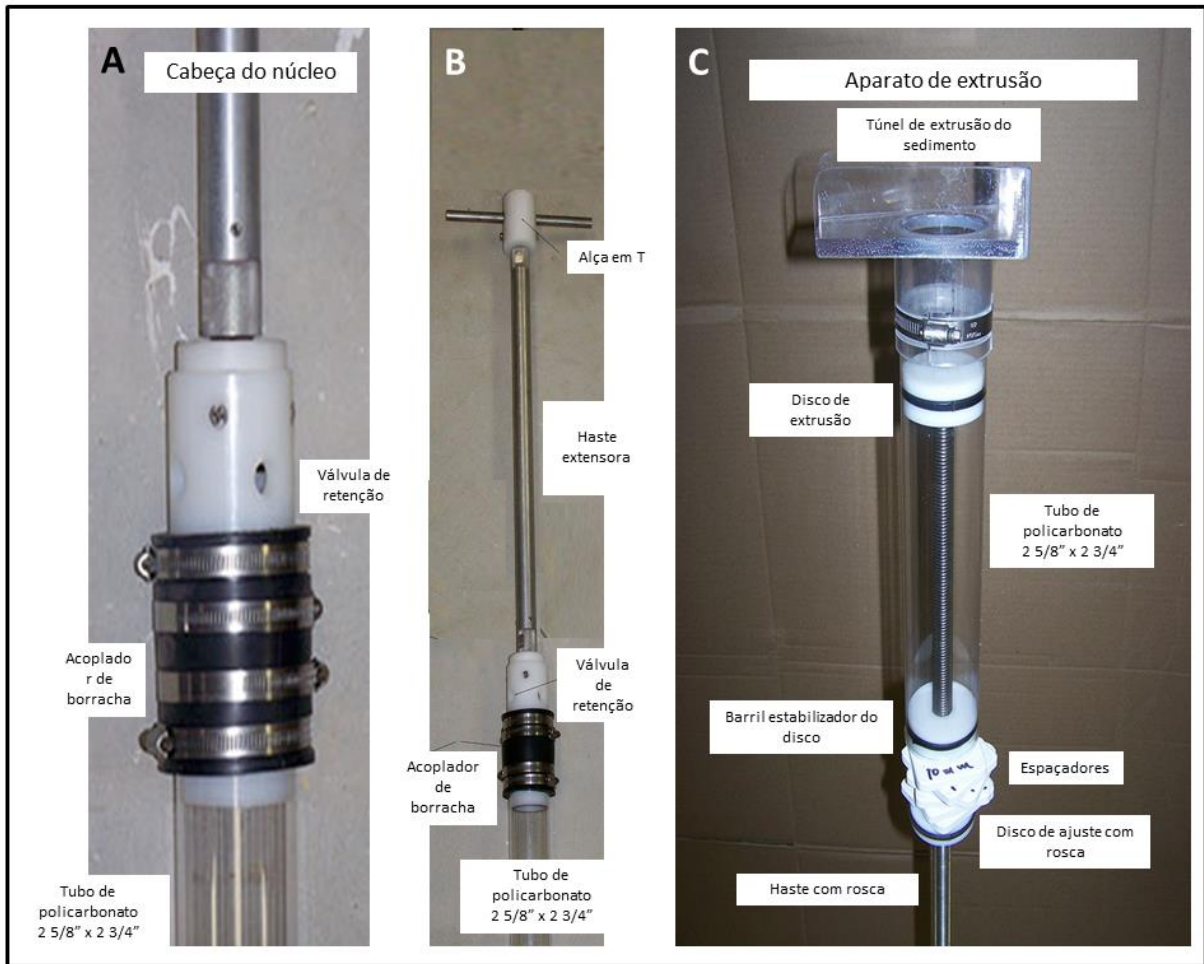


Figura 6. Amostrador de fundo utilizado para coleta de amostras de solo no período chuvoso. A. Cabeça do núcleo com válvula de retenção; B. Alça em T e haste extensora acopladas à cabeça do núcleo; C. Aparato de extrusão.

Uma subamostra de 3 g de solo foi retirada de cada uma das duas seções (profundidades) (0-15 cm e 15-30 cm) da camada de 0 a 30 cm, após homogeneização do solo por profundidade em cada ponto amostral. As subamostras de solo foram preservadas em *LifeGuard Soil Preservation Solution* (Quiagen, Hilden, Germany) para estabilização dos ácidos nucleicos, acondicionadas imediatamente em gelo até transporte e armazenamento a -20 °C. O solo remanescente de cada seção da camada foi mantido a temperatura ambiente e utilizado para análises físicas e químicas. No total foram coletadas 36 amostras de solo em

cada período de amostragem (seco e chuvoso) (3 áreas x 2 sítios x 3 pontos amostrais x 2 profundidades).

Tabela 3. Características das três áreas de estudo nas planícies aluviais dos rios Negro, Solimões e Tocantins na Amazônia brasileira.

Planície aluvial	Cobertura da terra	Pontos amostrais	Latitude/longitude	Notas de campo	
Rio Negro	floresta	RNF.P1	-3°0'40.28"S/-60°11'20.12"W	Floresta primária densa periodicamente inundável com sub-bosque ralo	
		RNF.P2	-3°0'40.15"S/-60°11'20.32"W		
		RNF.P3	-3°0'39.79"S/-60°11'20.51"W		
	sistema agrícola tradicional	RNA.P1	-3°0'40.03"S/-60°11'26.76"W	Área periodicamente inundada e cultivada com cana-de-açúcar, rambutã, melancia, quiabo, maxixe, jerimum e feijão.	
		RNA.P2	-3°0'40.29"S/-60°11'27.15"W		
		RNA.P3	-3°0'40.46"S/-60°11'27.34"W		
	Rio Solimões	floresta	RSF.P1	-3°14'11.98"S/-60°0'15.80"W	Floresta primária densa periodicamente inundável com sub-bosque ralo
			RSF.P2	-3°14'11.43"S/-60°0'15.55"W	
			RSF.P3	-3°14'10.97"S/-60°0'15.28"W	
sistema agrícola tradicional		RSA.P1	-3°14'17.85"S/-60°0'9.18"W	Área periodicamente inundada convertida em pasto há 20 anos, e há 8 anos cultivada com malva, tomate, mandioca, melancia, jerimum e milho.	
		RSA.P2	-3°14'17.59"S/-60°0'9.38"W		
		RSA.P3	-3°14'17.30"S/-60°0'9.57"W		
Rio Tocantins		floresta	RTF.P1	-2°40'19.06"S/-49°39'21.75"W	Floresta primária densa periodicamente inundável com sub-bosque ralo
			RTF.P2	-2°40'19.32"S/-49°39'21.78"W	
			RTF.P3	-2°40'19.68"S/-49°39'21.91"W	
	sistema agrícola tradicional	RTA.P1	-2°40'17.53"S/-49°39'23.18"W	Área periodicamente inundada cultivada com cacau. Presença de espécies arbóreas nativas em meio à maioria de plantas de cacau.	
		RTA.P2	-2°40'17.37"S/-49°39'23.37"W		
		RTA.P3	-2°40'17.24"S/-49°39'23.66"W		

5.3 ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS DO SOLO

A seguir estão descritas as metodologias utilizadas para a determinação de diferentes fatores físicos e químicos a partir das amostras de solo coletadas nos períodos de seca e inundação nos sítios florestais e sob sistema agrícola tradicional

5.3.1 pH

A determinação do pH do solo foi feita em água e CaCl_2 como descrito no Manual de análises químicas do solo, plantas e fertilizantes (SILVA, 2009). Primeiramente, a medição eletroquímica da concentração efetiva de íons H^+ na solução de solo foi feita por meio de eletrodo combinado, imerso em suspensão solo/água na proporção de 1:2,5. Para tanto, 10 cm^3 de amostra de solo (fração menor que 2 mm) foram colocados em um erlenmeyer, numerado, de 125 mL. Adicionou-se 25 mL de água deionizada, agitou-se a mistura com bastão individual, e em seguida a mistura foi deixada em repouso por uma hora. Em seguida, agitou-se novamente cada mistura com bastão de vidro, e mergulhou-se o eletrodo na suspensão homogeneizada e, por fim, efetuou-se a leitura do pH com o uso de aparelho.

A medição da concentração efetiva de íons H^+ na solução de solo também foi feita por meio de eletrodo combinado imerso em suspensão-solo: solução de CaCl_2 0,01 mol L^{-1} na proporção de 1:2,5. Para tanto, colocou-se 10 cm^3 de amostra de solo (fração menor que 2 mm) em erlenmeyer, numerado, de 125 mL e adicionou-se 25 mL de solução de CaCl_2 0,01 mol L^{-1} . Agitou-se a mistura com auxílio de uma mesa agitadora e a mesma ficou em repouso por 15 min para molhamento completo da amostra. A mistura foi agitada novamente na mesa e, deixada em repouso por 30 min, necessário para o equilíbrio e a decantação da suspensão. Após calibração do aparelho com as soluções padrão de pH 4,00 e pH 7,00, efetuou-se a leitura do pH em CaCl_2 0,01 mol L^{-1} , mergulhando o eletrodo na suspensão homogeneizada, sem nova agitação.

5.3.2 Umidade

A umidade do solo foi determinada pelo método gravimétrico (SILVA, 2009). Para tanto, 10 g de cada amostra de solo foram secos em estufa a 105 °C e, posteriormente, pesados para a determinação do peso seco para o cálculo da porcentagem de umidade das amostras.

5.3.3 Carbono Orgânico Dissolvido (COD)

Para a determinação da concentração de carbono orgânico dissolvido em água (COD), 1 g de cada amostra de solo foi adicionada a um erlenmeyer de 150 mL, que permaneceram sob agitação com 100 mL de água ultrapura ($0,055 \mu\text{S cm}^{-1}$) a 142 rpm durante 24 horas. O sobrenadante foi centrifugado (6.000 rpm), filtrado em membranas de fibra de vidro (malha $< 0,7 \mu\text{m}$) previamente calcinadas a $500 \text{ }^\circ\text{C}$, e analisado quanto ao teor de COD por analisador Shimadzu TOC-5000A (Shimadzu, Columbia, MD, EUA) com infra-vermelho não dispersivo, após purga com HCl 2N.

5.3.4 Carbono e Nitrogênio Totais

Os teores totais de carbono (C) e nitrogênio (N) foram determinados por combustão seca pelo analisador elementar CHNS/O (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA) a partir das amostras de solo. A determinação foi feita utilizando 5-7 mg de amostras de solo seco ao ar e peneirado em malha de 0,150 mm (100 mesh).

5.3.5 Sulfato

A extração e determinação de sulfato nas amostras de solo coletadas nos períodos seco e chuvoso, respectivamente, nas áreas de estudo foram feitas utilizando solução extratora de $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ $0,01 \text{ mol/L}$, carvão ativado e 10 cm^3 de terra de acordo com Cantarella & Prochnow (2001). Brevemente, a mistura solo e solução extratora foi agitada por 30 min, seguida de filtragem em papel filtro (Whatman n° 42). Uma alíquota de 10 mL do extrato obtido foi transferida para um frasco plástico e agitada juntamente com 1 mL da solução-semente ácida de S-SO_2 20mg.L^{-1} e 0,5 g de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Após 2 a 8 min da dissolução dos cristais de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 420 nm, utilizando solução com diferentes concentrações de enxofre (S) para preparo da curva-padrão.

5.3.6 Nitrato e Amônio

5.3.6.1. Extração de Nitrato e Amônio

Em erlenmeyers de 50 mL foram adicionadas amostras de 10 g de solo fresco, 50 mL de KCl 2 mols.L⁻¹ (Merck) e 2,5 mL de carvão ativado (Darco 100 mesh). A mistura foi submetida à agitação durante 30 min e logo em seguida a suspensão foi filtrada em papel filtro quantitativo “faixa azul” (Whatman n° 42) para obtenção dos extratos. Os extratos foram armazenados em tubos tipo falcon de 50 mL para posteriores análises. Para cada ensaio, foi feito uma amostra denominada de branco, em que foi adicionada somente a solução de KCl 2 mol L⁻¹ e o carvão ativado.

5.3.6.2 Quantificação do Nitrato

Para a quantificação do nitrato as soluções foram colocadas em determinados poços da placa para leitura em espectrofotômetro (Synergy HTX Multi-Mode Reader, BioTek, Vermont, USA) para obtenção da curva padrão e nos demais poços foram colocados 200 µL do extrato obtido para cada amostra. Sendo que a quantificação foi realizada baseada em métodos espectrofotométricos como descrito em Norman et al. (1985).

5.3.6.3 Quantificação do Amônio

Para a quantificação do amônio foram preparadas duas soluções, a solução 1 (0,5 g de hidróxido de sódio + 1 mL de hipoclorito a 2 %) e a solução 2 (10 g de salicilato de sódio + 0,04 g de nitroferriicianida de sódio desidratada + 0,5 g de hidróxido de sódio).

As soluções foram colocadas em placas para leitura em espectrofotômetro (Synergy HTX Multi-Mode Reader, BioTek, Vermont, USA) para obtenção da curva padrão e nos demais poços foram colocados 100 µL do extrato obtido para cada amostra somados a 50 µL da solução 2 e 50 µL da solução 1. Sendo que a quantificação foi realizada baseada em métodos espectrofotométricos como descrito em Krom (1980).

5.3.7 Fósforo

Para a determinação do teor de fósforo a partir das amostras de solo foram executadas três etapas: digestão, centrifugação e espectrometria. A digestão foi executada utilizando micro-ondas Multiwave PRO – Anton Paar. Neste, foram colocados frascos contendo 0,5 g de solo seco e macerado, 9 mL de HNO₃ (65%) e 3 mL de HCl (37 %). Foi seguido o protocolo EPA 3051A (USEPA, 2007) para a configuração da digestão no equipamento. Logo após a digestão, a solução foi transferida para um tubo falcon de 20 mL, cuidando para que o solo não fosse transferido juntamente com a solução. Na etapa de centrifugação, os tubos contendo a solução foram colocados em uma centrífuga High Speed Refrigerated Centrifuge – Heal Force a 2000 rpm por 10 min. Após a centrifugação a solução sobrenadante foi avolumada com água destilada em um balão volumétrico de 50 mL, ajustando-se ao menisco, e transferida para tubo falcon de 50 mL. Na etapa de espectrometria, foi utilizado o 4200 MP-AES (Agilent Technologies) para a realização das leituras das amostras por espectrometria de emissão atômica com plasma induzido por micro-ondas com base em um plasma de nitrogênio.

5.3.8 Análise Granulométrica

Para a análise granulométrica dos solos foi utilizado o método da pipeta de Day (1965) adaptado por Medina e Grohmann (1962). A análise consistiu na transferência de 10 g da amostra de solo (seco ao ar e peneirado em malha de 2 mm) e 50 ml de solução dispersante (hidróxido de sódio e hexametáfosfato de sódio) para um Erlenmeyer (125 ml), seguida da agitação por 16 h em mesa agitadora a 240 rpm. Após a agitação, a solução foi transferida para uma proveta de 500 mL passando por uma peneira de malha 0,053 mm até completar o volume da proveta. O material retido na peneira foi lavado e transferido para uma lata, de peso conhecido, para determinação da areia total na amostra de solo. A suspensão foi agitada por trinta segundos com um bastão contendo na extremidade inferior um êmbolo de borracha com diâmetro um pouco menor que o da proveta, com movimento da boca para o fundo e vice-versa. Transcorrido o tempo necessário para a sedimentação da argila, seguindo a lei de Stokes, foi introduzida uma pipeta de 10 mL a uma profundidade de 5 cm para amostragem de argila, com sucção contínua, para evitar turbilhonamento. As alíquotas foram transferidas para cápsulas de porcelana, de peso conhecido (com aproximação de 0,0001 g) e colocadas em

estufa a 105 °C. O mesmo procedimento foi realizado com uma prova em branco, contendo a solução dispersante e água destilada. As cápsulas foram retiradas da estufa e pesadas em balança com precisão de décimo milésimo de grama, para obter o peso da argila + dispersante (A+D).

Foram utilizadas as seguintes equações para a realização dos cálculos das partículas:

$$\text{Argila (\%)} = [\text{peso da argila + dispersante (A+D)} - \text{peso do dispersante (D)}] \times 500$$

$$\text{Areia total (\%)} = [\text{peso da areia} \times 100] \div [\text{peso da amostra}]$$

$$\text{Silte (\%)} = [100 - \text{Argila} - \text{Areia total}]$$

5.4 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO TAXONÔMICA DE COMUNIDADES METANOGÊNICAS E METANOTRÓFICAS

5.4.1 Extração do RNA Genômico do Solo e Síntese de cDNA

A extração de RNA total das 72 amostras de solo coletadas nas campanhas de campo realizadas nos períodos seco e chuvoso (36 amostras de solo em cada período: 3 áreas x 2 sítios x 3 pontos amostrais x 2 profundidades) nas três diferentes áreas amostrais foi feita com o *RNeasy PowerSoil Total RNA Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante. Foram realizadas duplicatas de extrações de RNA a partir de cada amostra de solo, as quais compuseram um *pool* para cada amostra após a análise da qualidade e quantidade do RNA utilizando espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Nanodrop ND-1000, NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) com densidade ótica de 230, 260, 280 e 320 nm. As amostras de RNA foram preservadas a -80 °C até o uso. Síntese de cDNA foi feita a partir do mRNA de cada amostra utilizando o *QuantiNova Reverse Transcription Kit* (Quiagen, Hilden, Alemanha), com remoção integrada da contaminação do DNA genômico.

5.4.2 Preparo de Bibliotecas e Sequenciamento de Amplicons do Gene 16S rRNA de *Archaea* e *Bacteria* em Plataforma MiSeq Illumina

As bibliotecas de *amplicon* foram preparadas de acordo com o protocolo *16S*

Metagenomic Sequencing Library Preparation (<https://support.illumina.com>), utilizando o cDNA como molde nas reações de amplificação e *primers* específicos para o gene 16S rRNA de *Archaea* e *Bacteria* total. O par de *primers* S-D-Arch-0349-a-S-17 (5'-GYGCASCAGKCGMGAAW-3')/S-D-Arch-0519-a-A-16 (5'-TTACCGCGGCKGCTG-3') (Klindworth et al., 2013) foi utilizado para obter amplicons de aproximadamente 185 pb da região V3 do gene 16S rRNA de *Archaea*. Um fragmento de aproximadamente 390 pb da região V4 do gene 16S rRNA de *Bacteria* foi amplificado utilizando o par de *primers* 515FB (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') (PARADA et al., 2016)/806RB (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAA-3') (APPRILL et al., 2015). Os *amplicons* obtidos para o gene 16S rRNA de *Archaea* e *Bacteria* foram reunidos para uma única corrida de sequenciamento por período de coleta (36 *amplicons* de *Archaea* e 36 *amplicons* de *Bacteria*) em um *MiSeq Personal Sequencing System Illumina* (Illumina, San Diego, CA, EUA) utilizando o *MiSeq Reagent Kit v.3* (600 ciclos; Illumina, San Diego, CA, EUA) com leituras pareadas de 250 bp (2 x 251) no Centro de Genômica Funcional da Universidade de São Paulo, Campus Piracicaba.

Foi aplicada uma abordagem de PCR em dois passos que permitiu a construção de uma biblioteca de sequenciamento personalizada de genes alvos de várias amostras (Herbold et al., 2015). No primeiro passo foi introduzido uma sequência *head* universal de 16 pb (5'-HEADTARGETPRIMER-3'); sendo o *amplicon* marcado no segundo passo da PCR com um *primer* que anela apenas à sequência *head*, e também codifica um “código de barras” (*barcode*) de 8 pb (5'-BARCODE-HEAD-3'). Posteriormente, a biblioteca de *amplicons* múltiplos agrupada foi adaptada à plataforma MiSeq Illumina, introduzindo os adaptadores de sequenciamento adequados durante a preparação da biblioteca.

Foram obtidas sequências do gene 16S rRNA de *Archaea* e *Bacteria* referente às 36 amostras de cDNA obtidas a partir das amostras de solo coletadas no período seco e 36 amostras de cDNA obtidas a partir das amostras de solo coletadas no período chuvoso.

5.4.3 Processamento e Análise de Sequências do Gene 16S rRNA de Membros Ativos da Comunidade Metanogênica e Metanotrófica

Todas as sequências do gene 16S rRNA de membros ativos da comunidade de *Archaea* e *Bacteria* foram processadas e analisadas utilizando QIIME v.1.9.1 (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) (CAPORASO, 2010). Brevemente, as sequências *forward* e *reverse*

contidas nos arquivos *fastq* foram unidas utilizando o algoritmo UPARSE (EDGAR, 2013). As sequências que não se uniram com este método por alguma razão foram unidas utilizando VSEARCH v.2.10.4 definindo 2 pb como comprimento mínimo para sobreposição. Após a união das sequências *forward* e *reverse* as mesmas foram processadas por: (1) trimagem de sequências com baixa qualidade, (2) remoção de sequências artificiais tais como *primers* e adaptadores, (3) deleção de sequências com tamanho menor que 100 pb (*Archaea*) e 200 pb (*Bacteria*), e (4) deleção de sequências com bases ambíguas. A detecção e deleção de sequências quiméricas foram feitas utilizando o algoritmo VSEARCH (EDGAR, 2010). Após remoção das sequências quiméricas, as sequências processadas foram alinhadas utilizando PyNAST (CAPORASO et al., 2010) com o banco de dados de referência SILVA (<https://www.arb-silva.de>) e classificadas taxonomicamente a partir da definição de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO) a >97 % de similaridade.

O número de sequências em cada biblioteca foi normalizado utilizando a tabela de UTO (2.500 sequências para *Archaea* e 20.000 sequências para *Bacteria*) e o método da rarefação. Em seguida, as tabelas de UTO obtidas para as sequências do gene 16S rRNA de *Archaea* e *Bacteria* foram utilizadas separadamente para filtragem da comunidade metanogênica e metanotrófica com o uso do comando ‘`filter_taxa_from_OTU_table.py`’ no QIIME v.1.9.1. O script foi seguido utilizando a metodologia descrita em Pylro (2014). O número de sequências do gene 16S rRNA contido na tabela de UTO filtrada para as comunidades metanogênica e metanotrófica foi utilizado para o cálculo da abundância relativa dos membros ativos de cada comunidade.

5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

5.5.1 Teste de Tukey

A significância estatística das diferenças em fatores físicos e químicos do solo entre os períodos sazonais (seco *vs.* chuvoso), profundidade de coleta da amostra de solo (0-15 cm *vs.* 15-30 cm) e uso da terra (floresta *vs.* sistema agrícola tradicional) foi avaliada com o teste Tukey’s HSD no programa R (version 3.2.2; R Foundation for Statistical Computing) separadamente por planície aluvial.

5.5.2 Cálculo de métricas ecológicas

Métricas ecológicas foram calculadas para as comunidades metanogênicas e metanotróficas utilizando o programa PAST (HAMMER; HARPTER; RYAN, 2001). A estimativa de riqueza de UTO foi obtida utilizando a medida ‘Chao1’. A equitatividade ao nível da comunidade foi calculada de acordo com a métrica de ‘Pielou’. A função ‘Shannon-Wiener’ foi utilizada para obter a diversidade ao nível de cada comunidade.

5.5.3 Heatmaps da análise de agrupamento hierárquico

Heatmaps da análise de agrupamento hierárquico foram construídos utilizando dados de abundância relativa para a comunidade metanogênica e metanotrófica, o programa R (version 3.2.2; R Foundation for Statistical Computing) e os pacotes ‘gplots’ (v.3.0.1) (WARNES et al., 2015), ‘heatplus’ (v.2.26.0) (PLONER, 2014), ‘RColorBrewer’ (v.1.1-2) (NEUWIRTH, 2014), e ‘vegan’ (v.2.5-3) (OKSANEN et al., 2016), utilizando o coeficiente de distância de BrayCurtis.

5.5.3 Análise de Similaridade

Análise de similaridade (One-way ANOSIM) foi feita com o programa Primer v.6 (CLARKE & GORLEY, 2006) utilizando a medida de Bray-Curtis para testar a diferença entre as amostras em função dos períodos sazonais (seco vs. chuvoso), profundidade de coleta da amostra de solo (0-15 cm vs. 15-30 cm) e uso da terra (floresta vs. sistema agrícola tradicional).

5.5.4 Análise de Coordenadas Principais (PCoA)

A distância métrica Weighted UniFrac (LOZUPONE; KNIGHT, 2005) foi utilizada para avaliar separadamente a aproximação filogenética entre a comunidade metanogênica e a comunidade metanotrófica nas amostras sequenciadas. Para mostrar essa aproximação realizamos uma análise de coordenadas principais (PCoA) com os pacotes ‘phyloseq’

(v.1.24.2) (MCMURDIE; HOLMES, 2013) e ‘gplots’ (v.3.0.1) (WARNES et al., 2015) no programa R (v.3.2.2; R Foundation for Statistical Computing). Para tanto, uma árvore filogenética foi construída com base nas UTOs para o Domínio *Archaea* e outra com base nas UTOs pertencentes ao Domínio *Bacteria*, no software QIIME v.1.9.1 (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*). As tabelas de UTOs filtradas para metanogênicas e metanotróficas foram convertidas para o formato .biom e carregadas no programa estatístico R, separadamente, e foram unidas através do pacote ‘phyloseq’ com as árvores filogenéticas. O script foi executado separadamente para a comunidade ativa metanogênica e para a comunidade ativa metanotrófica.

5.5.5 Análise de Redundância (RDA)

A explícita relação entre as comunidades metanogênicas e metanotróficas e os fatores físicos e químicos do solo foi avaliada utilizando análise de redundância (RDA) feita com o programa CANOCO v.5 (BRAAK; SMILAUER, 2012).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DO SOLO

Na Tabela 4 são apresentadas características físicas e químicas das amostras de solo coletadas nas camadas de 0-15 cm e 15-30 cm, no período seco e chuvoso em sítios florestais e em sistemas agrícolas tradicionais em planícies aluviais de rios de águas negra, barrenta e clara da Amazônia. Os valores mostrados nessa tabela indicam que houve diferença estatística no teor de umidade residual nos solos provenientes das três planícies aluviais quando comparados os períodos sazonais dentro de cada uma delas. No período seco, as amostras de solo provenientes de planícies aluviais de rios de águas barrenta e clara apresentaram maior teor de umidade residual em relação à planície aluvial de água negra, podendo-se atribuir ao maior teor de areia na planície aluvial de rio de água negra em relação às planícies aluviais de águas barrenta e clara (Tabela 4), onde há predominância de macroporos e menor retenção de água (REINERT, 2006).

Os resultados das análises químicas do solo mostraram diferença estatística entre os valores de pH dos solos de planícies aluviais de rios de águas barrenta, negra e clara na época seca (Tabela 4). Sendo que, o valor de pH de solos de planícies aluviais de rios de água barrenta foi maior do que de rios de águas negra e clara. Por sua vez, o valor de pH do solo da planície aluvial do rio de água negra foi maior do que os encontrados para os solos de planície aluvial de rio de água clara. Na época de inundação, o valor de pH de solos provenientes de planície aluvial de rio de água barrenta foi maior do que de rios de águas negra e clara. Por sua vez, o pH do solo proveniente de planície aluvial de rio de água negra não diferiu estatisticamente daquele de solo proveniente de planície aluvial de rio de água clara. Junk et al. (2011) afirmam que águas barrentas têm pH quase neutro e concentrações relativamente altas de sólidos dissolvidos (principalmente metais alcalinos e carbonatos) devido aos processos erosivos que vêm dos Andes que estão desgastando este relevo jovem rico em bases que se depositam nessas planícies (SILVA, 2008), o que ajuda a explicar como as características físicas e químicas da água podem promover um valor de pH mais alto nestes solos em relação aos solos provenientes de outras planícies aluviais, através do carreamento de solos dispostos nessas planícies de inundação.

A concentração de carbono orgânico dissolvido (COD) nos solos provenientes da planície aluvial de rio de água negra foi maior em relação ao solo coletado em planície aluvial

de rio de água barrenta nos dois períodos sazonais (seco e chuvoso). O solo de planície aluvial de rio de água clara apresentou maior teor de COD em relação aos solos provenientes de planície aluvial de água barrenta nos dois períodos sazonais. No período de inundação (chuvoso), o solo proveniente de planície aluvial do rio de água negra obteve a maior concentração de COD, apresentando diferença estatística em relação ao solo coletado em planícies aluviais de rios de águas barrenta e clara. (Tabela 4). Estes resultados podem ser atribuídos ao incremento de matéria orgânica (LEENHEER; SANTOS, 1980), principalmente em camada superficial, observado no local de coleta, tanto na planície aluvial de rio de água negra quanto na planície aluvial de água clara. Junk et al. (2011) afirmam ainda que a planície aluvial do rio Negro sofre com um estresse de inundação de longa duração, o que pode promover uma maior dissolução do carbono nessas áreas.

Os teores de carbono total, nitrogênio total e amônio não apresentaram diferença estatística entre os usos da terra, tipos de água ou períodos sazonais para as diferentes planícies aluviais estudadas. O nitrato apresentou uma grande redução no período chuvoso em todos os usos da terra, sendo este elemento muito utilizado como aceptor de elétrons para a oxidação do metano. E, os teores de sulfato foram diferentes entre solos provenientes da planície aluvial de rio de água barrenta quando comparados com solos provenientes de planícies aluviais de rios de águas negra e clara, nos dois períodos sazonais. O teor de sulfato em solos provenientes da planície aluvial de rio de água barrenta foi maior do que de rios de águas negra e clara. Por sua vez, o teor de sulfato em solos provenientes de planície aluvial de rio de água negra não diferiu estatisticamente daqueles encontrados em solos de planície aluvial de rio de água clara. A oxidação de CH₄ em ambientes anaeróbicos pode ser associada à redução de sulfato, nitrato ou nitrito (CALDWELL et al., 2008; ETTWIG et al., 2008). Islas-Lima et al. (2004) demonstraram que a oxidação anaeróbica do CH₄ também pode ser associada à desnitrificação.

Os teores de fósforo nos solos provenientes das três planícies aluviais variaram entre 0 e 543,21 mg.kg⁻¹, com o maior valor tendo sido determinado em solo da camada 0-15 cm sob sistema agrícola tradicional no período chuvoso na planície aluvial de água barrenta, (Tabela 4). De acordo com SANCHEZ e SALINAS (1981) os teores encontrados são classificados entre baixo e muito baixo, baseado numa faixa de concentração abaixo de 200 ppm, sendo essa deficiência uma característica típica de solos da América Tropical. É interessante notar que nas três planícies aluviais estudadas foram encontrados teores mais elevados de fósforo na camada de 0-15 cm em comparação com a camada de 15-30 cm. Isso se deve ao fato de que

do teor de fósforo encontrado, 60-80% é encontrado na matéria orgânica (VIEIRA,1987), predominante nas camadas superficiais do solo, sendo este elemento um fator limitante da produtividade na Amazônia.

Os teores de areia, silte e argila não diferiram entre as camadas de 0-15 cm e 15-30 cm nas amostras de solo coletadas nas planícies aluviais de rios de águas negra e clara. Contudo, diferença significativa no teor de silte foi mostrada para as comparações destas duas camadas em solo de sistema agrícola tradicional na planície aluvial de rio de água barrenta, no período chuvoso. Nas planícies aluviais de rios de águas negra e barrenta houve diferença significativa entre na comparação entre os sítios florestal e sistema agrícola tradicional com relação ao teor de areia e argila, na camada de 15 a 30cm. Ainda assim, a classe textural foi a mesma nos solos de sítios florestais e de sistema agrícola tradicional em planícies aluviais de rio de água barrenta, sendo classificado como um solo franco argilo siltoso em ambos os sítios de coleta. O solo proveniente de sítio florestal de planície aluvial de rio de água negra foi classificado como franco argilo arenoso, enquanto que em sistema agrícola tradicional o solo foi classificado como Franco arenoso. E solo proveniente de sítios florestal e de sistema agrícola tradicional em planície aluvial de rio de águas claras foram classificados como franco (CAMARGO *et al*, 1986). As diferenças na granulometria na comparação entre as três planícies aluviais de rios de águas negra, barrenta e clara responderam às diferenças encontradas no teor de umidade na mesma comparação. Onde um solo com características franco argilo arenosa e franco arenosa reteve menor umidade em comparação aos solos franco argilo siltoso e franco (REINERT, 2006).

Tabela 4. Características químicas e físicas das amostras de solo coletadas em sítios florestais (FLO) e em sistemas agrícolas tradicionais (SAT) em planícies aluviais (PA) de águas negra, barrenta e clara da Amazônia, nas camadas 0-15 cm e 15-30 cm em dois períodos sazonais (seco e chuvoso)

Fatores químicos e físicos	Profund. (cm)	Planície aluvial de águas negras				Planície aluvial de águas barrentas				Planície aluvial de águas claras				FLO vs SAT		PA vs PA	
		Seco		Chuvoso		Seco		Chuvoso		Seco		Chuvoso		Seco	Chuvoso	Seco	Chuvoso
		FLO	SAT	FLO	SAT	FLO	SAT	FLO	SAT	FLO	SAT	FLO	SAT				
Amônio (mg.Kg-1)	0-15	24,88±10,28	10,86± 5,81	77,69a±40,75	20,00a± 7,92	4,41b±1,91	8,44± 2,79	23,18aaa± 1,67	12,85ab±0,73	6,08± 2,85	13,00± 9,21	31,44±17,96	24,35a±5,28	p=0,99	p=0,12	RNxRS* p=0,03	RNxRS p=0,16
	15-30	8,70± 5,30	4,51± 1,90	6,21ba±1,11	1,71bb± 0,72	4,34±0,65	5,15± 2,11	4,38b± 2,69	2,89b±0,08	1,44b± 0,52	8,98± 9,32	3,41a± 0,50	8,22b± 5,23			RNxRT p=0,18	RNxRT p=0,41
Nitrato (mg.Kg-1)	0-15	2,73± 4,41	1,90a± 0,86	0,09± 0,16	0,00b± 0,00	0,66b±0,77	7,11aa±2,39	0,00± 0,00	0,00b±0,01	9,33aaa± 2,03	4,20ab± 1,52	0,25b± 0,20	0,07bb± 0,06	p=0,25	p=0,88	RTxRS p=0,43	RTxRS p=0,23
	15-30	0,65±0,45	1,15± 0,595	0,40±0,31	1,45a± 0,73	0,62b±0,76	7,99aa± 1,16	0,59±0,54	2,19b±1,58	1,25ba± 0,59	1,93± 1,49	0,17bb± 0,26	1,41aa± 0,71			RNxRS p=0,06	RNxRS p=0,6
Sulfato	0-15	0,29± 0,07	0,32± 0,05	0,32b± 0,03	0,32± 0,02	0,44± 0,26	0,68aa± 0,06	0,43± 0,08	0,43b± 0,04	0,51aaa± 0,02	0,38b± 0,04	0,35b± 0,04	0,31± 0,04	p=0,99	p=0,86	RNxRT* p=0,04	RNxRT p=0,96
	15-30	0,38± 0,10	0,29± 0,03	0,40a± 0,02	0,33± 0,04	0,43± 0,00	0,50b± 0,06	0,35± 0,07	0,44± 0,03	0,43ba± 0,04	0,36ab± 0,02	0,40± 0,10	0,25b± 0,04			RTxRS* p=0,95	RTxRS p=0,57
Fósforo (mg.Kg-1)	0-15	10,17bb±11,5	34,08a±6,06	157,76aa±38,51	111,36±64	478,2aa±13,44	446,36bb±10,33	458,79b±5,6	543,21aa±10,77	190,37±61,09	213,08±12,84	277,19a±68,5	247,04±89,37	p=0,61	p=0,74	RNxRS* p=0,00	RNxRS* p=0,00
	15-30	0,00b±0,00	19,21±6,39	94,33ba±8,93	47,75±38,73	365,06bbb±5,03	439,79ba±11,95	437,8ab±35,87	533,13aa±5,43	153,76±14,99	231,12±47,37	153,57b±32,48	215,74±38,81			RNxRT* p=0,00	RNxRT* p=0,00
Carbono total (%)	0-15	4,45a± 1,80	4,55a± 0,59	2,12a±0,64	0,96±0,64	1,35aa±0,10	1,12a±0,21	0,75b±0,25	0,86±0,35	2,05±1,04	1,37a±0,14	1,49±0,69	1,14±0,85	p=0,83	p=0,96	RTxRS* p=0,02	RTxRS* p=0,01
	15-30	1,70b± 0,63	2,46b± 0,13	0,66b±0,07	1,20±1,10	0,76ba±0,01	0,63b±0,08	0,56b± 0,15	0,52±0,02	0,77±0,36	1,01b±0,04	0,42±0,03	0,73±0,31			RNxRS* p=0,00	RNxRS* p=0,00
Carbono orgânico dissolvido (µM)	0-15	691,67b±140,83	506,67b±29,17	1289,17aaa±10	608,33aab±73,33	368,33b±12,5	409,17aa±19,17	342,5±92,5	266,67b±42,5	615,83±126,67	466,67a±55	691,67aa±156,67	322,5bb±63,33	p=0,94	* p=0,02	RNxRT p=0,93	RNxRT p=0,35
	15-30	446,67±65	500,83±75	505ba±21,67	341,67bb±5,83	357,5aa±4,17	380,83a±33,33	257,5bb±3,67	290ba±17,5	477,5a±63,33	448,33±49,17	335,83bb±40,83	358,33±119,17			RTxRS* p=0,00	RTxRS* p=0,02
Nitrogênio total (%)	0-15	0,52a± 0,12	0,43± 0,06	0,16a± 0,04	0,08±0,05	0,13aa±0,00	0,12a±0,02	0,09b±0,02	0,09±0,02	0,25±0,06	0,16±0,10	0,12± 0,05	0,10±0,05	p=0,84	p=0,98	RNxRS p=0,72	RNxRS p=0,23
	15-30	0,30b± 0,05	0,35± 0,03	0,07b± 0,008	0,098± 0,078	0,08b±0,00	0,07b±0,01	0,08±0,01	0,07±0,00	0,16b±0,03	0,17a±0,03	0,03b±0,004	0,08a±0,02			RNxRT p=0,85	RNxRT p=0,37
																RTxRS p=0,59	RTxRS p=0,91

Comparação 1. (a) Profundidade 1 vs. Profundidade 2 dentro da mesma planície aluvial (Profundidade)

Comparação 2. (a) FLO vs. FLO e SAT vs. SAT dentro de cada profundidade e planície aluvial. (Sazonalidade)

Comparação 3. (a) FLO vs. SAT dentro de cada período sazonal e planície aluvial. (Uso da terra)

(*) indica diferença estatística (p<0,05)

Tabela 4. Continuação

Fatores químicos e físicos	Profund. (cm)	Planície aluvial de águas negras				Planície aluvial de águas barrentas				Planície aluvial de águas claras				FLO vs SAT		PA vs PA	
		Seco		Chuvoso		Seco		Chuvoso		Seco		Chuvoso		Seco	Chuvoso	Seco	Chuvoso
		FLO	SAT	FLO	SAT	FLO	SAT	FLO	SAT	FLO	SAT	FLO	SAT				
Umidade residual(%)	0-15	4,88b± 2,18	1,98b±0,34	42,97a±12,04	30,78aa±5,16	4,60b±0,44	2,85ab±0,07	37,92aa ±0,20	32,99aab ±0,70	8,05b±5,24	6,09bb±1,16	33,74aa± 2,78	31,0a±3,75	p=0,98	p=0,30	RNxRS p=0,16	RNxRS p=0,21
	15-30	2,25b± 0,49	1,94b±0,20	24,14ba ±0,51	21,82bab ± 0,60	3,79ba ±0,11	2,40bbb ±0,32	34,7a± 2,54	30,06ba±1,53	3,26bb ±2,01	9,92aba ±0,72	22,89ba± 1,56	26,0a±9,43			RNxRT* p=0,00	RNxRT p=0,67
pH (CaCl2)	0-15	3,77b ± 0,14	4,05ba ± 0,08	3,79±0,22	4,42± 0,35	4,15bb±0,05	4,08bb±0,04	4,58a± 0,25	4,43a±0,06	3,65bb ±0,01	3,97aa ±0,04	3,75ab ± 0,01	4,08a ±0,09	p=0,35	p=0,28	RNxRS* p=0,01	RNxRS* p=0,00
	15-30	3,98b ± 0,08	4,29aa ± 0,10	3,99b ±0,07	4,27a ± 0,07	4,32a±0,05	4,31ab± 0,03	4,72± 0,27	4,50a±0,10	3,67bb ±0,06	3,80ba ±0,04	3,85a±0,09	4,05±0,20			RNxRT* p=0,00	RNxRT p=0,08
Relação C:N	0-15	11,32±0,86	12,59±0,68	12,75a±1,01	10,83±1,08	10,75aaa ±0,68	9,62ab ±0,12	7,81b±1,22	9,12±1,36	11,54a ±0,5	10,14b ±0,4	12,52±0,48	10,17±2,76	p=0,81	p=0,38	RNxRS* p=0,00	RNxRS* p=0,00
	15-30	9,61±0,72	11,8±1,21	9,62b±0,33	11,46±1,6	7,4b±0,03	7,67b±0,31	7,08±0,82	7,55±0,17	11,25a ±0,55	9,24b ±0,41	12,43a ±0,84	9,1b ±1,88			RNxRT* p=0,13	RNxRT p=0,89
Argila (%)	0-15	29,35±5,08	18,07±5,02	29,35±5,08	18,07±5,02	22,33±1,2	21,8±2,1	22,33±1,2	21,8±2,1	26,03±3,34	17,62±8,34	26,03±3,34	17,62±8,34	* p=0,01	* p=0,01	RNxRS p=0,34	RNxRS p=0,34
	15-30	29,3a ±1,62	20,3b ±3,34	29,3a ±1,62	20,3b ±3,34	25a ±1,75	20,32b ±0,91	25a ±1,75	20,32b ±0,91	16,87±5,77	24,08±7,52	16,87±5,77	24,08±7,52			RNxRT p=0,27	RNxRT p=0,27
Silte (%)	0-15	7,22±2,6	4,3±1,66	7,22±2,6	4,3±1,66	74,83a ±1,4	70,09b ±0,78	74,83a ±1,4	70,09ab ±0,78	43,83±1,25	28,99±11,5	43,83±1,25	28,99±11,5	p=0,66	p=0,66	RNxRS* p=0,00	RNxRS* p=0,00
	15-30	4,83±0,6	4,46±1,48	4,83±0,6	4,46±1,48	72,19a ±1,27	68,21b ±0,65	72,19a ±1,27	68,21bb ±0,65	29,66±12,41	31,29±14,18	29,66±12,41	31,29±14,18			RNxRT* p=0,00	RNxRT* p=0,00
Areia (%)	0-15	63,43±7,65	77,64±6,67	63,43±7,65	77,64±6,67	2,84b ±0,24	8,11a ±2,81	2,84b ±0,24	8,11a ±2,81	30,14±2,42	53,39±14,92	30,14±2,42	53,39±14,92	p=0,38	p=0,38	RNxRS* p=0,00	RNxRS* p=0,00
	15-30	65,87b ±1,37	75,24a ±4,56	65,87b ±1,37	75,24a ±4,56	2,81b ±0,5	11,48a ±1,56	2,81b ±0,5	11,48a ±1,56	53,47±18,17	44,63±21,44	53,47±18,17	44,63±21,44			RNxRT* p=0,00	RNxRT* p=0,00

Comparação 1. (a) Profundidade 1 vs. Profundidade 2 dentro da mesma planície aluvial (Profundidade)

Comparação 2. (a) FLO vs. FLO e SAT vs. SAT dentro de cada profundidade e planície aluvial. (Sazonalidade)

Comparação 3. (a) FLO vs. SAT dentro de cada período sazonal e planície aluvial. (Uso da terra)

(*) indica diferença estatística (p<0,05)

6.3 COMUNIDADES METANOGÊNICAS E METANOTRÓFICAS PRESENTES NO SOLO

A análise das comunidades metanogênicas e metanotróficas foi realizada a partir de amostras de RNA extraído do solo cujos valores médios das concentrações variaram de 28,4 e 160,7 ng/μL com valor mínimo quantificado para as amostras da planície aluvial de rio de água barrenta e valor máximo quantificado para as amostras da planície aluvial de rio de água negra, ambos no período seco. Tal análise baseada em RNA permitiu identificar as comunidades metanogênicas e metanotróficas ativas no momento da amostragem do solo. A abundância relativa de grupos microbianos metanogênicos e metanotróficos é mostrada na Figura 7 acompanhada pelos valores obtidos para a estimativa de riqueza de UTO, equitatividade e diversidade ao nível da comunidade.

De maneira geral, as comunidades metanogênicas e metanotróficas encontradas na camada do solo de 0-15 cm apresentaram maior riqueza de UTOs, equitatividade e diversidade em comparação com comunidades metanogênicas presentes na camada de 15-30 cm do solo, tanto na condição de seca quanto de inundação. Em ambas as camadas (0-15 cm e 15-30 cm), os solos florestais apresentaram maior riqueza de UTOs, equitatividade e diversidade para as comunidades metanogênicas e metanotróficas em comparação com os solos de sistemas agrícolas tradicionais (Figura 7). Contudo, as comunidades metanogênicas e metanotróficas revelaram particularidades em relação às métricas ecológicas, ocorrência e abundância de seus grupos ativos nas planícies aluviais de rios de águas negra, barrenta e clara, de modo que diferenças observadas entre os períodos de seca e inundação não podem ser generalizadas para as diferentes planícies aluviais (Figura 7).

Maior número de diferenças estatísticas foi mostrado quando comparando as camadas (0-15 cm vs. 15-30 cm) e os usos da terra (floresta vs. sistema agrícola tradicional) do que os períodos sazonais (seca vs. chuvoso), tanto para as métricas ecológicas quanto para os grupos metanogênicos e metanotróficos (Figura 7). Contudo, grupos metanogênicos como *Methanosarcinales* revelaram menor abundância relativa no período chuvoso, enquanto *Methanocellales* e *Methanomassiliicoccales* mostraram maior abundância relativa nesse mesmo período sazonal em comparação com o período seco na planície aluvial do rio de água negra.

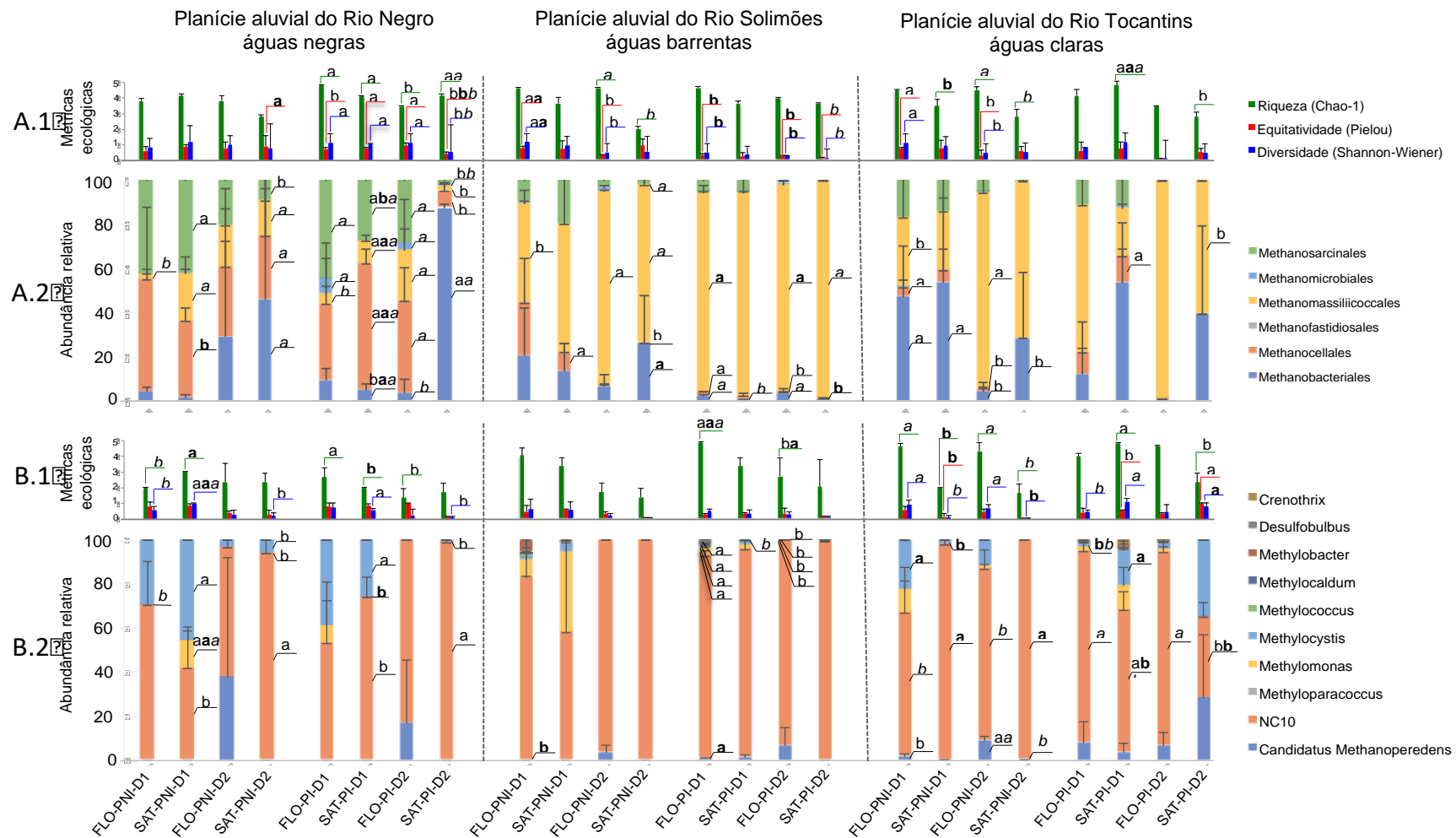


Figura 7. Métricas ecológicas e abundância relativa das comunidades metanogênicas e metanotróficas ativas em amostras de solo coletadas em sítios florestais e em sistemas agrícolas tradicionais em planícies aluviais amazônicas de rios de águas negra, barrenta e clara durante período de seca e inundação. FLO, floresta; SAT, sistema agr ico tradicional; PNI, período não inundado; PI, período inundado; D1, camada 0-15 cm; D2, camada 15-30 cm.

As comunidades metanogênicas identificadas no sítio florestal e sistema agrícola tradicional nas planícies aluviais de rio de águas barrenta e clara foram dominadas por Methanomassiliicoccales. Este grupo metanogênico mostrou diferença estatística quando comparando os períodos seco e chuvoso na planície aluvial de rio de água barrenta, mas nem este nem outro grupo revelou diferença estatística para esta comparação na planície aluvial de rio de água clara (Figura 7). Estes resultados divergem daqueles obtidos por Ji et al. (2016), que revelaram a dominância da ordem Methanomicrobiales em solo proveniente de planície aluvial de rio de água clara, enquanto as ordens Methanosarcinales e Methanocellales foram predominantes em comunidades identificadas em solo de planície aluvial de rios de água barrenta e negra, respectivamente. Pode-se especular que esta diferença seja advinda de muitos fatores, bem como as profundidades coletadas, os períodos de coleta, os usos da terra, os locais escolhidos para a coleta, visto que a microbiota do solo pode sofrer variação em escalas milimétricas dependendo de diversos fatores ambientais (DOMSCH, 1983). Outro importante fator que pode ter contribuído para esta diferença revelada pelos resultados aqui reportados e aqueles reportados por Ji et al. (2016) é a abordagem baseada em DNA utilizada no referido trabalho e a abordagem baseada em RNA utilizada nesse estudo das comunidades microbianas.

As comunidades metanotróficas foram dominadas por membros ativos da classe NC10 na maioria das amostras de solo coletadas nas diferentes profundidades, usos da terra e períodos sazonais nas planícies aluviais de rios de águas negra, barrenta e clara (Figura 7). Apesar de poucas diferenças estatísticas terem sido observadas para a comparação dos períodos seco e chuvoso no que se refere às comunidades metanotróficas nas diferentes planícies aluviais estudadas, Methylomonas revelou menor abundância relativa em sistemas agrícolas tradicionais no período chuvoso em comparação com o período seco na planície aluvial de rio de água negra. Por sua vez, ‘*Candidatus M. nitroreducens*’ apresentou maior abundância relativa em solo florestal durante o período chuvoso em comparação com o período de seca neste mesmo solo em planície aluvial de rio de água barrenta. Por sua vez, Methylocystis diminuiu a abundância relativa em solo florestal durante o período chuvoso em solo florestal e aumento essa abundância em solo de sistema agrícola tradicional de planície aluvial de rio de água clara. A abundância relativa da classe NC10 diminuiu no período chuvoso em comparação com o período seco nesta mesma planície aluvial.

Membros da família Methylocystis foram presentes e abundantes em amostras de solo coletadas na camada de 0-15 cm, enquanto ‘*Candidatus M. nitroreducens*’ foram presentes

em algumas amostras de solo coletadas na camada de 15-30 cm nas diferentes planícies aluviais, totalizando maior abundância entre as amostras de solo coletadas em sítios florestais e sistema agrícola tradicional na planície aluvial de rio de água clara.

Para testar a diferença entre as amostras nos *heatmaps* da análise hierárquica de agrupamento mostrados nas figuras 8, 9 e 10, o teste não paramétrico ANOSIM foi realizado (Tabela 5). Esse teste resulta em um valor de R, no qual R=1 significa que a separação da estrutura da comunidade é encontrada, e R=0 quando não houve a separação. Mais detalhadamente, valores de $R > 0,75$ são comumente interpretados como claramente separados, $R > 0,2$ como separados, mas valores de $R < 0,2$ são interpretados como não havendo separação entre os grupos (CLARKE & GORLEY, 2001).

Assim, no *heatmap* da análise hierárquica de agrupamento para os membros das comunidades metanogênicas ativas reveladas por sequenciamento do gene 16S rRNA, as amostras de solo coletadas em sítios florestais nas planícies aluviais de rios de águas barrenta (Figura 9A) e clara (Figura 10A) em ambos os períodos sazonais estudados foram claramente divididas em função da profundidade de coleta (Figuras 9A e 10A, Tabela 5). O mesmo não foi observado para as amostras coletadas em sistemas agrícolas tradicionais nas três diferentes planícies aluviais nem para aquelas amostras coletadas em sítio florestal na planície aluvial de água negra (Figura 8A). Grupos distintos foram revelados para as comunidades metanogênicas em amostras de solo coletadas na camada de 0-15 cm em sistema agrícola tradicional da planície aluvial de rio de água negra (Figura 8A), havendo a dominância dos grupos Methanocellales e Methanosarcinales. No sítio florestal em planície aluvial de rio de água barrenta (Figura 9A) em função do período de coleta (não inundado e inundado) houve dominância do grupo Methanomassiliicoccales. As comunidades metanogênicas não formaram grupos claramente separados em função do uso da terra (floresta e sistema agrícola tradicional), exceto para as amostras de solo coletadas na camada de 15-30 cm na planície aluvial de água negra (Figura 8A), onde houve o agrupamento claro do grupo Methanosarcinales em função da profundidade.

As comunidades metanotróficas ativas apresentaram maior número de grupos claramente separados em amostras de solo coletadas nas camadas de 0-15 cm e 15-30 cm na planície aluvial de rio de água clara em função principalmente do período de coleta e uso da terra (Figura 10B, Tabela 5). Grupos distintos também foram revelados para estas comunidades em amostras de solo coletadas em sistema agrícola tradicional nas planícies aluviais dos rios de águas negra (Figura 8B) e barrenta (Figura 9B) em função da

profundidade da amostragem.

Hernández *et al* (2019) mostraram um padrão semelhante na composição das comunidades metanogênicas em áreas de Igarapé da Amazônia, em que mais de 30 % da comunidade total de *Archaea* presente no solo foi composta pelos grupos Methanobacteriales, Methanocellales, Methanomicrobiales, Methanosaetaceae, Methanosarcinaceae e Methanomassiliicoccus.

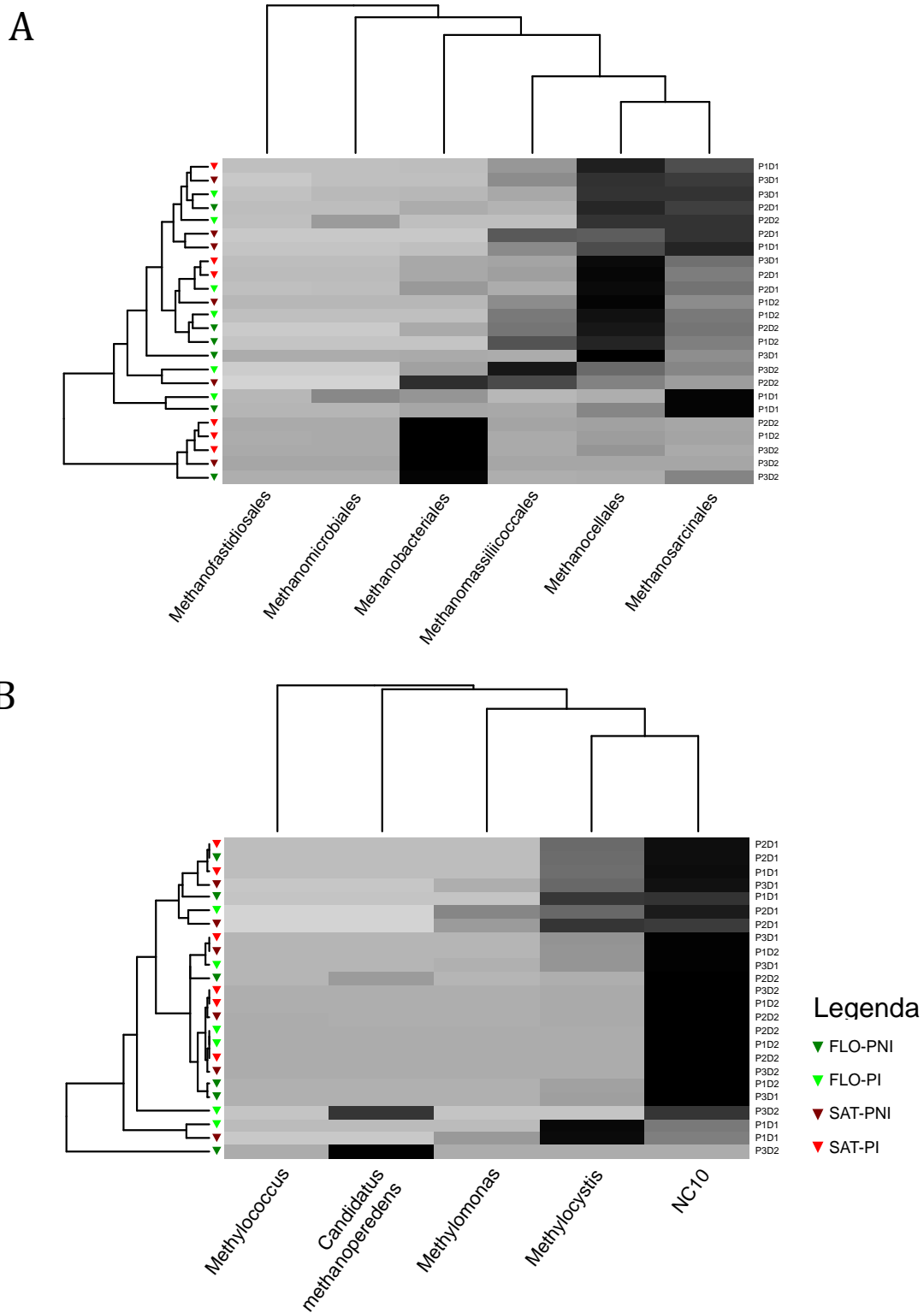


Figura 8. Heatmaps da análise de agrupamento hierárquico para a abundância relativa de membros das comunidades metanogênicas (A) e metanotróficas (B) ativas em amostras de solo coletadas em sítios florestais (FLO) e sistemas agrícolas tradicionais (SAT) localizados na planície aluvial de rio de água negra da Amazônia durante período não inundado (PNI) e período inundado (PI). P1, ponto amostral 1; P2, ponto amostral 2; P3, ponto amostral 3; D1, camada 0-15 cm; D2, camada 15-30 cm.

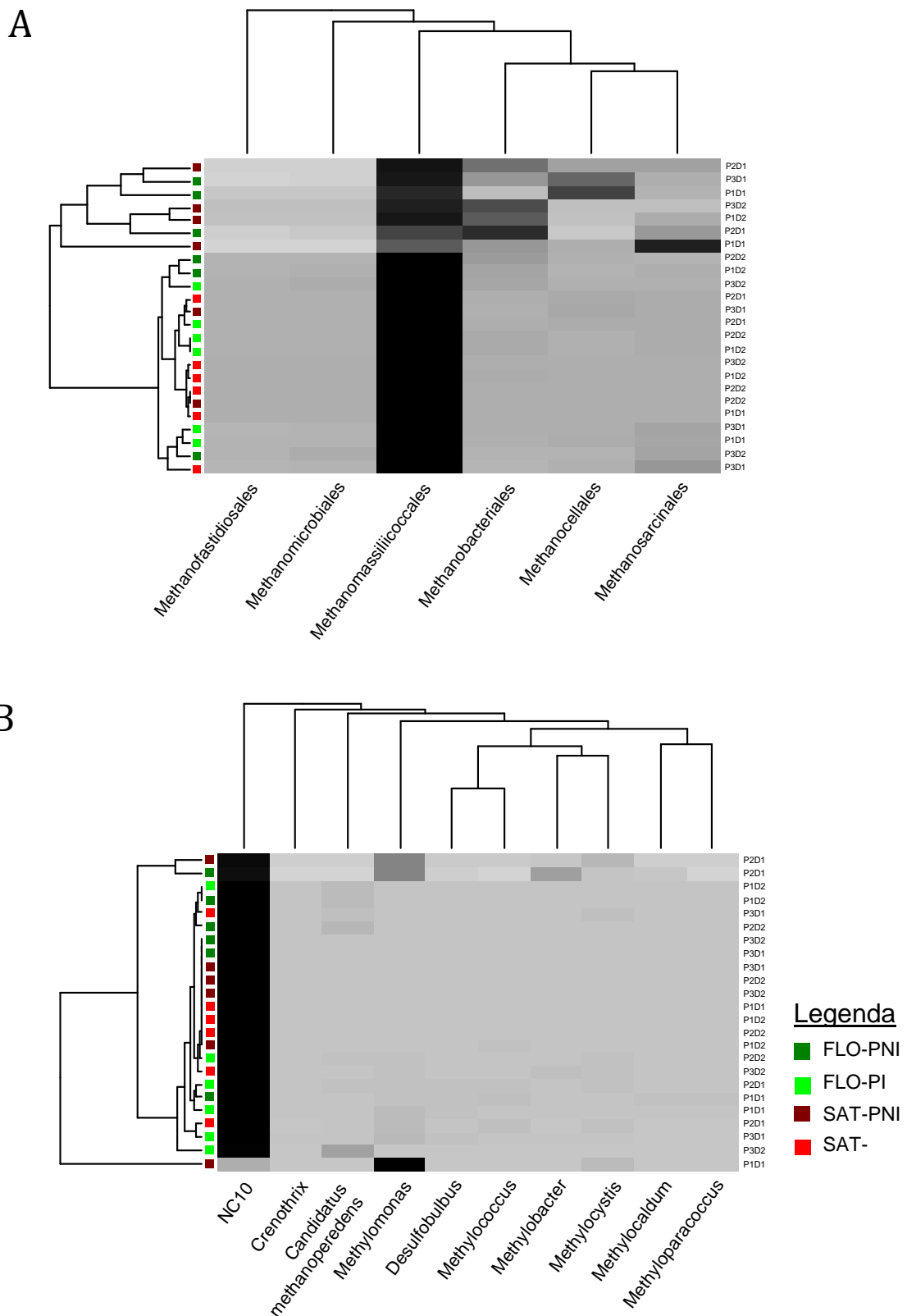


Figura 9. Heatmaps da análise de agrupamento hierárquico para a abundância relativa de membros das comunidades metanogênicas (A) e metanotróficas (B) ativas em amostras de solo coletadas em sítios florestais (FLO) e sistemas agrícolas tradicionais (SAT) localizados na planície aluvial de rio de água barrenta da Amazônia durante período não inundado (PNI) e período inundado (PI). P1, ponto amostral 1; P2, ponto amostral 2; P3, ponto amostral 3; D1, camada 0-15 cm; D2, camada 15-30 cm.

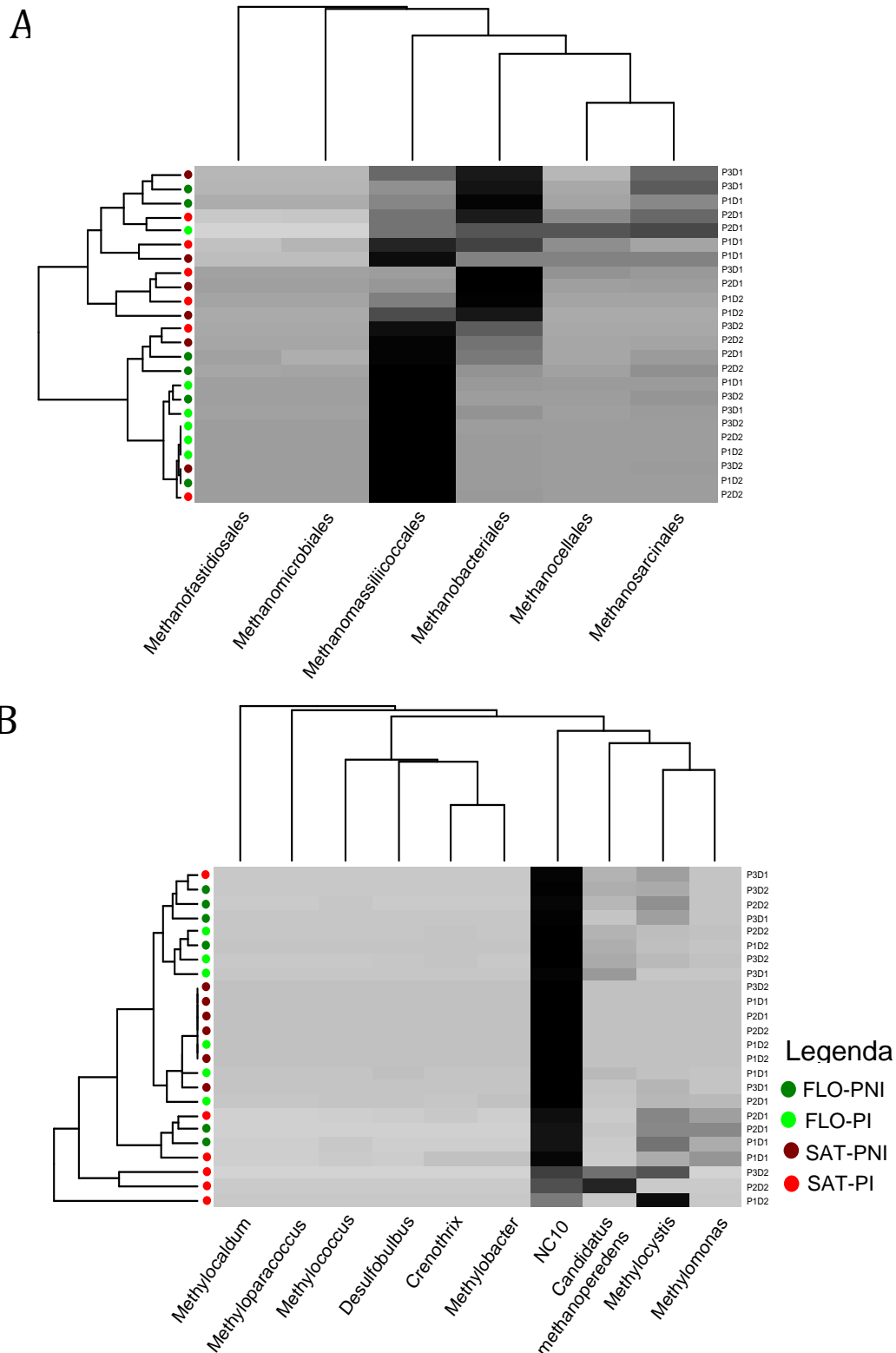


Figura 10. Heatmaps da análise de agrupamento hierárquico para a abundância relativa de membros das comunidades metanogênicas (A) e metanotróficas (B) ativas em amostras de solo coletadas em sítios florestais (FLO) e sistemas agrícolas tradicionais (SAT) localizados na planície aluvial de rio de água clara da Amazônia durante período não inundado (PNI) e período inundado (PI). P1, ponto amostral 1; P2, ponto amostral 2; P3, ponto amostral 3; D1, camada 0-15 cm; D2, camada 15-30 cm.

Tabela 5. Valores R obtidos com a análise de similaridade (One-way ANOSIM) da composição das comunidades metanogênicas e metanotróficas presentes em amostras de solo coletadas em diferentes camadas do solo, uso da terra e períodos sazonais

		Planície Aluvial de águas negras		Planície Aluvial de águas barrentas		Planície Aluvial de águas claras	
Períodos sazonais (Não-inundado vs. Inundado)							
		Floresta	SAT	Floresta	SAT	Floresta	SAT
Camada	0-15 cm	0,096 [¶] (P=1)	0,741 (P=0,1)	0,741 (P=0,1)	0,185 (P=0,4)	0,259 (P=0,2)	0,096 (P=0,7)
		0,022 [§] (P=0,9)	0,519 (P=0,1)	0,074 (P=0,3)	0,037 (P=0,4)	0,556 (P=0,1)	0,852 (P=0,1)
	15-30 cm	0,067 (P=1)	0,222 (P=0,2)	0,481 (P=0,1)	0,074 (P=0,4)	0,444 (P=0,1)	0,037 (P=1)
		0,074 (P=0,6)	0,074 (P=0,6)	0,018 (P=1)	0,074 (P=1)	0,074 (P=0,7)	0,722 (P=0,1)
Camada (0-15 vs. 15-30 cm)							
		Floresta	SAT	Floresta	SAT	Floresta	SAT
Períodos Sazonais	Não-inundado	0,111 (P=0,3)	0,241 (P=0,2)	0,704 (P=0,1)	0,019 (P=0,5)	0,741 (P=0,1)	0,111 (P=0,3)
		0,222 (P=0,2)	0,926 (P=0,1)	0,111 (P=0,5)	0,093 (P=0,4)	0,333 (P=0,2)	0,018 (P=1)
	Inundado	0,015 (P=0,8)	1 (P=0,1)	0,593 (P=0,1)	0,037 (P=0,4)	0,556 (P=0,1)	0,111 (P=0,4)
		0,333 (P=0,2)	0,815 (P=0,1)	0,37 (P=0,1)	0,074 (P=0,4)	0,035 (P=1)	0,63 (P=0,1)
Usos da terra (Floresta vs. Sistema Agrícola Tradicional)							
		Não-inundado	Inundado	Não-inundado	Inundado	Não-inundado	Inundado
Camada	0-15 cm	0,333 (P=0,1)	0,148 (P=0,2)	0,093 (P=0,7)	0,037 (P=0,6)	0,033 (P=1)	0,259 (P=0,3)
		0,111 (P=0,3)	0,074 (P=0,4)	0,014 (P=1)	0,111 (P=0,4)	0,741 (P=0,1)	0,667 (P=0,1)
	15-30 cm	0,020 (P=0,7)	1 (P=0,1)	0,296 (P=0,3)	0,556 (P=0,1)	0 (P=0,5)	0,444 (P=0,1)
		0,037 (P=0,5)	0,037 (P=0,4)	0,185 (P=0,4)	0,222 (P=0,2)	0,889 (P=0,1)	0,685 (P=0,1)

SAT, Sistema Agrícola Tradicional

[¶]R-valores para comunidade metanogênica

[§]R-valores para comunidade metanotrófica

R- valores para cada termo e sua significância são apresentados conforme determinado pela análise permutacional usando 999 permutações.

A aproximação filogenética entre a comunidade metanogênica e a comunidade metanotrófica nas amostras sequenciadas são mostradas nas Figuras 11, 12 e 13. A comunidade metanogênica revelou menor aproximação filogenética nas amostras coletadas na planície aluvial de rio de água clara (Figura 13) em comparação com aquelas coletadas nas planícies aluviais de rios de águas negras (Figura 11) e barrentas (Figura 12). Por sua vez, as comunidades metanogênicas das amostras coletadas na planície aluvial de rio de água negra (Figura 11) foram próximas filogeneticamente entre si. O mesmo foi observado para as comunidades metanogênicas das amostras coletadas na planície aluvial de rio de água barrenta (Figura 12). Por sua vez, as comunidades metanotróficas não apresentaram padrão para a aproximação filogenética entre as amostras sequenciadas nem em função do tipo de água, profundidade de coleta das amostras, uso da terra e período de coleta (Figuras 11, 12 e 13).

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos com o intuito de associar a atividade de micro-organismos metanotróficos com a utilização de aceptores de elétrons, tais como o nitrato, nitrito e sulfato (HE et al, 2015; KRAVCHENKO et al, 2014; SU et al, 2017; ZHU et al, 2012). Podendo-se especular que a falta de padrão na aproximação filogenética para a comunidade metanotrófica ativa no solo deve-se a outros condicionadores do comportamento desta comunidade microbiana, em que mesmo não havendo um padrão de aproximação filogenética, pode haver o agrupamento motivado por outros fatores ambientais e até mesmo pela presença de outros micro-organismos, como comunidades de micro-organismos nitrificantes ativas no solo (KAMIRA et al, 2018; MOHAMMADI et al, 2017).

Hernández *et al* (2019) fizeram um experimento em que amostras de solos de uma área inundável foram submetidas a uma dessecação de curto prazo para investigar se os efeitos sobre a composição microbiana seriam os mesmos ou maiores do que os efeitos causados pelas condições de seca e inundação em um ritmo anual. Ao final, os autores encontraram que a dessecação de curto prazo teve um efeito mais dramático sobre as composições da comunidade microbiana do que as condições de seca e umidade nos diferentes locais de campo, onde a inundação e a drenagem costumam mudar em um ritmo anual. Eles ainda encontraram que as potenciais atividades metanogênicas nos solos antes e após o tratamento de dessecação foram bastante semelhantes, apesar das grandes diferenças na composição da comunidade microbiana. Por fim, concluíram que existe uma resiliência funcional bastante robusta para alguns grupos de bactérias fermentadoras (por exemplo, Firmicutes) e metanogênicos hidrogenotróficos (Methanocellales, Methanosarcinaceae) e

acetoclásticos (Methanosarcinaceae) dominantes.

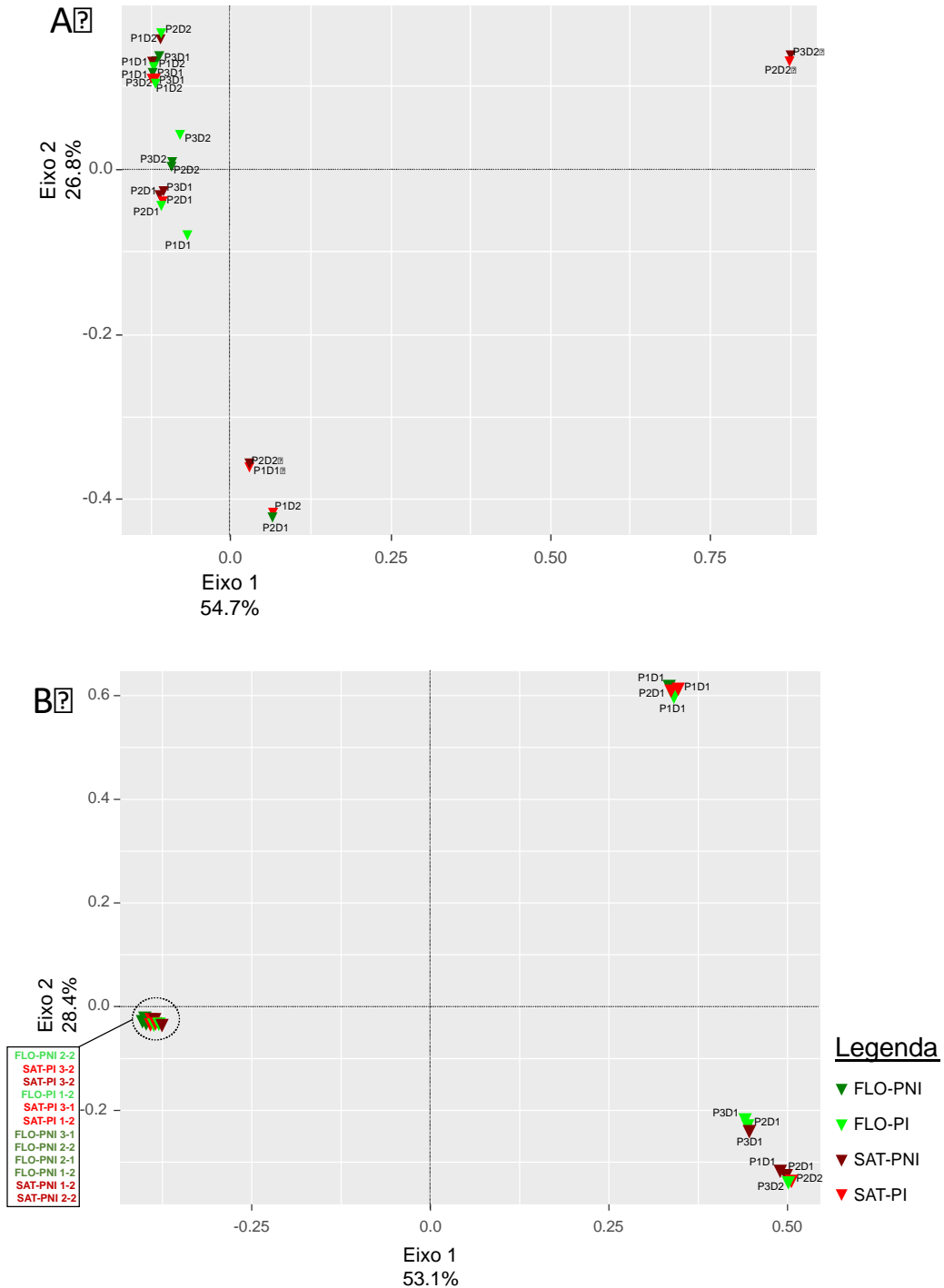


Figura 11. Diagrama de ordenação de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada na matriz de distância UniFrac ponderada (*weighted*) para UTOs componentes das comunidades metanogênica (A) e metanotróficas (B) ativas em sítios florestais (FLO) e sistemas agrícolas tradicionais (SAT) localizados na planície aluvial de rio de água negra da Amazônia durante período não inundado (PNI) e período inundado (PI).

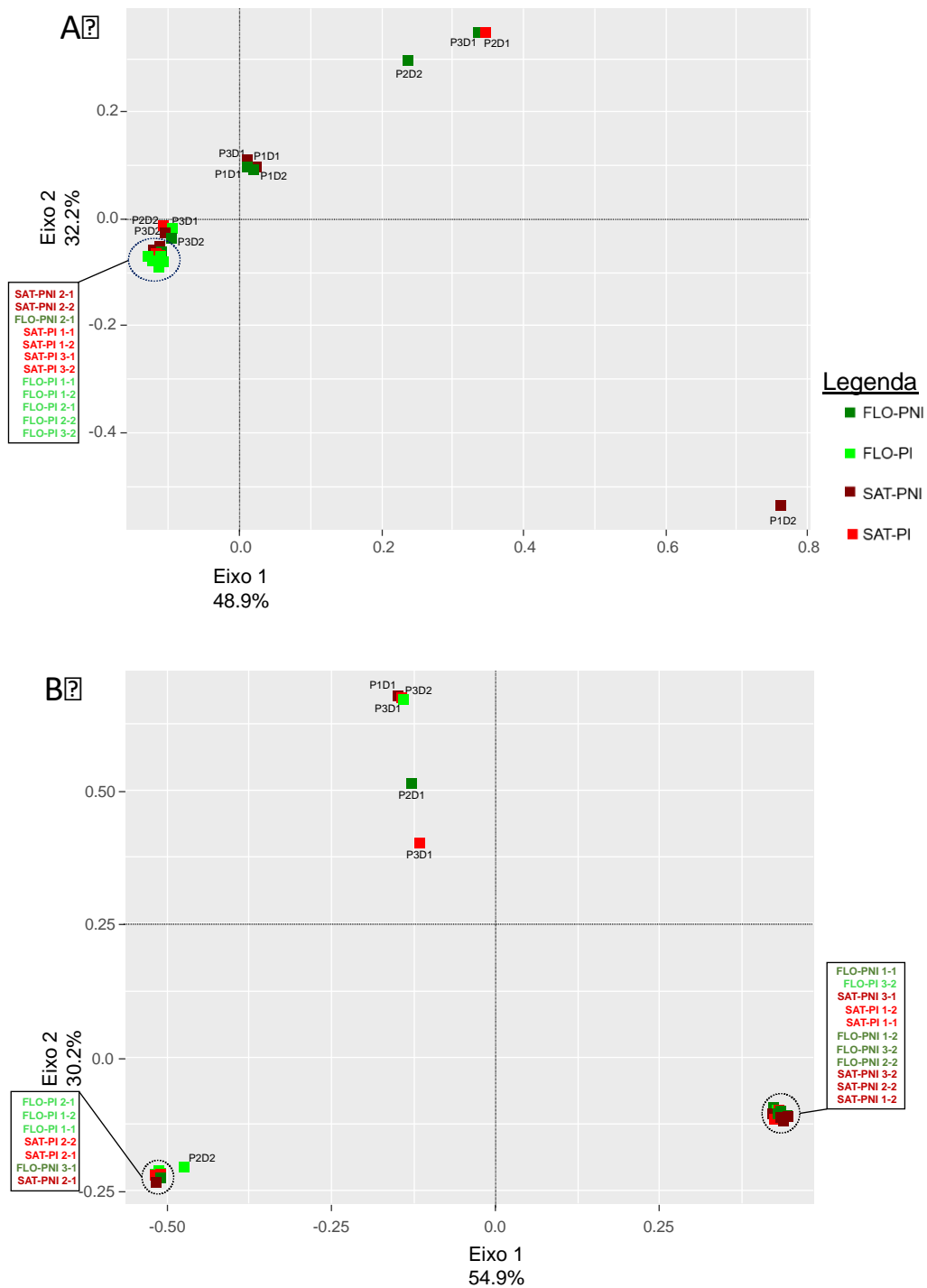


Figura 12. Diagrama de ordenação de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada na matriz de distância UniFrac ponderada (*weighted*) para UTOs componentes das comunidades metanogênica (A) e metanotróficas (B) ativas em sítios florestais (FLO) e sistemas agrícolas tradicionais (SAT) localizados na planície aluvial de rio de água barrenta da Amazônia durante período não inundado (PNI) e período inundado (PI).

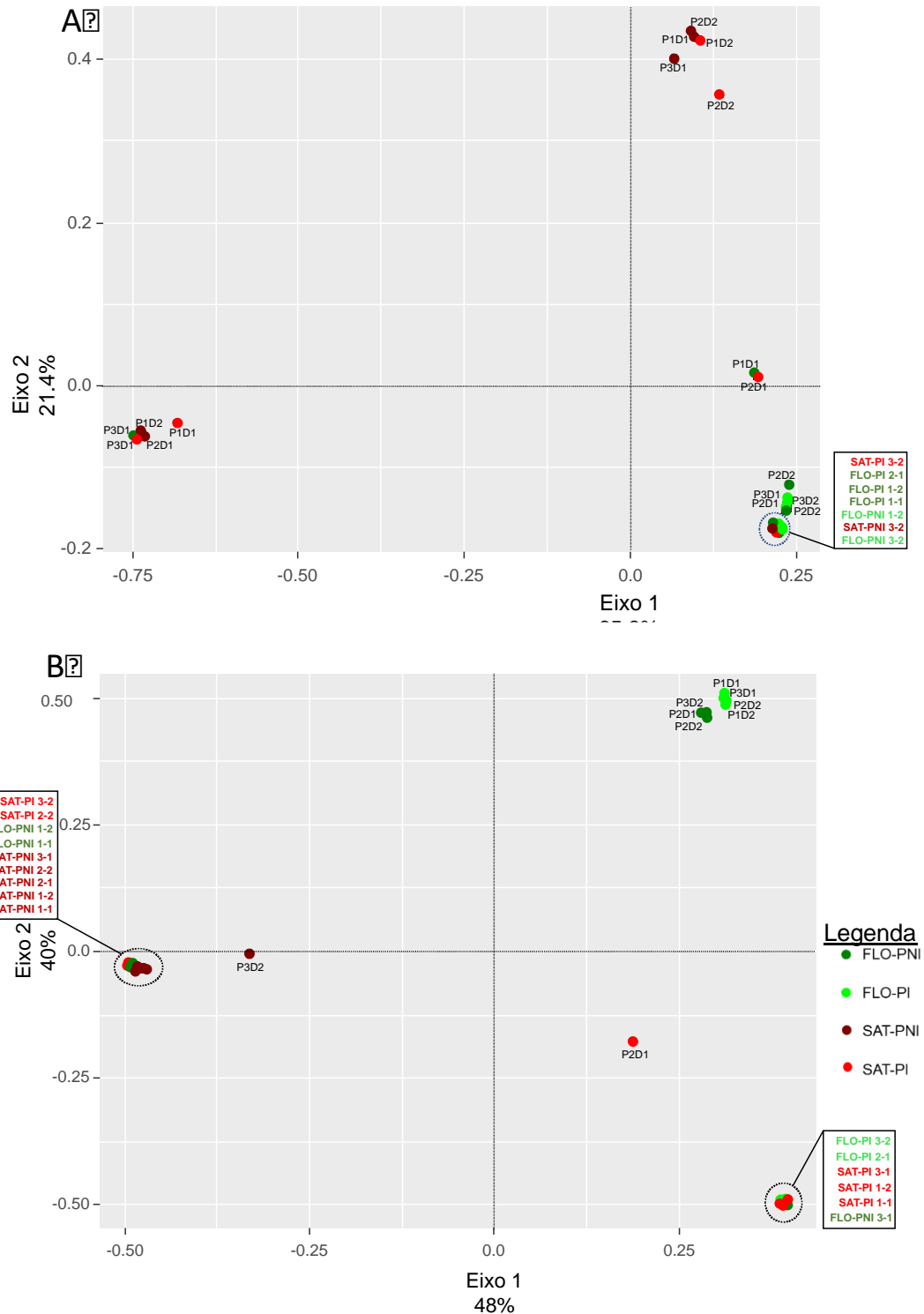


Figura 13. Diagrama de ordenação de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada na matriz de distância UniFrac ponderada (*weighted*) para UTOs componentes das comunidades metanogênica (A) e metanotróficas (B) ativas em sítios florestais (FLO) e sistemas agrícolas tradicionais (SAT) localizados na planície aluvial de rio de água clara da Amazônia durante período não inundado (PNI) e período inundado (PI).

6.4 RELAÇÕES DAS COMUNIDADES METANOGÊNICAS E METANOTRÓFICAS COM FATORES FÍSICOS E QUÍMICOS DO SOLO

A estrutura das comunidades metanogênicas e metanotróficas ativas foi explicitamente relacionada com os fatores físicos e químicos das amostras de solo coletadas nas planícies aluviais de rios de águas negra, barrenta e clara da Amazônia (Figura 14). As comunidades metanogênicas ativas em amostras de solo coletadas na camada de 0-15 cm nos sítios florestais e em sistema agrícola tradicional na planície de rio de águas negras foram positivamente relacionadas com a razão C:N e os teores de C, N, COD, amônio, argila e areia no solo (Figura 14). O teor de nitrato no solo foi positivamente relacionado com as comunidades metanogênicas ativas presentes em solo coletado em ambas as camadas estudadas em sítio florestal e sistema agrícola tradicional na planície aluvial de rio de águas claras. O pH, a umidade, o teor de sulfato, teor de fósforo e silte foram positivamente relacionados com as comunidades metanogênicas de amostras de solo coletadas em ambas as camadas estudadas em sítio florestal e em sistema agrícola tradicional na planície aluvial de rio de água barrenta. A explicabilidade da variação na composição das comunidades microbianas metanogênicas pelos fatores físicos e químicos do solo avaliados nas planícies aluviais de rios de águas negra, barrenta e clara da Amazônia foi de 53,3 %.

Os teores de fósforo, silte e sulfato apresentaram relação positiva com as comunidades metanotróficas de amostras de solo coletadas em ambas as camadas (0-15 cm e 15-30 cm) da planície aluvial de rio de águas barrentas, nos dois usos da terra (Figura 14). As comunidades metanotróficas em solos coletados na camada de 0-15 cm de profundidade nos sítios florestais e em sistema agrícola tradicional na planície de rio de água clara foram positivamente relacionadas com a razão C:N e os teores de C, N, COD e amônio no solo. Enquanto que, o teor de areia foi positivamente relacionado com as comunidades metanotróficas em amostras de solo coletadas em ambas as camadas analisadas na planície aluvial de rio de água negra. O teor de argila foi positivamente relacionado com as comunidades metanotróficas em amostras de solo coletadas na camada de 15-30 cm de profundidade nos sítios de sistema tradicional agrícola de águas claras e negras. O pH e a umidade do solo foram relacionados positivamente com as comunidades metanotróficas em amostras de solos coletadas em ambas as camadas em sítios florestais nas planícies aluvias de rios de águas claras e barrentas. Contudo, a explicabilidade da variação na composição da comunidade microbiana metanotrófica pelas características físicas e químicas do solo nas diferentes planícies aluviais da Amazônia foi baixa (menos de 22,6 %).

É possível observar que houve uma correlação positiva entre o teor de nitrato no solo e a abundância absoluta da comunidade microbiana nitrificante com as amostras de solo coletadas na camada de 0-15 cm em sistema agrícola tradicional na planície aluvial de rio de água barrenta no período chuvoso. Vale destacar que essas amostras de solo apresentaram dominância do grupo NC10. Alguns trabalhos mostram que membros do grupo NC10 são oxidadores anaeróbicos do metano envolvidos com nitrato e nitrito no solo (RAGHOEBARSING et al, 2006; ETTWIG et al, 2008; KNITTEL & BOETIUS, 2009; HE et al, 2015; KRAVCHENKO et al, 2014; SU et al, 2017; ZHU et al, 2012).

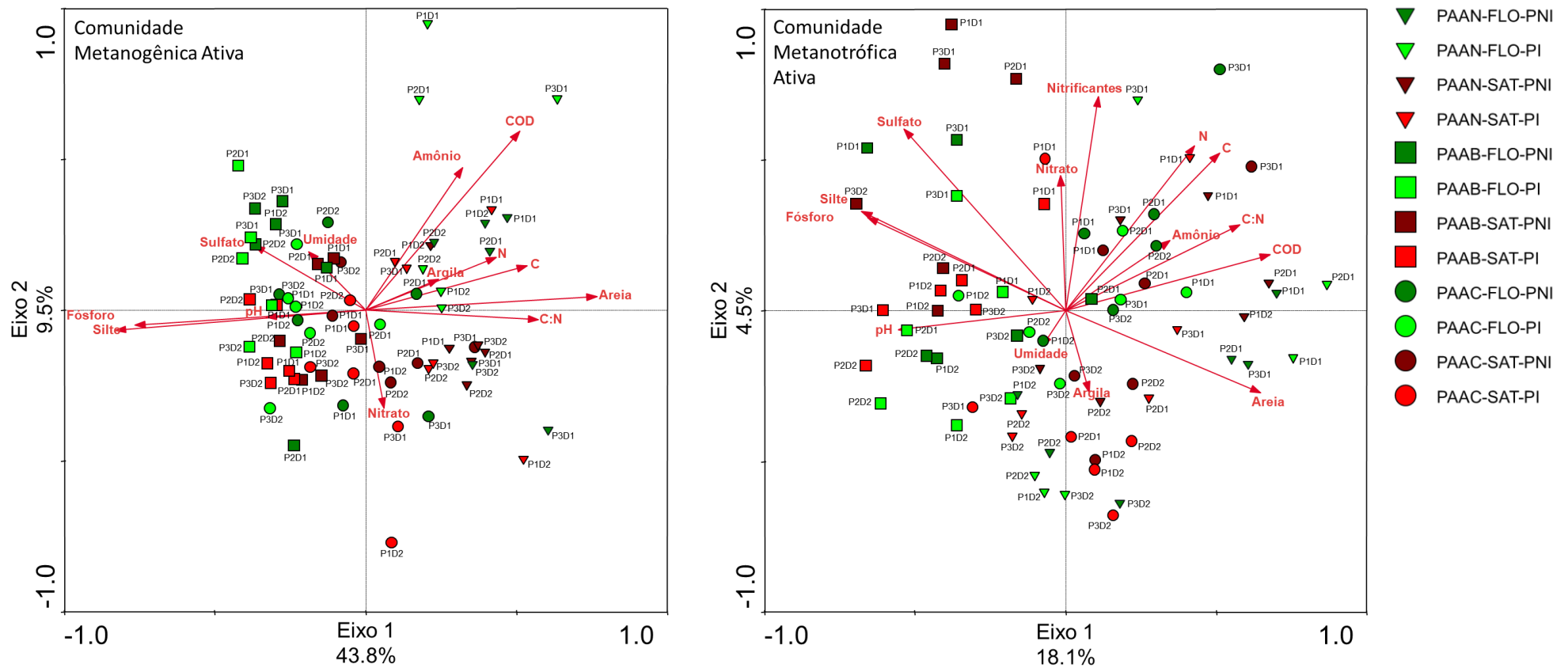


Figura 14. Diagrama de ordenação da análise de redundância (RDA) relacionando os fatores físicos e químicos do solo e as comunidades metanogênicas e metanotróficas em planícies aluviais de águas negra (PAAN), barrenta (PAAB) e clara (PAAC) da Amazônia durante período não inundado (PNI) e inundado (PI) revelada com base em sequenciamento do gene 16S *r*RNA.

7 CONCLUSÃO

Análises baseadas em RNA permitiram conhecer a composição das comunidades metanogênica e metanotrófica ativas envolvidas na produção e consumo de CH₄ em planícies aluviais de rios de águas negra, barrenta e clara na Amazônia brasileira, tendo como base amostragens de solo feitas em sítios florestais e sistemas agrícolas tradicionais, nas camadas de 0-15 cm e 15-30 cm em períodos de seca e inundação nas áreas de estudo.

Com base nos resultados obtidos, aceitou-se a hipótese de que áreas inundáveis florestais e sob sistemas agrícolas tradicionais nas planícies aluviais de rios de águas negra, barrenta e clara da Amazônia diferem quanto à composição das comunidades microbianas metanogênica e metanotrófica ativas presentes no solo, com ocorrência e abundância diferenciadas de seus membros em diferentes profundidades e período sazonal (Hipótese I). As variáveis ‘uso da terra’, ‘profundidade’ e ‘período sazonal’ cooperaram diferentemente para a estruturação das comunidades metanogênicas e metanotróficas presentes no solo das planícies aluviais, revelando maior influência da ‘profundidade’, seguida do ‘uso da terra’ e do ‘período de sazonal’.

A explicabilidade da variação na composição das comunidades microbianas metanogênicas pelos fatores físicos e químicos do solo avaliados nas planícies aluviais de rios de águas negra, barrenta e clara da Amazônia foi de 53,3 %, enquanto que essa explicabilidade foi de 22,6 % para as comunidades metanotróficas nessas mesmas áreas. Assim, aceita-se parcialmente a hipótese de as características físicas e químicas do solo em áreas inundáveis florestais e sob sistemas agrícolas tradicionais nas diferentes planícies aluviais explicam a maior parte da variação observada na composição das comunidades microbianas metanogênicas e metanotróficas presentes em diferentes camadas de solo e período sazonal (Hipótese II). O aceite parcial deve-se à explicabilidade de mais de 50 % da variação observada para as comunidades metanogênicas. Contudo, a baixa explicabilidade revelada pelos fatores físicos e químicos do solo para a variação observada nas comunidades metanotróficas indica que outros fatores (p.e., concentração total e biodisponível de ferro – total, Fe(II) e Fe(III) – e manganês no solo) não analisados podem estar contribuindo com a variação encontrada.

REFERÊNCIAS

ANTHONY, C.; JONES, C. W. Energy metabolism of aerobic, methylotrophic bacteria. In: **Microbial Growth on C1 Compounds**. Springer, Dordrecht, 1987. p. 195-202.

APRILL, Amy et al. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 75, n. 2, p. 129-137, 2015.

BARTLETT, K.B., and HARRISS, R.C. Review and assessment of methane emission from wetlands. **Chemosphere**. 1993, vol.26, n. 1-4, pp. 261-320.

BASTVIKEN, David et al. Methane emissions from lakes: Dependence of lake characteristics, two regional assessments, and a global estimate. **Global biogeochemical cycles**, v. 18, n. 4, 2004.

BASTVIKEN, David; EJLERTSSON, Jörgen; TRANVIK, Lars. Measurement of methane oxidation in lakes: a comparison of methods. **Environmental science & technology**, v. 36, n. 15, p. 3354-3361, 2002.

BELL, Thomas et al. The contribution of species richness and composition to bacterial services. **Nature**, v. 436, n. 7054, p. 1157, 2005.

BLOOM, A.A.; PALMER, P.I.; FRASER A.; REAY, D.S.; FRANKENBERG, C. Large-scale controls of methanogenesis inferred from methane and gravity space borne data. **Science**. 2010, vol. 15, n. 327, pp. 322–325.

BRAAK, Cajo JF; ŠMILAUER, Petr. **Canoco reference manual and user's guide: software for ordination, version 5.0**. Microcomputer power, 2012.

BRIDGHAM S.D., CADILLO-QUIROZ H., KELLER J.K. ZHUANG Q. Methane emissions from wetlands: biogeochemical, microbial, and modeling perspectives from local to global scales. **Global Change Biology**. 2013, vol.19, n.5, pp. 1325-1346.

BRIDGHAM, Scott D. *et al.* Methane emissions from wetlands: biogeochemical, microbial, and modeling perspectives from local to global scales. **Global change biology**, v. 19, n. 5, p. 1325-1346, 2013.

CALDWELL, Sara L. *et al.* Anaerobic oxidation of methane: mechanisms, bioenergetics, and the ecology of associated microorganisms. **Environmental science & technology**, v. 42, n. 18, p. 6791-6799, 2008.

CAMARGO, O. A. *et al.* mineralógica e física de solo do Instituto Agronômico de Campinas. Campinas, Instituto Agronômico, 1986. 94 p. (Boletim técnico, 106).

CAPORASO, J. Gregory *et al.* PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template

alignment. **Bioinformatics**, v. 26, n. 2, p. 266-267, 2010.

CAPORASO, J. Gregory *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, v. 7, n. 5, p. 335, 2010.

CHANTON, J. P. *et al.* Stable isotopes and biosphere–atmosphere interactions. *Physiological ecology series*. 2005.

CHOUDHARY, D. K.; SHARMA, K. P.; GAUR, R. K. Biotechnological perspectives of microbes in agro-ecosystems. **Biotechnology letters**, v. 33, n. 10, p. 1905-1910, 2011.

CHRISTOFOLETTI, Antonio. **Geomorfologia fluvial**. São Paulo: Edgard Blücher, 1981.

CIAIS, Philippe *et al.* Carbon and other biogeochemical cycles. In: **Climate change 2013: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge University Press, 2014. p. 465-570.

CLARKE, K. R.; GORLEY, R. N. 2006. **PRIMER v6: User Manual/Tutorial. PRIMER-E, Plymouth**, 2001.

CLARKE, K. R.; GORLEY, R. N. **Primer. Primer-E, Plymouth**, 2006.

CLARKE, K. R.; WARWICK, R. M. An approach to statistical analysis and interpretation. **Change in marine communities**, v. 2, p. 117-143, 1993.

CORRÊA, José Carlos. Limites de consistência de solos da Amazônia Central e sua importância agrícola. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 917-921, 1982.

CUI, Mengmeng *et al.* Anaerobic oxidation of methane: an “active” microbial process. **MicrobiologyOpen**, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2015.

DAY, Paul R. **Particle fractionation and particle-size analysis**. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, 1965.

DING, Guo-Chun *et al.* Dynamics of soil bacterial communities in response to repeated application of manure containing sulfadiazine. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e92958, 2014.

DOMSCH, K. H.; JAGNOW, G.; ANDERSON, Traute-Heidi. An ecological concept for the assessment of side-effects of agrochemicals on soil microorganisms. In: **Residue Reviews**. Springer, New York, NY, 1983. p. 65-105.

EDGAR, Robert C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2460-2461, 2010.

EDGAR, Robert C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. **Nature methods**, v. 10, n. 10, p. 996, 2013.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Sistema brasileiro de classificação de solos. Rio de Janeiro, v. 412, 1999.

ETTWIG, Katharina F. *et al.* Archaea catalyze iron-dependent anaerobic oxidation of methane. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 45, p. 12792-12796, 2016.

ETTWIG, Katharina F. *et al.* Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of Archaea. **Environmental microbiology**, v. 10, n. 11, p. 3164-3173, 2008.

FENCHEL, Tom *et al.* **Bacterial biogeochemistry: the ecophysiology of mineral cycling**. Academic press, 2012.

GARRITY, G.M.; LILBURN, T.G.; COLE, J.R.; HARRISON, S.H.; EUZEBY, J. & TINDALL, B.J. The Archaea, Phyla Crenarchaeota and Euryarchaeota. In: GARRITY, G.M.; LILBURN, T.G.; COLE, J.R.; HARRISON, S.H.; EUZEBY, J. & TINDALL, B.J., eds. **Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea**. Release 7.7. East Lansing, Michigan State University Board of Trustees, 2007. pp.6-31.

HAMMER, Øyvind; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST-Palaeontological statistics. www.uv.es/~pardomv/pe/2001_1/past/pastprog/past.pdf, acessado em, v. 25, n. 07, p. 2009, 2001.

HE, Zhanfei *et al.* Halophilic anaerobic oxidation of methane coupled to nitrite reduction by marine NC10 bacteria. **Applied and environmental microbiology**, p. AEM. 00984-15, 2015.

HERNÁNDEZ, Marcela *et al.* Structure, function and resilience to desiccation of methanogenic microbial communities in temporarily inundated soils of the Amazon rainforest (Cunia Reserve, Rondonia). **Environmental microbiology**, 2019.

HUANG, Y.; ZOU, J.; ZHENG, X.; WANG, Y. & XU, X. Nitrous oxide emissions as influenced by amendment of plant residues with different C:N ratios. **Soil Biol. Biochem.** 2004, vol.36, pp. 973-981.

ISLAS-LIMA, S.; THALASSO, F.; GOMEZ-HERNANDEZ, J. Evidence of anoxic methane oxidation coupled to denitrification. *Water Research*, v. 38, n. 1, p. 13-16, 2004.

Ji, Yang *et al.* Structure and function of methanogenic microbial communities in sediments of Amazonian lakes with different water types. **Environmental microbiology**, v. 18, n. 12, p. 5082-5100, 2016.

JOHANSSON, A. E. *et al.* Methane emissions from a constructed wetland treating wastewater—seasonal and spatial distribution and dependence on edaphic factors. **Water**

research, v. 38, n. 18, p. 3960-3970, 2004.

JUNK, Wolfgang J. *et al.* The comparative biodiversity of seven globally important wetlands: A synthesis. **Aquatic Sciences**, vol.68, n.3, pp.400- 414, 2006.

JUNK, Wolfgang J. *et al.* A classification of major naturally-occurring Amazonian lowland wetlands. **Wetlands**, v. 31, n. 4, p. 623-640, 2011.

KAMIRA, Barry *et al.* Methane-generating ammonia oxidizing nitrifiers within bio-filters in aquaculture tanks. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 140, 2018.

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

KIRK, G. *The Biogeochemistry of Submerged Soils*. John Wiley & Sons, Chichester, 2004.

KLINDWORTH, Anna *et al.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic acids research**, v. 41, n. 1, p. e1-e1, 2013.

KNITTEL, Katrin; BOETIUS, Antje. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. **Annual review of microbiology**, v. 63, p. 311-334, 2009.

KRAVCHENKO, Irina *et al.* Anaerobic nitrite-dependent methane-oxidizing bacteria-novel participants in methane cycling of drained peatlands ecosystems. In: **EGU General Assembly Conference Abstracts**. 2014.

KROM, Michael D. Spectrophotometric determination of ammonia: a study of a modified Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *Analyst*, v. 105, n. 1249, p. 305-316, 1980.

LAANBROEK, Hendrikus J. Methane emission from natural wetlands: interplay between emergent macrophytes and soil microbial processes. A mini-review. **Annals of botany**, v. 105, n. 1, p. 141-153, 2009.

LEENHEER, Jerry A.; SANTOS, Umberto de Menezes. Considerações sobre os processos de sedimentação na água preta ácida do rio Negro (Amazônia Central). **Acta Amazonica**, v. 10, n. 2, p. 343-357, 1980.

LOZUPONE, C., R. KNIGHT. 2005. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. **Appl. Environ. Microbiol.** 71:8228–8235.

MARTINSON, Guntars O. *et al.* Hydrogenotrophic methanogenesis is the dominant methanogenic pathway in neotropical tank bromeliad wetlands. **Environmental microbiology reports**, v. 10, n. 1, p. 33-39, 2018.

MARTINSON, Guntars O. *et al.* Methane emissions from tank bromeliads in neotropical

forests. **Nature Geoscience**, v. 3, n. 11, p. 766, 2010.

MCMURDIE, P.J., HOLMES S. (2013). “phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data.” **PLoS ONE**, 8(4), e61217.<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0061217>.

MEDINA, H. PENNA; GROHMANN, F. Contribuição ao estudo da análise granulométrica do solo. In: **Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**. 1962. p. 29-38.

MIRANSARI, Mohammad. Soil microbes and plant fertilization. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 92, n. 5, p. 875-885, 2011.

MOHAMMADI, Sepehr S. *et al.* Ammonia oxidation and nitrite reduction in the verrucomicrobial methanotroph *Methylacidiphilum fumariolicum* SolV. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1901, 2017.

MOSIER, Arvin *et al.* Methane and nitrogen oxide fluxes in tropical agricultural soils: sources, sinks and mechanisms. **Environment, Development and Sustainability**, v. 6, n. 1-2, p. 11-49, 2004.

MÜLLER, C.; STEVENS, R.J.; LAUGHLIN, R.J. & JÄGER, H.J. Microbial processes and the site of N₂O production in a temperate grassland soil. **Soil Biol. Biochem.** 2004, vol.36, pp.453- 461.

NAUHAUS, Katja *et al.* Environmental regulation of the anaerobic oxidation of methane: a comparison of ANME-I and ANME-II communities. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 98-106, 2005.

NEUWIRTH, Erich; BREWER, R. Color. ColorBrewer palettes. **R package version**, p. 1.1-2, 2014.

NORMAN, Richard J.; EDBERG, Jeffrey C.; STUCKI, Joseph W. Determination of nitrate in soil extracts by dual-wavelength ultraviolet spectrophotometry 1. **Soil Science Society of America Journal**, v. 49, n. 5, p. 1182-1185, 1985.

OKSANEN, J. *et al.* Vegan: community ecology package. R package 2.3-3. 2016.

OMONODE, R.A.; TONY, J.V.; SMITH, D.R.; HEGYMEGI, P. & GÁL, A. Soil carbon dioxide and methane fluxes from long-term tillage systems in continuous corn-soybean rotations. **Soil & Tillage Research**. 2007, vol.95, n. 1-2, pp.182-195.

PARADA, Alma E.; NEEDHAM, David M.; FUHRMAN, Jed A. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. **Environmental microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1403-1414, 2016.

PLONER, Alexander. Heatplus: Heatmaps with row and/or column covariates and colored clusters, 2014. R package version, v. 2, n. 0.

PYLRO, Victor S. *et al.* Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. **Journal of microbiological methods**, v. 107, p. 30-37, 2014.

RAGHOEBARSING, Ashna A. *et al.* A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. **Nature**, v. 440, n. 7086, p. 918, 2006.

REINERT, Dalvan José; REICHERT, José Miguel. Propriedades físicas do solo. **Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria**, 2006.

RINGEVAL, Bruno *et al.* Methane emissions from floodplains in the Amazon Basin: challenges in developing a process-based model for global applications. **Biogeosciences**, v. 11, n. 6, p. 1519-1558, 2014.

SÁNCHEZ, Pedro A.; SALINAS, José G. Low-input technology for managing Oxisols and Ultisols in tropical America. In: **Advances in agronomy**. Academic Press, 1981. p. 279-406.

SCHUBERT, Carsten J.; DIEM, Torsten; EUGSTER, Werner. Methane emissions from a small wind shielded lake determined by eddy covariance, flux chambers, anchored funnels, and boundary model calculations: A comparison. **Environmental science & technology**, v. 46, n. 8, p. 4515-4522, 2012.

SILVA, Cassio Roberto da. **Geodiversidade do Brasil: conhecer o passado, para entender o presente e prever o futuro**. CPRM, 2008.

SILVA, F. C (Ed.). **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2009.

SILVA, J. L. P. Aproveitamento de resíduos da indústria madeireira para geração de energia elétrica-o caso da empresa BK Energia Itacoatiara LTDA no Estado do Amazonas, 2013.

SIMPSON, I.J.; ROWLAND, F.S.; MEINARDI, S.; BLAKE, D.R. Influence of biomass burning during recent fluctuations in the slow growth of global tropospheric methane. **Geophysical Research Letters**. 2006, vol. 33, n.22, pp. 1-5.

SIOLI, Harold. 1984. **The Amazon. W. Junk, The Hague**.

SIOLI, Harald. Estratificação radicular numa caatinga baixa do alto Rio Negro. 1960.

STALLARD, R. F.; EDMOND, J. M. Geochemistry of the Amazon: 2. The influence of geology and weathering environment on the dissolved load. **Journal of Geophysical Research: Oceans**, v. 88, n. C14, p. 9671-9688, 1983.

SU, Guangyi *et al.* Methane oxidation in anoxic lake waters. In: **EGU General Assembly Conference Abstracts**. 2017. p. 15059.

TIEDJE, J.M.; SEXSTONE, A.J.; PARKIN, T.B.; REVSBECH, N.P. & SHELTON, D.R. Anaerobic processes in soil. **Plant Soil**. 1984, vol. 76, n.1, pp.197-212.

TORRES-ALVARADO, Rocio *et al.* Methanogenesis and methane oxidation in wetlands. Implications in the global carbon cycle. **Hidrobiológica**, v. 15, n. 3, p. 327-349, 2017.

TROTSSENKO, Yu A.; IVANOVA, E. G.; DORONINA, N. V. Aerobic methylotrophic bacteria as phytosymbionts. **Microbiology**, v. 70, n. 6, p. 623-632, 2001.

U.S. EPA. Method 3051A (SW-846): Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Oils, **Revision 1**. Washington, DC, 2007.

VAKSMAA, Annika *et al.* Enrichment of anaerobic nitrate-dependent methanotrophic ‘Candidatus Methanoperedens nitroreducens’ archaea from an Italian paddy field soil. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, n. 18, p. 7075-7084, 2017.

VIEIRA, Lúcio Salgado. **Fitoterapia da Amazônia: manual das plantas medicinais: a farmácia de Deus**. Editora Agronômica Ceres, 1992.

WAGNER, Dirk; LIEBNER, Susanne. Global warming and carbon dynamics in permafrost soils: methane production and oxidation. In: **Permafrost soils**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2009. p. 219-236.

WARNES, Gregory R. *et al.* gplots: Various R programming tools for plotting data. **R package version**, v. 2, n. 4, p. 1, 2009.

WHITICAR, Michael J. Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane. **Chemical Geology**, v. 161, n. 1-3, p. 291-314, 1999.

WUEBBLES, D.J.; HAYHOE, K. Atmospheric methane and global change. **Earth-Science Reviews**. 2002 vol. 57, n. 3-4, pp. 177-210.

XIE, M.; LI, S.; JIANG, F.; WANG, T. Methane emissions from terrestrial plants over China and their effects on methane concentrations in lower troposphere. **Chinese Science Bulletin**. 2009, vol. 54, n. 2, pp. 304-310.

XU, Xiaofeng *et al.* Reviews and syntheses: Four decades of modeling methane cycling in terrestrial ecosystems. **Biogeosciences**, v. 13, n. 12, p. 3735-3755, 2016.

ZHU, Baoli *et al.* Anaerobic oxidization of methane in a minerotrophic peatland: enrichment of nitrite-dependent methane-oxidizing bacteria. **Applied and environmental microbiology**, p. AEM. 02102-12, 2012.