

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
Centro de Energia Nuclear na Agricultura**

**Isolamento e identificação de microrganismos metanogênicos em solos de
Terra Preta Antropogênica (TPA) e de várzea (Gleissolos) da Amazônia
Oriental**

Jeanedy Maria Pazinato

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ecologia Aplicada**

**Piracicaba
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Jeanedy Maria Pazinato
Engenheiro Agrônomo

Isolamento e identificação de microrganismos metanogênicos em solos de Terra Preta Antropogênica (TPA) e de várzea (Gleissolos) da Amazônia Oriental

Orientadora:
Profa. Dra. SIU MUI TSAI

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ecologia Aplicada**

Piracicaba
2007

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Pazinato, Jeanedy Maria

Isolamento e identificação de microrganismos metanogênicos em solos de Terra Preta Antropogênica (TPA) e de várzea (Gleissolos) da Amazônia Oriental / Jeanedy Maria Pazinato. - - Piracicaba, 2007.
187 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz . Centro de Energia Nuclear na Agricultura, 2007.
Bibliografia.

1. Amazônia Oriental 2. Biologia molecular 3. Ecologia microbiana 4. Efeito estufa
5. Solo 6. Várzea I. Título

CDD 631.46

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Às pessoas mais importantes de minha vida, minha família...

...Meus pais Orlando e Maria Aparecida Pazinato...

Pessoas sábias e simples, símbolos de honestidade e caráter, que souberam entender a minha ausência, apoiaram minhas decisões, me incentivaram e rezaram por mim...

...Meu irmão Jean Paulo Pazinato...

Meu grande amigo e meu maior exemplo, o grande provedor e incentivador de minha educação...

...Por todo apoio, carinho e amor incondicionais, presentes em todos os momentos de minha vida, e sem os quais eu não chegaria até aqui....

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Siu Mui Tsai, pela orientação, confiança e oportunidade de realização deste trabalho, por compreender minhas deficiências e ajudar-me a superá-las, e, sobretudo, pela grande amizade;

À Profa. Dra. Rosana Filomena Vazoller, que prontamente atendeu ao pedido de realização do cultivo de arqueias metanogênicas no Laboratório de Microbiologia Ambiental (ICB/USP) e se dispôs a co-orientar este trabalho, ainda que extra-oficialmente; por toda dedicação, apoio e amizade, e cuja atuação foi imprescindível para facilitação e execução deste trabalho;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela concessão da bolsa de doutorado, referente ao processo nº 04/04608-4;

À Profa. Dra. Vivian Helena Pellizari, responsável pelo Laboratório de Microbiologia Ambiental, Instituto de Ciências Biomédicas (USP), que gentilmente permitiu a utilização das instalações do laboratório para a realização das etapas de cultivo e isolamento de anaeróbios estritos, pela amizade e valiosas contribuições a este trabalho;

À Dra. Cristina Nakayama e Ana Carolina Araújo, grandes profissionais e amigas queridas, que me ensinaram os primeiros passos no cultivo de arqueias metanogênicas, sempre com muita atenção e paciência; pelos ensinamentos e dicas durante todo nosso convívio, e principalmente a Ana, que além de toda ajuda profissional, me hospedou em sua casa durante minha permanência em São Paulo;

Ao Dr. Raimundo Cosme Oliveira Jr., pela contribuição na escolha das áreas de coleta;

Ao Ezio Nalin, pela grande contribuição nas análises computacionais;

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Adriana Lorenzi, Ana Luiza Furtado, Bianca Furlan, Daniel Saito, Daniele Del Rio, Daniela Campos, Diego Genuário, Edenilson Rabelo, Ezio Nalin, Flavia Capaldi, Flavia Pacheco, Gladys Brandão, Lucélia Borgo, Ludmila Campos, Maria Estela Stenico, Mariana Germano, Miriam Chaves, Othon Abrahão, Rafael Medau, Ricardo Honda, Samanta Fedrizzi, Tânia Shishido e Vanderley Stefanuto, que ao

longo deste período sempre me ajudaram na execução do meu trabalho, e principalmente pela amizade e convívio agradável;

Às minhas queridas amigas “Lulus”, Adriane Nunes, Camila Patreze, Caroline Pamplona, Fabiana Cannavan, Juliana Martinatti, Luciana Ferreira e Karla Nishiyama, que sempre foram muito mais que colegas de laboratório, por tantos momentos de descontração e alegria, carinho e amizade;

Aos técnicos do Laboratório de Biologia Molecular e Celular, Fábio Rodrigo Sanches Duarte, Wagner Picinini, Francisco Montrazi e José Elias Gomes, por toda ajuda prestada, os ensinamentos, carinho e amizade, e principalmente ao Elias, que me “apresentou” às técnicas de biologia molecular;

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Ambiental, Ana Carolina, Cristina Barreto, Cristina Nakayama, Emanuele, Fernando, Michele, Rhavena, Rosa e Sandra, que tão bem me acolheram;

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Molecular (ESALQ/USP), especialmente a Rafael Armas, pela ajuda na análise das seqüências de 16S rDNA, e a Gisele Lopes Nunes;

Ao Juliano de Carvalho Cury, pelas preciosas dicas *via* msn;

Aos meus amigos tão especiais, que se tornaram minha família em Piracicaba, Adriano Lucheta, Alexandre Martines, Henrique Alves, Mauro Guida dos Santos, Priscylla Ferraz, Rodrigo Otávio Câmara, Thiago Vasconcellos, e Valesca Pandolfi, pela amizade sincera, por dividirem as alegrias, os risos, as preocupações, por todo carinho e cuidado, e por tornaram este período muito mais feliz e agradável;

E acima de tudo, a Deus, por me dar força, saúde, proteção e perseverança, para que eu pudesse realizar este trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	08
ABSTRACT.....	09
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 DESENVOLVIMENTO.....	18
2.1 Revisão Bibliográfica.....	18
2.1.1 Solos da Amazônia.....	18
2.1.1.1 Solos de Várzea.....	18
2.1.1.2 Terra Firme - Solos de Sítios Arqueológicos.....	19
2.1.2 Produção de metano em ambientes tropicais.....	24
2.1.3 Arquéias metanogênicas.....	27
2.1.3.1 Metanogênese microbiana.....	33
2.1.4 Cultivo e isolamento de linhagens de arqueias metanogênicas.....	38
2.1.5 Estudo da diversidade de <i>Archaea</i> por técnicas moleculares.....	40
2.2 Material e Métodos.....	47
2.2.1 Descrição geral da área de estudo.....	48
2.2.2 Amostragem.....	49
2.2.3 Caracterização físico-química do solo.....	52
2.2.4 Cultivo de microrganismos anaeróbios estritos.....	54
2.2.5 Equipamentos.....	54
2.2.6 Meios de cultivo e soluções estoque.....	56
2.2.7 Isolamento e cultivo de arqueias metanogênicas.....	60
2.2.7.1 Ensaio de enriquecimento e potencial de produção de metano.....	60
2.2.7.2 Ensaio de diluição seriada.....	61
2.2.7.3 Isolamento das culturas metanogênicas pela técnica do <i>Roll-Tube</i>	62
2.2.7.4 Transferência de culturas do <i>roll-tube</i> para subcultivo em meio líquido.....	62
2.2.7.5 Repiques de subcultivos em frascos de antibiótico de 100 mL.....	63
2.2.8 Determinação da concentração de metano por cromatografia gasosa.....	63

2.2.9 Caracterização morfológica das culturas metanogênicas.....	64
2.2.10 Identificação de arqueias metanogênicas cultivadas por técnicas moleculares.....	64
2.2.10.1 Extração do DNA genômico das culturas.....	64
2.2.10.2 Amplificação do gene <i>mcrA</i>	65
2.2.10.3 Amplificação do gene 16S rRNA.....	66
2.2.10.4 Purificação do produto de PCR.....	66
2.2.10.5 Mini-bibliotecas de clones do gene 16S rRNA.....	67
2.2.10.6 Análise de Restrição do DNA Ribossomal (ARDRA).....	68
2.2.10.7 Seqüenciamento do gene 16S rRNA.....	69
2.2.10.8 Análise filogenética das seqüências.....	69
2.2.10.9 Análise da diversidade de <i>Archaea</i> do solo por biblioteca genômica.....	70
2.2.10.9.1 Extração do DNA genômico total do solo.....	70
2.2.10.9.2 Bibliotecas de 16S rDNA.....	71
2.2.10.9.3 Análise das seqüências de 16S rDNA.....	71
2.3. Resultados e Discussão.....	73
2.3.1 Enriquecimento das amostras de solo e potencial de produção de metano.....	73
2.3.2 Isolamento e purificação das culturas metanogênicas enriquecidas.....	82
2.3.2.1 Obtenção de cultivos metanogênicos pela técnica da diluição decimal seriada.....	83
2.3.2.2 Isolamento das culturas metanogênicas pelo Método do <i>Roll-tube</i>	86
2.3.2.3 Sub-cultivos das amostras enriquecidas em frascos de antibiótico.....	97
2.3.3 Identificação de arqueias metanogênicas por técnicas moleculares.....	99
2.3.3.1 Extração de DNA genômico das culturas isoladas de arqueias metanogênicas.....	99
2.3.3.2 <i>Screening</i> da presença de arqueias metanogênicas pela amplificação do gene <i>mcrA</i> ..	101
2.3.3.3 Análise de restrição do produto de amplificação do rDNA - ARDRA.....	101
2.3.3.4 Análise filogenética das seqüências.....	124
2.3.4 Caracterização morfológica das culturas metanogênicas.....	126
2.3.5 Diversidade de <i>Archaea</i> em solo de várzea.....	130
3 CONCLUSÕES.....	168
REFERÊNCIAS.....	169
APÊNDICE.....	186

RESUMO

Isolamento e identificação de microrganismos metanogênicos em solos de Terra Preta Antropogênica (TPA) e de várzea (Gleissolos) da Amazônia Oriental

O metano, assim como o dióxido de carbono e o óxido nitroso, é um importante gás traço da atmosfera. A habilidade do metano em absorver a irradiação infravermelha faz dele um gás 20 a 30 vezes mais eficiente que o dióxido de carbono como um gás de efeito estufa. As várzeas tropicais são as maiores fontes naturais de metano para a atmosfera, contribuindo com cerca de 60% de todas as emissões naturais. As grandes várzeas da bacia Amazônica são as maiores fontes de metano desta região, e estima-se que sua contribuição para as emissões totais de áreas alagadas no mundo seja da ordem de 5%. Por outro lado, os solos de terra firme, especialmente de origem antropogênica, têm elevados teores de matéria orgânica, uma das principais fontes de formação de gás metano natural produzido por um único grupo de microrganismos que, por sistemas enzimáticos únicos, é capaz de produzir metano como produto de seu metabolismo. O metano é produzido pelas arqueias (*Archaea*) metanogênicas, pela degradação anaeróbia da matéria orgânica. As arqueias metanogênicas são encontradas em diversos ambientes associados à decomposição da matéria orgânica e/ou atividades biogeoquímicas. Uma atmosfera modificada (H₂:CO₂, 80:20) em combinação com um ambiente anóxico -300mV foi estabelecida ao longo de 18 meses em três solos de várzea e três solos Terra Preta e adjacentes da região de Santarém-PA (Amazônia Oriental), para estimular o crescimento de arqueias metanogênicas. Métodos moleculares baseados no uso e análise do gene 16S rRNA de *Archaea* permitiram o estudo direto de 12 cultivos individuais de arqueias metanogênicas, enquanto que a determinação da diversidade de comunidades de arqueias foi obtida com a construção de quatro bibliotecas de um dos solos de várzea (Várzea 3) e análise de 669 sequências parciais do gene 16S rRNA. Ensaios envolvendo cultivo e crescimento, monitoramento da produção de metano, microscopia de contraste de fase e de varredura, detecção do gene *mcr* - coenzima da metil-redutase foram usados como métodos de referência ao longo do desenvolvimento e avaliação dos métodos moleculares. Entre os isolados da Várzea 3, o gênero *Methanosarcina* foi predominante, indicando seu possível papel na produção de metano, detectado ao longo dos cultivos *in vitro*. Dentre os 12 tipos isolados a partir dos nove solos, dez (10) corresponderam a uma sequência de *Methanobacterium* isolado de trato intestinal de cupins presentes em ambientes tropicais. Em conclusão, nosso método molecular explorativo permitiu uma primeira visão quanto ao entendimento do papel de arqueias metanogênicas em solos de várzea e terra firme da Amazônia Oriental.

Palavras-chave: Metano; *Archaea*; Anaeróbios; Amazônia; Diversidade microbiana; 16S rDNA;

ABSTRACT

Isolation and identification of methanogenic microorganism in Dark Earth (“Terra Preta”) and floodplain soils (Gleissolo) of the Eastern Amazonian

Methane, as well as carbon dioxide and nitrous oxide, is an important atmospheric trace gas. The ability of methane to absorb infrared irradiation makes this gas 20 or 30 times more efficient than carbon dioxide for the global warming. The tropical floodplains are the major sources of environment methane, contributing up to 60% for the natural gas emissions. In the Amazonian Basin, they are the major methane sources, contributing to around 5% for the global gas emission. On the other hand, upland soils, especially from anthropogenic origin present high organic matter content, one of the main sources for microbial production of methane by a unique group of microorganisms which present unique enzymatic systems for their metabolism. Methane is produced by methanogenic *Archaea*, by anaerobic degradation of the organic matter. These microorganisms are found in a variety of environments associated to organic matter decomposition and/or biogeochemical activities. A modified-atmosphere (H₂:CO₂, 80:20) in combination with an anoxic growth environment for enhancing the methanogenic *Archaea* growth was established during 18 months in three Amazonian floodplain and three Anthropogenic Dark Earth (“Terra Preta”) soils and backgrounds located within the region of Santarém – Pará (Eastern Amazonia). Molecular approaches based on the *Archaea* 16S ribosomal rRNA gene sequence analysis allowed direct investigation of 12 individual types of methanogenic *Archaea* while community diversity of 669 clone sequences from four clone libraries from one floodplain soil (Várzea 3) was addressed by examining partial 16S rRNA gene sequences. Cultivation-dependent assays - enrichment and growth, as well as monitoring of methane production, direct phase-contrast microscopy and scanning electron microscopy, detection of the *mcr* - methyl coenzyme reductase – gene were used as reference methods in the development and evaluation of the molecular methods. Among the isolates from the Várzea 3 the genus *Methanosarcina* was predominant, indicating its possible role on the methane production, detected throughout the in vitro cultivation. Among the 12 types isolated from the nine soils, 10 corresponded to a sequence of *Methanobacterium* isolated from the gut of termites from a tropical environment. In conclusion, our explorative molecular approach gave the first picture towards the understanding of the role of methanogenic *Archaea* in floodplain and upland soils from the Eastern Amazonian.

Keywords: Methane; *Archaea*; Anaerobes; Amazonian; Microbial diversity; 16S rDNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	(a) Perfil de Terra Preta e (b) Perfil de Oxissol.....	21
Figura 2 -	Árvore filogenética do Domínio <i>Archaea</i> , baseada na análise das seqüências do 16S rRNA.....	28
Figura 3 -	Etapas metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia: 1. Bactérias fermentativas hidrolíticas; 2. Bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio; 3. Bactérias acetogênicas consumidoras de hidrogênio; 4. Arquéias metanogênicas redutoras de dióxido de carbono; 5. Arquéias metanogênicas que descarboxilam o acetato.....	32
Figura 4 -	Diagrama dos experimentos de diversidade, cultivo, isolamento e caracterização de arquéias metanogênicas.....	47
Figura 5 -	Valores (mm) da precipitação mensal medida pela estação micrometeorológica Belterra no PA, referentes ao período entre abril de 2003 e junho de 2006.....	49
Figura 6 -	Amostragem do solo: a) Trincheira de coleta; b) tubos de PVC lacrados, contendo amostras de solo.....	50
Figura 7 -	Vista das áreas de coleta. (a) Várzea - Fazenda Cacoal Grande. (b) Pomar de Mangueiras em Terra Preta 1. (c) Terra Preta 2 sob Mata. (d) Roçado em Terra Mulata.....	51
Figura 8 -	Sistema de distribuição simultânea de gases – Laboratório de Microbiologia Ambiental ICB-USP. (1) Sistema de válvulas para seleção dos gases de trabalho (N_2 , $N_2:CO_2$ 70:30% ou $H_2:CO_2$ 80:20%); (2) Coluna removedora de traços de oxigênio; (3) Saídas de fluxo regulável, acopladas ao manômetro e com válvula e (4) conexão para a bomba de vácuo.....	55
Figura 9 -	Seringa de amostragem de gás.....	63
Figura 10 -	Representação gráfica dos valores em porcentagem atmosférica do gás metano em função do tempo - Ensaio de enriquecimento amostras VZ1 (a), VZ2 (b) e VZ3 (c).....	76

Figura 11 -	Representação gráfica dos valores em porcentagem atmosférica do gás metano em função do tempo - Ensaio de enriquecimento amostras TP1 e Adjacente (a), TP2 e Adjacente(b), TM e Adjacente (c).....	81
Figura 12 -	Fotografias dos frascos de <i>roll-tube</i> com a presença de colônias.....	87
Figura 13 -	Fotografia dos sub-cultivos em frascos HUNGATE® da Bellco® Glass Inc. contendo meio de cultivo Zinder líquido.....	90
Figura 14 -	Fotomicrografias das culturas metanogênicas purificadas, a saber: a) VZ1 40-70 cm, bacilos retos livres b) VZ1 70-100 cm, bacilos retos livres; c) VZ2 20-40 cm, bacilo; d) VZ2 40-70 cm, bacilos retos livres ou em pares. Exame microscópico sob contraste de fase – ordem de magnitude (aumento de 1250 vezes).....	93
Figura 15 -	Fotomicrografias das culturas metanogênicas purificadas, a saber: a) VZ3 70-100 cm, Cadeia de bacilos; b) VZ2 40-70 cm, Células em forma de cocos. Microscopia de contraste de fase (aumento 1250 vezes).....	99
Figura 16 -	Resultado da amplificação do gene <i>mcrA</i> de culturas metanogênicas.....	101
Figura 17 -	Digestão enzimática da região 16S dos clones do cultivo VZ1 (1-24), com as endonucleases <i>HaeIII</i> (foto superior) e <i>HindIII</i> (foto inferior).....	105
Figura 18 -	Digestão enzimática da região 16S dos clones do cultivo VZ1 (25-48), com as endonucleases <i>HaeIII</i> (foto superior) e <i>HindIII</i> (foto inferior).....	106
Figura 19 -	Digestão enzimática da região 16S dos clones do cultivo VZ1 (49-72), com as endonucleases <i>HaeIII</i> (foto superior) e <i>HindIII</i> (foto inferior).....	107
Figura 20 -	Digestão enzimática da região 16S dos clones do cultivo VZ2 (73-96), com as endonucleases <i>HaeIII</i> (foto superior) e <i>HindIII</i> (foto inferior).....	108
Figura 21 -	Digestão enzimática da região 16S dos clones do cultivo VZ2 (97-120), com as endonucleases <i>HaeIII</i> (foto superior) e <i>HindIII</i> (foto inferior).....	109
Figura 22 -	Digestão enzimática da região 16S dos clones do cultivo VZ2 (121-144), com as endonucleases <i>HaeIII</i> (foto superior) e <i>HindIII</i> (foto inferior).....	110
Figura 23 -	Digestão enzimática da região 16S dos clones do cultivo VZ3 (145-168), com as endonucleases <i>HaeIII</i> (foto superior) e <i>HindIII</i> (foto inferior).....	111
Figura 24 -	Digestão enzimática da região 16S dos clones do cultivo VZ3 (169-192), com as endonucleases <i>HaeIII</i> (foto superior) e <i>HindIII</i> (foto inferior).....	112

- Figura 25 - Digestão enzimática da região 16S dos clones do cultivo TP1 (193-216), com as endonucleases *HaeIII* (foto superior) e *HindIII* (foto inferior)..... 113
- Figura 26 - Digestão enzimática da região 16S dos clones do cultivo TP2 (217-240) com as endonucleases *HaeIII* (foto superior) e *HindIII* (foto inferior)..... 114
- Figura 27 - Digestão enzimática da região 16S dos clones do cultivo TM (241-264), com as endonucleases *HaeIII* (foto superior) e *HindIII* (foto inferior)..... 115
- Figura 28 - Digestão enzimática da região 16S dos clones do cultivo Ad.TM (265-288), com as endonucleases *HaeIII* (foto superior) e *HindIII* (foto inferior)..... 116
- Figura 29 - Árvore filogenética baseada na seqüência do gene 16S rRNA dos clones de *Archaea*, construída pelo método de “Neighbor Joining”(modelo Kimura 2). A árvore foi enraizada utilizando o gene 16S rRNA de *Korarchaeota* SRI-306 como grupo externo. Os números acima das linhas são valores de reamostragem obtidos com 1000 replicações (seed=64238). Os clones obtidos neste estudo encontram-se destacados em negrito. O número entre parêntese representa o número de seqüências representadas pelo clone..... 125
- Figura 30 - Fotomicrografias das culturas metanogênicas purificadas, a saber: a) VZ1(1-24), cadeia de bacilos; b) VZ1(49-72) células em forma de bacilos; c) VZ2(73-96), células em forma de bacilos; d) VZ2(73-96), bacilos exibindo fluorescência; e) VZ3(145-168), bacilos livres; f) VZ3(145-168), bacilos livres; g) TP1(193-216), predominância de bacilos; h) TP1(193-216), bacilos exibindo fluorescência. Microscopia de contraste de fase (aumento 1250 vezes)..... 127
- Figura 31 - Fotomicrografias das culturas metanogênicas purificadas, a saber: a) VZ2 (73-96), células em formato de bacilos; b) VZ3(145-168), bacilos, e cocos. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) (aumento de 4.000 x)..... 128
- Figura 32 - Fotografia DNA metagenômico extraído das amostras de solo de várzea da Amazônia Oriental (Santarém - PA). VZP1: várzea, 00-20 cm; VZP2: várzea, 20-40 cm; VZP3: várzea, 40-70 cm; VZP4: várzea, 70-100 cm. PM: Padrão Molecular - λ Hind..... 130

- Figura 33 - Freqüência relativa de seqüências de 16S rDNA encontradas de filos nas camadas 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4) em solo de várzea da Amazônia Oriental (Santarém - PA), classificadas com o RDP Classifier com limite de confiança de 95% (a), e desconsiderando-se valor de limite de confiança (b)..... 132
- Figura 34 - Freqüência relativa de seqüências de 16S rDNA encontradas de *Archaea* (a) e de filos (b) em todas as seqüências analisadas do solo de várzea da Amazônia Oriental (Santarém - PA). As seqüências foram classificadas com o RDP Classifier com limite de confiança de 95%. VZ: Todas as seqüências do solo de várzea..... 133
- Figura 35 - Curva de rarefação gerada do gene 16S rRNA das bibliotecas de clones de solo de várzea amazônica (Santarém - PA), nas profundidades: a) 00-20 cm (VZP1); b) 20-40 cm (VZP2); c) 40-70 cm (VZP3); e d) 70-100 cm (VZP4)..... 165
- Figura 36 - Número de filotipos de *Archaea* estimado para diferentes distâncias evolutivas em solo de várzea amazônica (Santarém - PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4). Dados estimados com o estimador não-paramétrico Chao1. As barras representam os intervalos de confiança (95% de probabilidade)..... 166

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Reações de conversão e os respectivos valores de energia livre.....	34
Tabela 2 -	Principais coenzimas presentes nas arqueias metanogênicas.....	37
Tabela 3 -	Características físicas das amostras de solo (Análises realizadas no laboratório de Solos da ESALQ/USP, Piracicaba, SP).....	52
Tabela 4 -	Características químicas das amostras de solo (Análises realizadas no laboratório de Solos da ESALQ/USP, Piracicaba, SP).....	53
Tabela 5 -	Composição do Meio Basal Zinder.....	56
Tabela 6 -	Composição da solução Traço de Metais Vazoller (1995), utilizada no meio de cultivo Rondônia, e a solução Traço de Metais Zinder, utilizada no meio de cultivo Zinder.....	57
Tabela 7 -	Composição da solução de vitaminas para crescimento de arqueias metanogênicas.....	59
Tabela 8 -	Leitura da produção de gás metano ao longo do tempo - Diluições decimais seriadas das amostras enriquecidas de solo de várzea.....	84
Tabela 9 -	Leitura da produção de gás metano em função do tempo do ensaio - Diluições decimais seriadas das amostras enriquecidas de terra firme.....	85
Tabela 10 -	Descrição dos morfotipos das colônias obtidas pela técnica de <i>roll-tube</i> de solos de várzea e terra firme da Amazônia Oriental.....	88
Tabela 11 -	Valores da produção de gás metano (%), origem dos sub-cultivos de culturas metanogênicas de solo de várzea da Amazônia Oriental em frascos HUNGATE®	91
Tabela 12 -	Produção de gás metano (%) de sub-cultivos de culturas metanogênicas de solo de terra firme da Amazônia Oriental em frascos HUNGATE®	92
Tabela 13 -	Descrição das morfologias das colônias isoladas de solos de várzea e de terra firme da Amazônia Oriental obtidas na primeira e segunda purificações pelo método do <i>Roll-Tube</i>	94
Tabela 14 -	Descrição das morfologias das colônias isoladas de solos de várzea e de terra firme da Amazônia Oriental selecionadas do subcultivo em meio Zinder líquido.....	97

Tabela 15 -	Descrição dos cultivos de arqueias metanogênicas utilizadas para extração de DNA e amplificação do gene <i>mcrA</i>	100
Tabela 16 -	Identificação dos cultivos selecionados com base em produção de metano e amplificação do gene <i>mcrA</i> para a construção de mini-bibliotecas de clones do gene 16S rRNA.....	102
Tabela 17 -	Fragmentos do gene 16S rRNA observados por meio da técnica ARDRA <i>in silico</i> pela ferramenta NEBcutter do site REBASE e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo Blast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de arqueias metanogênicas isoladas em solos da Amazônia Oriental (Santarém e Belterra - PA).....	117
Tabela 18 -	Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de <i>Archaea</i> encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4).....	136
Tabela 19 -	Índices de diversidade de <i>Archaea</i> e estimativas de número de UTOs e cobertura de amostragem para as amostras de solo de várzea amazônica (Santarém - PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4).....	164
Tabela 20 -	Valores de ‘p’ calculado nas comparações múltiplas entre bibliotecas de 16S rDNA das comunidades de <i>Archaea</i> usando o programa S-libshuff.....	167

1 INTRODUÇÃO

A Amazônia possui dois tipos principais de ecossistemas: os frequentemente inundados e os de terra firme. As florestas inundadas ocupam cerca de 20% do bioma Amazônico, tendo como principal característica a flutuação cíclica dos rios, que podem atingir até 14 m, entre as estações de seca e enchente, com inundações periódicas de grandes áreas ao longo de suas margens, resultando em uma grande adaptação de plantas e animais que vivem nestes ecossistemas (várzeas e igapós). Os solos de várzea situam-se a margem dos rios de água branca e são sazonalmente inundados. A terra firme situa-se em sedimentos terciários localizados acima do nível de inundação dos rios e apresenta solos predominantemente ácidos, lixiviados e pobres em elementos essenciais. Na terra firme, encontram-se também solos de sítios arqueológicos que foram modificados pela ação humana pré-histórica.

As várzeas tropicais são as maiores fontes naturais de metano para a atmosfera, contribuindo com cerca de 60% de todas as emissões naturais (BARTLETT; HARRISS, 1993). A bacia do Rio Amazonas cobre uma grande porção dos trópicos úmidos, e a rede de drenagem deste rio excede a extensão de mais de um milhão de quilômetros quadrados (JUNK, 1997). As grandes várzeas da bacia Amazônica são as maiores fontes naturais de metano desta região, e estima-se que sua contribuição para as emissões totais de áreas alagadas no mundo seja da ordem de 5% (DEVOL et al., 1990).

Nestas áreas inundadas, a microbiota do solo contribui com a geração dos gases dióxido de carbono e metano para a atmosfera através dos processos aeróbios e anaeróbios de decomposição da matéria orgânica (BARTLETT; HARRIS, 1993). O metano é produzido pelas arqueias metanogênicas, pela degradação anaeróbia da matéria orgânica. As arqueias metanogênicas são microrganismos anaeróbios obrigatórios, que requerem condições anóxicas de crescimento, e altamente redutoras. Elas convertem uma extensão relativamente limitada de substratos simples para metano, desta forma, em habitats com substratos orgânicos complexos, interagem com outros microrganismos anaeróbios que catabolizam substratos complexos em substratos simples (ZINDER, 1993). Estes microrganismos são responsáveis pela produção de CH₄ em uma ampla variedade de habitats anaeróbios, incluindo sedimentos marinhos e de água

doce, pântanos, solos inundados, lençóis de água, charcos, habitats geotérmicos, trato gastrointestinal de animais e biorreatores anaeróbios.

O metano, assim como o dióxido de carbono e o óxido nitroso, é um importante gás traço da atmosfera. A habilidade do metano em absorver a irradiação infravermelha faz dele um gás 20 a 30 vezes mais eficiente que o dióxido de carbono como um gás de efeito estufa (HOUGHTON, 1994). Desde o início da Revolução Industrial, a concentração de metano na atmosfera aumentou de um valor de aproximadamente 715 ppb para 1732 ppb nos 1990s, e para 1774 ppb em 2005. A concentração atmosférica do metano em 2005 excede em muito a escala natural dos últimos 650.000 anos (320 ppb a 790 ppb), como determinado pelas geleiras eternas. As taxas de crescimento declinaram desde os 1990s, consistentes com as emissões totais (soma de fontes antropogênicas e naturais), que são quase constantes durante este período. É bem provável que o aumento observado na concentração do metano se deva às atividades antropogênicas, predominantemente a agricultura e o uso de combustível fóssil, mas as contribuições relativas dos diferentes tipos de fontes não são bem determinados (IPCC, 2007).

Ainda que se tenham muitas incertezas sobre a real dimensão das conseqüências do aquecimento global, existem cada vez mais evidências dos efeitos da emissão de gases de efeito estufa sobre o clima global.

Devido às suas grandes dimensões de áreas alagáveis, a planície amazônica tem um papel fundamental no fluxo do metano. Vários estudos têm sido desenvolvidos sobre as emissões de metano nesta região (KOSCHORRECK, 2000; MELACK et al., 2004; DAVIDSON; ISHIDA; NEPSTAD, 2004). Contudo, ainda se faz necessário determinar se estas emissões são devidas à queima da biomassa e combustíveis fósseis, ou se são de origem microbiana.

Este é o primeiro trabalho que estudou a diversidade das arqueias produtoras de metano em uma várzea amazônica, bem como isolou e identificou alguns destes microrganismos, tanto em solo de várzea, quanto em terra firme. O objetivo deste trabalho foi estudar a comunidade de arqueias metanogênicas presentes em solos de várzea e terra firme, na região de Santarém, PA, por métodos de isolamento e cultivo e técnicas moleculares.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Solos da Amazônia

Na Amazônia brasileira predominam, pela superfície que ocupam, dois padrões de solos, os de terra firme (87%), com pH variando de 4,5 a 6,5 e, normalmente, pobres em cálcio; e os de várzea (13%), situados às margens dos rios com influência constante das marés (NASCIMENTO; HOMMA, 1984).

2.1.1.1 Solos de Várzea

De acordo com sua coloração, os rios amazônicos podem ser classificados em três categorias: rios de águas brancas, como os rios Amazonas, Madeira e Jamari, águas claras tais como os rios Tapajós e Tocantins e, águas pretas como, por exemplo, os rios Negro e Uatumã. A várzea refere-se à planície de inundação existente nas margens dos rios de água branca. Formada pela sedimentação da matéria orgânica em suspensão, durante o último período glacial, a várzea apresenta solos férteis e estende-se do leito do rio até a terra-firme, numa largura variável entre 20 e 100 km. Os solos de várzea não apresentam boas propriedades físicas, mas têm elevada fertilidade, por causa das sucessivas deposições de sedimentos, e pH de 4,5 a 5,5 (FEARNSIDE, 1985).

Os solos de várzea são sazonalmente inundados. A inundação anual na várzea deposita uma camada nova de sedimento fértil e deixa a terra livre de invasores e de pragas pelo menos uma vez por ano, no momento em que a água recua (FEARNSIDE, 1985). As propriedades ópticas e a natureza geoquímica destes solos refletem as diferenças geomorfológicas e pedológicas das áreas de captação, que lhes proporcionam diferentes teores de sais minerais e sedimentos. Os solos hidromórficos ocupam áreas planas, baixas, de formação sedimentar recente, que margeiam os rios e apresentam extensões de alguns quilômetros de largura. Essas áreas, ao longo do Rio Amazonas e seus afluentes, são distinguidas em várzea alta, várzea baixa e igapó (FALESI, 1972).

Os principais solos hidromórficos encontrados na Região Amazônica, segundo Falesi (1986) são os *Plintossolos ou Lateritas Hidromórficas*, normalmente de baixa fertilidade;

Gleissolos háplicos, Gley Pouco Húmico ou Gley Húmico, resultante do acúmulo de sedimentos e, por isso, de fertilidade média a alta; *Esposossolos ou Podzol Hidromórfico*, de baixa fertilidade e excessivamente ácidos.

Os Gleissolos compreendem solos hidromórficos, constituídos por material mineral, com horizonte Glei dentro dos primeiros 50 cm da superfície do solo ou dentro de 50 e 125 cm de profundidade, desde que imediatamente abaixo de horizontes A ou E, ou precedidos de horizonte B incipiente, B textural ou com presença de mosqueados abundantes com cores de redução. Estes solos são permanentes ou periodicamente saturados com água, salvo se artificialmente drenados. Caracterizam-se pela forte gleização resultante da ação do regime de umidade redutor, que se processa em meio anaeróbico, devido ao encharcamento do solo por longo tempo ou durante todo ano (RODRIGUES et al., 2001).

Na região do Planalto de Belterra, município de Santarém encontra-se a Planície Aluvial constituída por extensas áreas de acumulação de sedimentos quaternários nas margens do Rio Amazonas, os solos são os hidromórficos, de origem sedimentar, e ocorrem em áreas de relevo plano de várzea (RODRIGUES et al., 2001).

A floresta de várzea, cuja vegetação ocorre ao longo dos rios e das planícies inundáveis, normalmente apresenta menor diversidade do que a terra firme e abriga animais e plantas adaptados a condições hidrológicas sazonais. Nas várzeas do estuário amazônico são encontradas quantidades expressivas de pequenas áreas desmatadas pelos moradores ribeirinhos para utilização com agricultura de subsistência, em pequena escala (cana-de-açúcar, arroz, milho, banana, pastagem), as quais são abandonadas após um curto período de utilização.

2.1.1.2 Terra Firme - Solos de Sítios Arqueológicos

Os solos de sítios arqueológicos são comumente encontrados na Amazônia. São em sua maioria solos de terra firme, e foram modificados pela ação humana pré-histórica (KERN et al., 2003). Apresentam horizonte A escurecido ou mais claros, valores de carbono orgânico elevados, e podem ou não ser solos eutróficos (alta saturação de bases) (KERN, 2005¹). A Terra Preta Antropogênica (TPA) ocorre somente em sítios arqueológicos na região amazônica, são solos de origem antrópica foram enriquecidos em nutrientes, provavelmente pelo manejo de restos orgânicos e do fogo pelas populações pré-colombianas (DENEVAN, 1976; SMITH, 1980). As

¹ Dra. Dirse Clara Kern, Museu Goeldi. Comunicação pessoal.

Terras Pretas (TP) mostram tipicamente um horizonte A espesso, de cor escura, elevados teores de fósforo, cálcio e alguns micronutrientes, como o manganês e o zinco (SOMBROEK, 1966; KERN; KÄMPF, 1989).

Considerando a frequência de TP em diferentes ecossistemas e tipos de solo, acredita-se que o homem pré-histórico que produziu estes solos teve condições de se adaptar a habitats diferentes, embora MEGGERS (1971) sugira a adaptação diferencial das populações aos habitats de terra firme e várzea. Esse autor sugere que a densidade populacional e a complexidade sócio-política dos grupos que ocupavam as várzeas eram maiores do que nos grupos que ocupavam a terra firme. Esta afirmação hoje não pode ser aceita ou rejeitada, uma vez que a maioria dos locais de várzea já foram “lavados” ou cobertos com sedimentos frescos (KERN et al., 2003).

a. Terra Preta (TP)

Estes solos ocorrem em manchas redondas isoladas (FALESI, 1972) de diferentes dimensões. As áreas de Terra Preta são consideradas pequenas, com cerca de 2 a 3 hectares (SMITH, 1980), mas é encontrada ocasionalmente em áreas maiores, como no caso da Estação Científica Ferreira Penna, Floresta Nacional de Caxiuanã (PA), onde se podem encontrar terras pretas numa extensão com mais de 100 ha. Apesar da grande quantidade de sítios arqueológicos já conhecidos, não se tem um mapeamento de todas as ocorrências de TP na Amazônia. A estimativa é que ocorram centenas de sítios espalhados pela região, podendo cobrir aproximadamente 10% da bacia Amazônica (www.museu-goeldi.com.br).

A camada de TP possui em média 40 a 60 cm, alcançando ocasionalmente até 2 m de profundidade (Smith, 1980). Estes solos apresentam coloração escura, altos teores de substâncias húmicas, e visível distribuição de fragmentos de cerâmica e artefatos líticos. São encontradas sobre os mais diferentes tipos de solos, como latossolos, podzóis, podzólicos e terra roxa estruturada (SMITH, 1980; KERN, 1988; KERN; KÄMPF, 1989).

As TPs apresentam alta fertilidade no horizonte A antrópico (Au), especialmente quando comparadas aos solos circunvizinhos altamente intemperizados e de baixa fertilidade (Figura 1a). Os solos com TP possuem teores significativamente mais elevados de cálcio (Ca), magnésio (Mg), fósforo assimilável (P) zinco (Zn), manganês (Mn), cobre (Cu), bem como capacidade de troca catiônica (CTC), saturação de bases (Valor S), em relação às áreas adjacentes que não possuem o horizonte A antrópico. A saturação por alumínio (Al^{3+}) e ferro (Fe_0) é baixa e o pH do

solo é mais favorável do que em solos adjacentes (KERN; KAMPF, 1989). No horizonte B, embora o nível de nutrientes seja inferior em relação ao horizonte A antrópico, é superior aos solos dominantes na região Amazônica. A concentração do carbono orgânico nos horizontes superficiais, e em muitos casos até maiores profundidades, em TPs é também, em geral, maior do que em solos circunvizinhos (Figura 1b).

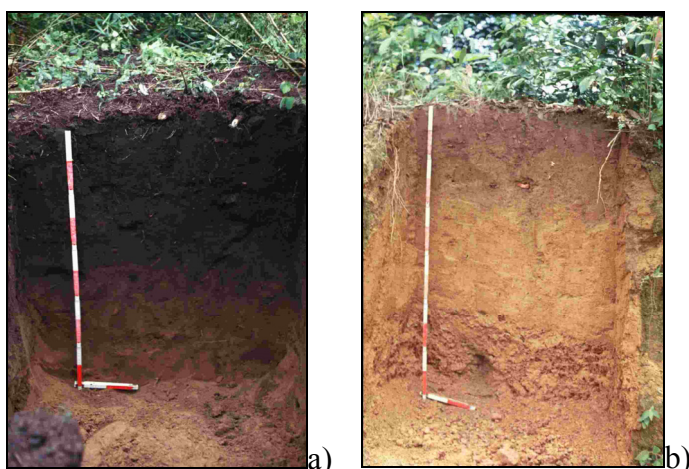


Figura 1 - (a) Perfil de Terra Preta e (b) Perfil de Oxissol

Fonte: GLASER et al., 2001.

Em geral, não há diferença substancial entre a fertilidade de TPs sob vegetação natural de floresta e sob cultivo agrícola. Como anteriormente comentado, aparentemente, as TPs formam microecossistemas próprios, que não se esgotam rapidamente, mesmo nas condições tropicais em que estão expostos ou sob uso agrícola. A matéria orgânica nas TPs chega a ser 6 vezes mais estável em relação aos solos adjacentes que não apresentam o horizonte superficial A antroprópico (PABST, 1991; GLASER et al., 2001). A elevada fertilidade e, principalmente, a sustentabilidade desses solos são devidas ao elevado nível de matéria orgânica, bem como de suas peculiares propriedades físico-químicas. Uma proporção significativa do carbono orgânico nas TPs, entre 35-45%, está na forma de carbono pirogênico (GLASER et al. 1998, 2000), se comparada aos 14% dos solos circunvizinhos sem horizonte A antrópico. O carbono pirogênico (“black carbon”) é altamente resistente à oxidação termal, química e até à foto-oxidação (SKJEMSTAD et al., 1996; WOLBACH; ANDERS, 1989). Embora essa forma de carbono sofra alguma degradação natural (BIRD et al., 1999), a sua incorporação no solo é um mecanismo importante de seqüestro de

carbono (SCHMIDT; NOACK, 2000). Por estas razões, estas áreas são utilizadas pelo pequeno produtor da Amazônia, que consegue obter altas produtividades, mesmo sem a utilização de insumos ou com a utilização de uma quantidade bem menor de fertilizantes.

Existem várias hipóteses quanto à formação das TPs, uma delas é que são originadas de eventos geológicos, como cinzas vulcânicas, decomposição de rochas vulcânicas ou a partir de sedimentos depositados em fundos de lagos extintos (FALESI, 1972). Uma outra hipótese, refere-se à formação das TPs em função da incorporação intencional de nutrientes ao solo (*plaggen epipedon*) através de práticas de manejo, como queimadas. A proposição mais aceita, entretanto, diz que as TPs teriam sido formadas não intencionalmente pelo homem pré-histórico (WOODS; McCANN, 2001). Segundo Smith (1980), a existência de TPs em grandes números na bacia Amazônica fornece evidência forte que as populações indígenas (Ameríndios), antes do contato com os europeus, eram grandes e assentadas, particularmente ao longo dos rios. Denevan (1976) e Smith (1980) estimaram em 6,8 milhões ou mais o número total de índios na região no final do século XV. Nestes assentamentos acumulavam-se resíduos de origem vegetal (folhas e talos de palmeiras diversas, cascas de mandioca, sementes, etc.) e de origem animal (ossos, sangue, gordura, fezes, carapaças de quelônios, conchas, etc.), além de uma grande quantidade de cinzas e resíduos de fogueiras (carvão vegetal). Como resultado dos resíduos orgânicos acumulados nestes assentamentos formou-se um material orgânico estável com microecossistemas próprios, que ainda hoje se auto-sustentam e não conseguem se decompor, por isso não se exaurem facilmente.

Os grupos indígenas e assentamentos da Amazônia cultivam as TPs principalmente na forma de agricultura de subsistência. Os caboclos preferem TPs para cultivar principalmente produtos de mais alto valor econômico (SMITH, 1980). Por mais de um século a TPA tem sido utilizada basicamente com o cultivo anual de feijão, mandioca, milho, hortaliças, além de mamão, banana, frutas cítricas, abacate e, mais recentemente, em agroecossistemas em consórcio de banana, abacate, café, mamão, entre outras combinações, incluindo pastagens.

b. Terra Mulata (TM)

Em alguns casos, os sítios de TP são cercados por uma faixa larga de solos de conhecidos como Terra Mulata (TM), considerados como solos “transicionais”. As TMs são solos de cor escura, marrom acinzentados em seus horizontes superiores. Possuem teores inferiores que a TP de fósforo, pouco ou muito poucos artefatos, porém níveis da matéria orgânica mais elevados que

em comparação com os solos não perturbados da floresta (KERN et al., 2003). No estado do Pará as TMs foram descritas por Sombroek (1966) na região oeste de Santarém, e algumas áreas de Santarém e Belterra, por McCann (1999), dentre outras regiões.

Alguns autores (SOMBROEK, 1966; McCANN, 1999) consideram como áreas pré-Colombianas os campos agrícolas em torno das aldeias principais, em uma área situada entre a propriedade da aldeia dos sítios de TPA e os solos inalterados da floresta. Onde o aumento da matéria orgânica do solo e da fertilidade mineral da propriedade indígena deve acontecer acidentalmente, as áreas TM deveriam ser resultado da intenção ou da aplicação intencional de estrume humano ou animal, restos de conchas de molusco trituradas. Isto iria permitir um tipo horticultural semi-permanente de produção de alimento, uma vez que uma parte do solo da floresta tem sido vigorosamente removido com machados, e queimadas subsequentes. Poucos solos de TM foram sistematicamente descritos e analisados, por isso sua distinção em termos quantitativos dos solos de TPA e dos solos naturais. A sua ocorrência na região de Santarém e Belterra, associada com TPA já é conhecida (KERN et al., 2003).

c. Localização da Terra Preta e Terra Mulata

As Terras Pretas estão distribuídas em vários países da América Latina, como Colômbia, Peru, Venezuela, Guianas e Brasil. A parte brasileira da região Amazônica não é homogênea e apresenta diferenças notáveis, que permitem a subdivisão da região em 33 eco-regiões no Brasil e 17 paisagens principais na região Amazônica como um todo, com características bióticas e abióticas distintas. Apesar disso, a intensidade de ocupação e a complexidade cultural supostamente são resultados da disponibilidade de recursos que permitiram a ocupação de um mesmo local por um longo período de tempo por grupos humanos, levando a uma ampla distribuição de TPA na região Amazônica (KERN et al., 2003).

Os sítios de TP são usualmente encontrados em terra firme, com solos bem drenados e sempre em uma localização geográfica que permitisse a visão das tribos vizinhas. Esta característica está certamente associada à segurança e sobrevivência dos grupos pré-históricos (KERN et al., 2003). Há uma predominância destes sítios próximos a fontes de água, tendo mais de 45% dos sítios localizados entre 5 e 25 m acima das fontes de água. Somente 4% dos sítios foram localizados em áreas distantes mais de 40 m de fontes de água, nas regiões de Oriximiná e

Santarém, no estado do Pará. Estes sítios arqueológicos são encontrados em platôs em locais de difícil acesso, porém, foram ocupados devido à pressão demográfica (KERN et al., 2003).

Na região de Belterra, as manchas de TP são em sua maioria menores que 0,5 ha, porém, podem atingir 15 ha. A transição entre a TP e o Latossolo é saliente e rápida, dentro de poucos metros, podendo, entretanto, ter uma zona de transição de algumas centenas de metros. O local de TP é facilmente localizado pela coloração escura do solo e da ocorrência de cacos de cerâmica, porém, ocorrem também manchas de Terra Preta sem cerâmica indígena (PABST, 1991).

2.1.2 Produção de metano em ambientes tropicais

O metano (CH_4) absorve 20-30 vezes mais moles de irradiação infravermelha por mol que o dióxido de carbono (CO_2), o que faz com seu potencial de aquecimento seja 24,5 vezes maior que o do CO_2 , que é um dos principais contribuintes para o efeito estufa (HOUGHTON, 1994). A concentração atmosférica média do metano em 1990 era estimada em 1,7 ppmv1 (BREAS et al., 2002), com uma taxa de crescimento anual de 0,4% (SOWERS et al., 2005). O tempo de residência do metano na atmosfera é cerca de 8 anos (OREMLAND, 1988). Alterações na concentração de metano na atmosfera têm conseqüências importantes para o meio ambiente, como aumento da temperatura na troposfera, aumento das taxas de formação do ozônio e mudanças nas relações de radicais importantes incluindo vapor d'água e radicais de cloro (MARTENS et al., 1986). Além do metano, as emissões de dióxido de carbono, monóxido de carbono (CO), óxido nitroso (N_2O), e óxidos de nitrogênio (NO_x), são importantes contribuidores para o aquecimento global.

Dada à gravidade deste quadro, em 1992 foi criada a Convenção Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima (United Nations Framework Convention on Climate Change - UNFCCC), durante a Convenção das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento, com o objetivo de formular e implementar programas para mitigar a mudança climática. Em 1997, na terceira Conferência das Partes, criou-se um dos mais importantes instrumentos da política global sobre a mudança do clima, o Protocolo de Kioto. Em 2007, a ONU (Organização das Nações Unidas) divulgou o mais recente relatório sobre as alterações climáticas globais.

O metano é liberado para a atmosfera a partir da superfície terrestre, onde os processos biológicos são responsáveis por aproximadamente 80% da emissão global, e os restantes 20%

devem-se aos processos de extração e distribuição de gás natural e carvão, e à queima de combustíveis fósseis. Entre as principais fontes de metano para a atmosfera estão as emissões antropogênicas relacionadas com a degradação da matéria orgânica na forma de resíduos domésticos e industriais, a queima da biomassa e combustíveis fósseis e as áreas alagadas (ALVALÁ et al., 1999).

As áreas alagáveis são uma das maiores fontes geradoras do metano encontrado na atmosfera terrestre contribuindo com cerca de 70% do total emitido, o que corresponde a cerca de 100 TgCH₄ ano⁻¹. Em termos globais, as áreas alagadas estão concentradas nas regiões de altas latitudes do Hemisfério Norte e nas regiões tropicais, entre 20°N e 30°S. Embora as áreas tropicais compreendam somente 35% das áreas alagadas, sua contribuição anual é estimada em 42 Tg CH₄/ano (BARTLETT; HARRIS, 1993), o que corresponde a 36,5% do total emitido por essa fonte, sendo o restante dividido entre as áreas alagadas nas regiões subtropical, temperada e boreal, evidenciando assim a sua grande importância no balanço global desse gás (ALVALÁ et al., 1999).

Nas áreas alagadas, a produção de metano ocorre pela degradação da matéria orgânica por um grupo especializado de arqueias anaeróbias que produzem metano. A quantidade de metano expelida pelas arqueias metanogênicas pode ser de 400 ton³/ano (cerca de 50 litros por dia) (<http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/archaea/archaea.html>).

A Bacia Amazônica abrange uma grande porção dos trópicos úmidos e a rede de drenagem excede a extensão de mais de um milhão de quilômetros quadrados (JUNK, 1997). Desta forma, a floresta amazônica tem recebido atenção da comunidade científica internacional no que tange ao aquecimento global. Vários estudos têm sido conduzidos sobre a emissão de metano na região Amazônica (KOSCHORRECK, 2000; MELACK et al., 2004; DAVIDSON; ISHIDA; NEPSTAD, 2004). Exemplo disso é o Experimento de Larga Escala da Biosfera-Atmosfera da Amazônia (LBA), um projeto multinacional que visa elucidar o funcionamento climático e bioquímico da Floresta Amazônica. Em maio de 2004, a revista *Global Change Biology* publicou uma edição especial com resultados sobre as emissões de gases de efeito estufa na Amazônia.

Melack et al. (2004) avaliaram o fluxo de metano combinadas com técnicas de geoprocessamento (medidas da variação temporal e espacial das áreas inundadas e da vegetação),

e estimaram o fluxo de metano para a várzea do Rio Amazonas em $1,3 \text{ TgC ano}^{-1}$. A extrapolação para a área total da bacia gerou o valor de 22 TgC ano^{-1} .

Geralmente, os dados de emissão de metano na Amazônia se referem ao período das cheias. Entretanto, menos que 25% das áreas alagáveis da Amazônia são permanentemente inundadas, em função da precipitação, alternando o período de inundação com períodos de solo seco. Como a produção de metano ocorre sob condições altamente redutoras, o regime de inundações intermitente promove a redução das emissões deste gás. Deste modo, Koschorreck (2000) estudou o fluxo de metano em sedimentos expostos em uma várzea amazônica, nos meses de outubro a janeiro. O autor verificou que a produção de metano foi geralmente alta durante a fase inicial do período seco, mas após um curto período de tempo, a produção de metano decresceu a valores próximos a zero. Dois mecanismos foram propostos para a redução do fluxo de metano nos sedimentos expostos: primeiramente, o fluxo é extremamente reduzido devido à obstrução da ebulição do gás pelo sedimento seco. Em um segundo momento, o fluxo de metano da zona reduzida decresce gradualmente durante a fase seca. Com base nos resultados, o autor considera que os sedimentos de várzea durante a época seca são fontes negligenciáveis de metano para a atmosfera.

Devemos considerar que as florestas de terra firme correspondem a 80% da área total da Amazônia, e os solos de florestas tropicais atuam como sorvedouros de metano (CH_4) da atmosfera. Nos solos, a oxidação microbológica ocorre em taxas estimadas de 32 T/ano (MELILLO et al., 1989). Embora as estimativas de oxidação de metano no solo representem uma pequena parcela das taxas de oxidação fotoquímica, a contribuição dos solos não saturados consiste na única via biológica oxidativa desse gás. Assim sendo, qualquer processo no solo que venha a diminuir estas taxas irá alterar significativamente as concentrações na atmosfera. Mesmo entre solos de terra firme, existem diferenças quanto à emissão de metano. Os solos arenosos tendem a consumir metano, pois são mais porosos do que os solos argilosos, favorecendo dessa forma, a drenagem da água da chuva e maior penetração do oxigênio atmosférico. Portanto, estes solos estão mais sujeitos aos processos aeróbicos e conseqüentemente maior consumo de metano. Já os solos argilosos, por serem mais compactos, apresentam uma drenagem menor, o que favorece a degradação da biomassa sob condições anaeróbicas. Nesse caso, ocorre produção de metano e conseqüentemente maior emissão para atmosfera (SILVER et al., 2005).

Apesar dos significativos progressos sobre a emissão de metano na bacia amazônica em rios, represas, bem como indicações da ação microbiana na geração do gás, ainda pouco se tem estudado sobre a metanogênese microbiana nessa região.

2.1.3 Arquéias metanogênicas

Segundo a taxonomia Lineana tradicional, baseada em dados morfológicos e fisiológicos, as formas de vida na Terra eram classificadas em 5 reinos: *Animalia*, *Plantae*, *Fungi*, *Protista* e *Monera* (WHITTAKER, 1969). Em 1990, Carl Woese e colaboradores, pela análise de seqüências do ácido ribonucléico ribossomal (16S e 18S rDNA), propuseram uma nova classificação, baseada em dados moleculares e evidência genômica e bioquímica associada (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990).

Com base nos estudos filogenéticos de Carl Woese (WOESE, 1987) foi criado um novo nível taxonômico, denominado Domínio, e a classificação dos seres vivos passou a ser dividida em três Domínios: *Bacteria*, *Archaea* e *Eucarya* (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990), sendo os dois primeiros exclusivamente microbianos e compostos por células procarióticas, e o terceiro domínio (*Eucarya*) englobando todos os organismos eucariotos, incluindo os fungos, as microalgas e os protozoários. Estes três domínios teriam derivado de um hipotético ancestral comum de todas as células.

O Domínio *Archaea* é caracterizado por microrganismos procarióticos evolutivamente distintos dos microrganismos alocados no Domínio Bactéria em função das características de organização do genoma, expressão gênica, composição celular e filogenia (CANHOS; VAZOLLER, 1999). Os primeiros microrganismos pertencentes ao Domínio *Archaea* foram isolados de ambientes inóspitos ou nichos ecológicos especializados (BINTRIM et al., 1997). Estes ambientes extremos apresentavam temperaturas elevadas (próximas de 100°C), extrema acidez (pH 2,0), altas salinidades (10 - 15%) e ausência de oxigênio. Devido a estas condições serem semelhantes àquelas encontradas na origem da Terra, estes microrganismos foram considerados primitivos, e denominados originalmente de “arqueobactérias”. Esta denominação foi abandonada em 1990, por sugerir erroneamente a relação entre os Domínios *Archaea* e *Bacteria* (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990). Estudos de filogenia molecular (DeLONG 1992; PRESTON et al., 1996; UEDA; SUGA; MATSUGUCHI, 1995; BINTRIM et al., 1997)

vem mostrando que as arqueias são muito mais diversas e largamente distribuídas que os primeiros membros cultivados, restritos a ambientes extremos.

O Domínio *Archaea* é dividido em quatro filios: *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Korarchaeota*, e *Nanoarchaeota*. O filo *Crenarchaeota* inclui arqueias redutoras de enxofre hipertermófilas representadas por organismos dos gêneros *Dessulfurococcus*, *Pyrodictium*, *Sulfolobus*, *Thermococcus*, *Thermofilum* e *Thermoproteus*, compreendendo os organismos capazes de crescer nas maiores temperaturas conhecidas, embora já tenham sido isolados em ambientes frios, como águas oceânicas (KÖNNEKE et al., 2005). Por sua vez, o filo *Euryarchaeota* compreende uma grande diversidade de organismos halófilos extremos, hipertermófilos e metanogênicos. O filo *Korarchaeota* engloba organismos hipertermófilos ainda pouco conhecidos (BARNS et al., 1996). O filo *Nanoarchaeota* foi criado mais recentemente, proposto por Huber et al (2002), que identificaram em uma fenda termal no fundo do mar da Islândia uma espécie de *Archaea* com características bastante primitivas. O primeiro representante deste filo cultivado é a espécie *Nanoarchaeum equitans*, um hipertermófila de morfologia arredondada e tamanho diminuto com cerca de 400 nm de diâmetro, e genoma de cerca de 490 kb.

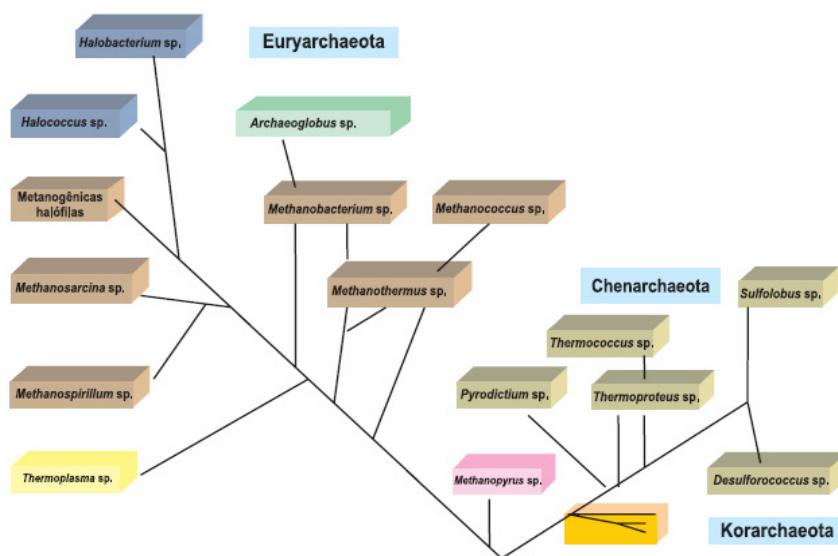


Figura 2 - Árvore filogenética do Domínio *Archaea*, baseada na análise das seqüências do 16S rRNA

Fonte: Adaptado de MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004.

As arqueias metanogênicas são o único grupo de microrganismos que, por sistemas enzimáticos únicos, é capaz de produzir metano como produto de seu metabolismo. São encontradas em diversos ambientes associadas à decomposição da matéria orgânica e/ou atividades geoquímicas. Atuam no passo final de consórcio microbianos presentes em uma ampla variedade de habitats anaeróbios, incluindo sedimentos marinhos e de água doce, pântanos, solos inundados, lençóis de água, charcos, habitats geotérmicos, trato gastrointestinal de animais e biorreatores anaeróbios. A metanogênese microbiana pode ter também algumas aplicações práticas, como tratamento anaeróbio de esgotos, produção de energia e biodegradação de compostos tóxicos, como compostos orgânicos aromáticos e halogenados (ZINDER, 1993).

Os nichos de desenvolvimento das metanogênicas, embora bastante diversos, devem atender às condições peculiares de crescimento destes microrganismos. As metanogênicas necessitam de condições extremamente rigorosas de anaerobiose, podendo crescer em um potencial de oxidação-redução de -200mV em seus habitats naturais, embora necessitem de -330 a -400 mV em cultivos controlados (SOWERS; SCHREIER, 1995). Além do oxigênio, o sulfato e o nitrato também podem inibir a metanogênese devido ao aumento do potencial de oxidação-redução. Quanto ao pH, a faixa ideal para o crescimento e a produção de metano está entre 6,8 e 7,2, embora possa crescer até pH 4,0. A temperatura para as culturas mesofílicas é de 15 a 40°C, e para as termofílicas, 55 a 65°C (ZINDER, 1993).

A morfologia das metanogênicas é comum às células procarióticas, sendo encontradas nas formas de bacilos de diferentes tamanhos, cocos, sarcinas e filamentos (CANHOS; VAZOLLER, 1999). Alguns representantes, como *Methanosarcina* sp. e *Methanobrevibacter* sp. apresentam altas concentrações da coenzima F₄₂₀ e autofluorescem em iluminação ultravioleta. Outras, como *Methanosaeta*, não possuem quantidades suficientes desta enzima para autofluorescer (DODDEMA; VOGELS, 1978; GORRIS; VAN der DRIFT, 1994).

As arqueias metanogênicas podem também apresentar propriedades de coloração Gram-positiva ou Gram-negativa, de acordo com a composição da parede celular. São encontradas três classes de parede celular em metanogênicas, de acordo com sua constituição predominante: *i.* Pseudomureína; *ii.* Camadas de proteína ou glicoproteína e; *iii.* Heteropolissacarídeos. Ainda, algumas espécies de metanogênicas possuem paredes mais complexas, compostas por mais de um dos componentes citados (JONES; NAGLE; WHITMAN, 1987). A grande variabilidade de

composição e estruturação da parede celular sugere que o ancestral comum seria desprovido de parede, sendo as diversas paredes resultantes de evolução independente, de acordo com os diferentes ambientes.

Apesar da grande variedade de características encontradas entre as metanogênicas, todas têm em comum o estilo de vida anaeróbio e a habilidade de produzir metano.

A primeira classificação taxonômica das arqueias metanogênicas foi realizada por Bryant, em 1974, na 8ª edição do “*Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology*”, e definia apenas uma Família, Methanobacteriacea, com três gêneros, *Methanobacterium*, *Methanosarcina* e *Methanococcus* (BRYANT, 1974). Com o maior número de espécies cultivadas e a classificação baseada no gene 16S rRNA, atualmente a classificação engloba um grande número de metanogênicas, provenientes de diferentes ambientes, descritos no “*Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*”, segunda edição, lançada em 2001. As arqueias metanogênicas representam um grupo de microrganismos polifilético, compreendendo 5 Ordens, 10 Famílias, e 25 gêneros (GARRITY; HOLT, 2001), descritos a seguir:

- Ordem *Methanobacteriales* contém duas famílias. Família *Methanobacteriaceae*, com quatro gêneros distintos morfológicamente. Inclui espécies encontradas em uma ampla variedade de ambientes, que são capazes de utilizar substratos como H₂:CO₂, 2-propanol, formiato e metanol para a produção de metano. A Família *Methanotermaceae* consiste de um único gênero de hidrogenotróficas termofílicas extremas.
- Ordem *Methanococcales* contém duas famílias, *Methanococcaceae*, e *Methanocaldococcaceae*, e quatro gêneros de hidrogenotróficas provenientes de ambientes marinhos e litorâneos. A maioria das espécies é capaz de produzir metano utilizando tanto H₂ como formiato como doadores de elétrons.
- Ordem *Methanomicrobiales* que compreende três famílias e nove gêneros de metanogênicas hidrogenotróficas. A Família *Methanomicrobiaceae* possui representantes isolados de vários ambientes, como o rúmen e os sedimentos marinhos. A Família *Methanocopusculaceae* consiste de três gêneros que utilizam H₂:CO₂ e formiato como substrato. A Família *Methanospirillaceae* é uma nova Família, com apenas um gênero. São encontradas em vários ambientes e utilizam diferentes doadores de elétrons para a metanogênese de CO₂.

- Ordem *Methanosarcinales*. Reúne todos acetotróficos, e/ou metilotrófico em duas famílias. Família *Methanosarcinaceae* contém seis gêneros de metanogênicas bastante versáteis de vários ambientes, e que utilizam $H_2:CO_2$, acetato ou compostos metil como substrato. A Família *Methanosaetaceae* compreende um gênero de metanogênica acetotrófica obrigatória.
- Ordem *Methanopyrales* compreende metanogênicas hipertermofílicas, e contém uma única Família, *Methanopyraceae*, e uma única espécie, *Methanopyrus kandleri*.

Além das espécies consideradas no âmbito do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, existem centenas de seqüências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) relacionadas às arqueias metanogênicas, contudo, não se conhece com precisão as possíveis novas espécies.

A degradação da matéria orgânica complexa nos ecossistemas anaeróbios se processa sequencialmente, em direção aos compostos simplificados, através do metabolismo de diversos grupos de microrganismos. A matéria orgânica primeiramente é decomposta por processos aeróbios, depois é atacada anaerobiamente por bactérias facultativas e/ou anaeróbias, que convertem os orgânicos complexos em outros compostos, como carboidratos, proteínas e lipídios, que são então hidrolisados, fermentados e biologicamente convertidos em materiais orgânicos mais simples. Os compostos resultantes são reduzidos pelas arqueias metanogênicas a metano (FERRY, 1999).

A Figura 3 apresenta um esquema identificando as cinco etapas da fermentação de produtos a metano, conhecida por digestão anaeróbia.

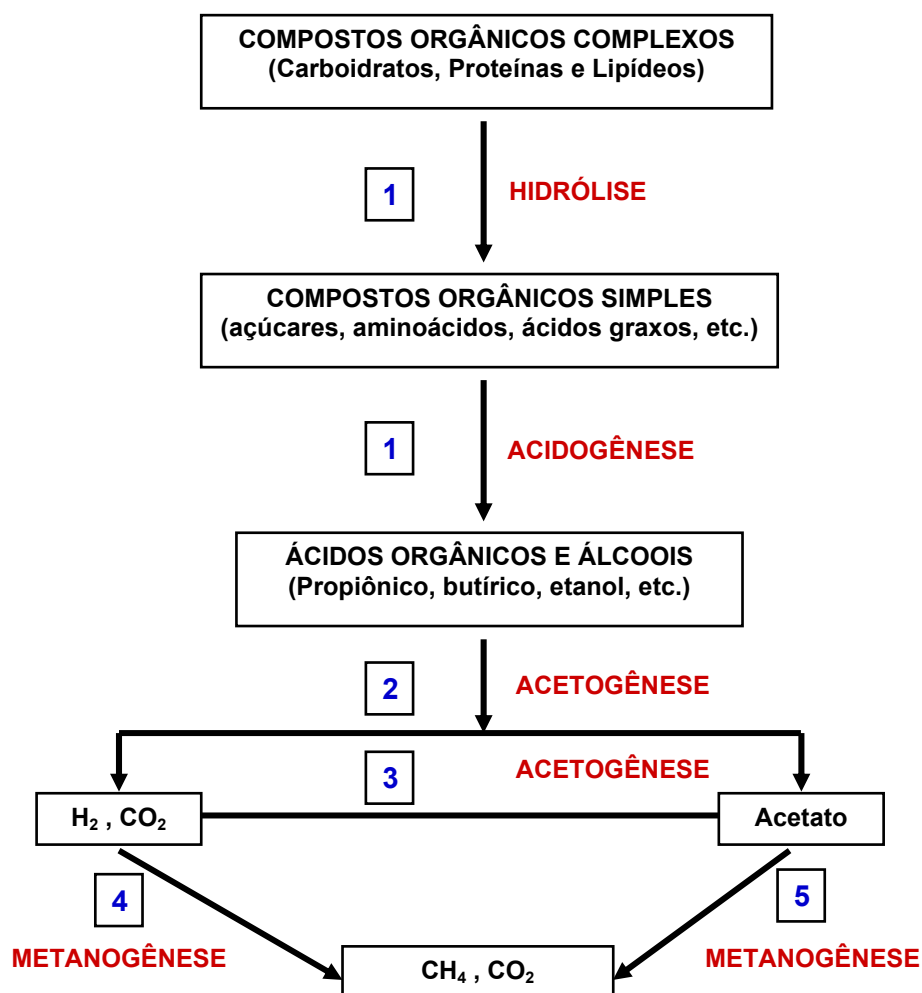


Figura 3 - Etapas metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia: 1. Bactérias fermentativas hidrolíticas; 2. Bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio; 3. Bactérias acetogênicas consumidoras de hidrogênio; 4. Arquéias metanogênicas redutoras de dióxido de carbono; 5. Arquéias metanogênicas que descarboxilam o acetato

Fonte: Adaptado de NOVAES (1986).

Na primeira etapa, compostos orgânicos complexos presentes no sistema são hidrolizados a unidades mais simples através da ação enzimática de bactérias hidrolíticas fermentativas. Em seguida, ocorre a fermentação dessas substâncias simples pelas mesmas bactérias, originando ácidos orgânicos, tais como valérico, butírico, propiônico e acético, álcoois como o etanol e o hidrogênio e o dióxido de carbono (NOVAES, 1986).

Nas etapas 2 e 3 ocorre a acetogênese, onde a produção de ácido acético e hidrogênio a partir dos ácidos orgânicos de cadeia carbônica maior que o acético, e do etanol é bastante intensa. Dois grupos de bactérias são os mais importantes para a ocorrência dessa etapa: as sintróficas e as redutoras de sulfato. As primeiras são organismos sintróficos obrigatórios, ou seja, seus produtos devem ser rapidamente utilizados por outros microrganismos para que as condições termodinâmicas do meio sejam mantidas, favorecendo seu equilíbrio metabólico. Seu principal produto é o hidrogênio. Um terceiro grupo de bactérias presentes na etapa acetogênica é o chamado homoacetogênico. São bactérias que metabolizam basicamente o hidrogênio e o dióxido de carbono, produzindo o ácido acético (VAZOLLER, 1989).

As duas últimas etapas, 4 e 5, correspondem à produção do metano, através da atividade metabólica das arqueias metanogênicas na redução do dióxido de carbono ou na degradação do ácido acético, pelas metanogênicas hidrogenotróficas e acetotróficas, respectivamente. Este passo promove a manutenção de baixos teores de hidrogênio no meio, e diminui a concentração do ácido acético, removendo prótons inibidores e estabilizando o pH (VAZOLLER, 1989).

Estima-se que a digestão anaeróbia com formação de metano seja responsável pela completa mineralização de 5 a 10% de toda a matéria orgânica disponível na terra. A completa mineralização da matéria orgânica em ambientes anaeróbios onde as concentrações de sulfato e nitrato são baixas ocorre através da fermentação metanogênica, que produz CH_4 e CO_2 , (LE MER; ROGER, 2001).

2.1.3.1 Metanogênese microbiana

A metanogênese microbiana é uma reação que proporciona um fluxo de prótons nas células e suporta um mecanismo quimiosmótico de produção de energia e ATP (VAZOLLER, 1995). As principais reações de conversão dos diferentes substratos realizadas pelas metanogênicas e os respectivos valores de energia livre estão na Tabela 1.

Tabela 1 - Reações de conversão e os respectivos valores de energia livre

Substrato	Reação	ΔG° (kJ / mol CH ₄)
Dióxido de carbono e hidrogênio	$\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	-130
Formiato	$4\text{HCOO}^- + 4\text{H}^+ \rightarrow 3\text{CO}_2 + \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	-134
Metanol	$4\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	-106
Acetato	$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	-32
Metilaminas	$4(\text{CH}_3)_3\text{NH}^+ + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 9\text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 4\text{NH}_4^+$	-76

Fonte: BLAUT (1994).

Apesar de requererem condições fastidiosas para seu crescimento e anaerobiose obrigatória, as necessidades nutricionais das metanogênicas são bastante simples. As metanogênicas são altamente específicas quanto à utilização de substratos para crescimento e metanogênese. São conhecidos 11 substratos para a metanogênese: acetato, piruvato, metanol, metilamina, dimetilamina, dimetilsulfeto, trimetilamina, metilmercaptana, formiato, monóxido de carbono, e, sendo universal o dióxido de carbono, que necessita de hidrogênio como doador de elétrons (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

De acordo com a categoria nutricional, as metanogênicas podem ser separadas em 3 categorias: Hidrogenotróficas, Metilotróficas e Acetotróficas (GARCIA; PATEL; OLLIVIER, 2000).

i. Hidrogenotróficas: A via hidrogenotrófica é a mais difundida, sendo encontrada em todas as ordens de arqueias metanogênicas. Estas metanogênicas oxidam o hidrogênio e reduzem o dióxido de carbono para a formação do metano, e é composta por sete passos centrais (REEVE et al., 1997). O formiato também pode ser convertido a metano por essa via, atuando como fonte de CO₂ e potencial redutor. Muitas metanogênicas, cerca de 38 espécies, são capazes de utilizar formiato e/ou hidrogênio e dióxido de carbono como fontes de energia, como *Methanobacterium formicicum*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanococcus voltae*, *Methanomicrobium mobile* e *Methanospirillum hungatei* (ZHENDER; INGVORSEN; MARTI, 1982; BLAUT, 1994; GARCIA; PATEL; OLLIVIER, 2000).

ii. Metilotróficas: É composta por 20 espécies que utilizam compostos metilados, como metanol, metilamina ou dimetilsulfeto para a produção de metano. Destas, 13 espécies pertencentes à Família *Methanosarcinacea*, são obrigatoriamente metilotróficas, capazes de utilizar metanol ou metilaminas como única fonte de energia (ZHENDER; INGVORSEN;

MARTI, 1982; GARCIA; PATEL; OLLIVIER, 2000). Entretanto, a espécie *Methanosphaera* sp., da Família *Methanobacteriaceae* também possui capacidade de utilizar compostos metilados como única fonte de energia, entretanto, apenas na presença de hidrogênio (MILLER; WOLLIN, 1985).

iii. Acetotróficas, que utilizam o grupo metila do acetato para produzir o metano. Na via acetoclástica, o acetato é dividido em um grupo metil e CO₂, subsequentemente oxidado para prover elétrons (MEUER et al., 2002). O grupo metil da degradação do acetato é ligado a metanopterina (ou sarcinapterina para *Methanosarcina*), antes de ser reduzido a metano em duas reações enzimáticas. Apesar de o acetato ser considerado um dos principais precursores do metano na natureza, poucas espécies, como *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp. são capazes de utiliza-lo como substrato para a metanogênese.

O acetato, o hidrogênio e o gás carbônico são gerados em ambientes ricos em matéria orgânica. Nos solos anaeróbios a produção de metano resulta de uma antagonista, porém correlata, atividade microbiana. O metano é produzido nas zonas anaeróbias do solo pelo metabolismo dos microrganismos metanogênicos e oxidado a CO₂ pelas bactérias metanotróficas (Le MER; ROGER, 2001). Nestes solos, a emissão do metano se dá por difusão molecular, um processo que depende principalmente da diferença de concentração entre o solo e a atmosfera (MARICK et al., 2002). Em áreas alagadas ou ecossistemas sedimentares, o metano é produzido fundamentalmente pela fermentação do acetato e pela redução do dióxido de carbono com o hidrogênio como fonte de elétron.

Em ambientes de água doce, onde a produção de sulfato pode ser considerada baixa, ocorre a produção de metano na superfície do sedimento via fermentação do acetato, dada a maior disponibilidade deste composto, o qual é proveniente da decomposição da matéria orgânica lábil que é derivada dos exudados das raízes das plantas na rizosfera. A produção de acetato e sua subsequente utilização são geralmente maiores na porção superior do sedimento, em relação às camadas mais profundas (WHITICAR, 1999).

O acetato é um dos principais intermediários da decomposição anaeróbia da matéria orgânica em ambientes de água doce (ZEHNDER; INGVORSEN; MARTI, 1982). Nesse ambiente, o conteúdo de metano gerado via redução do CO₂ é menor que o proveniente da fermentação do acetato. Essa última via é responsável por 30 a 70% da produção total de metano

em ambientes de água doce. Já em ambientes marinhos, a produção do metano ocorre fundamentalmente por redução do CO₂ (WHITICAR, 1999).

A alta especificidade quanto à utilização de substratos para crescimento e metanogênese, faz com que as arqueias metanogênicas sejam bastante dependentes da presença de outros microrganismos, cuja atividade no meio anaeróbio gera os precursores da metanogênese (BLAUT, 1994; VAZOLLER, 1995). A natureza das interações metanogênicas varia com os tipos de organismos envolvidos, como as substâncias químicas do meio e com os compostos orgânicos disponíveis. Essas interações das metanogênicas com outros anaeróbios podem ser sintróficas obrigatórias, desde que exista uma dependência mútua de sobrevivência, ou agrupamentos ocasionais, nos quais o crescimento de um ou mais membros não é dependente do crescimento de outros. Somente quando os substratos para a formação do metano estão no ambiente anaeróbio, porém não gerados pela atividade de outras bactérias, é que as metanogênicas se desenvolvem independentemente. Por exemplo, a produção de hidrogênio em sistemas aquáticos geotérmicos e em zonas de fendas geológicas.

Devido à metanogênese ser encontrada somente da divisão euriarqueal do Domínio *Archaea*, acredita-se que ela provavelmente originou-se neste filo. A produção biológica do metano requer pelo menos 25 genes em adição a mais de 20 proteínas bioquimicamente caracterizadas envolvidas na síntese de coenzimas. Genes codificando diferentes subunidades de 1 enzima tendem a ficar aglomerados no genoma, embora estes aglomerados e os genes codificados por monômeros ou homopolímeros sejam dispersos pelo genoma (REEVE; NOLLING; SMITH, 1997). O número de genes envolvidos, assim como seu arranjo genômico disperso, faz crer que a metanogênese tenha sido adquirida por transferência genética lateral.

Dentre estes genes, o gene *mcr* tem sido extensivamente estudado como marcador molecular (KLEIN et al., 1986; ALLMANSBERGER et al., 1986; BOKRANZ et al., 1988; WEIL et al., 1988; HALES et al., 1996; LUTON et al., 2002). Este gene codifica para a metil-coenzima M redutase (MCR). Este complexo enzimático é específico às arqueias metanogênicas, e aparentemente conservado em todos os metanogênicos (HALES et al., 1996).

A coenzima M (Co-M) é o menor cofator orgânico conhecido, mas é um transportador de grupo metil essencial para a metanogênese. A Co-M transporta moléculas de um carbono para serem posteriormente reduzidas a metano. A redução de geração de metano é catalizada pelo

sistema Metil-coenzima M redutase, que é o passo comum a todos os substratos metanogênicos. A MCR consiste de três subunidades arranjadas como $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ associadas com duas moléculas da coenzima F_{430} . Estas subunidades são codificadas pelos genes *mcrA*, *mcrB*, e *mcrG*, por α , β e γ , respectivamente. Em todos os casos, elas são arranjadas como uma única unidade transcricional, designada de operon MCR (ALLMANSBERGER et al., 1986; BOKRANZ et al., 1988). Alguns membros da ordem *Methanobacteriales* e *Methanococcales* possuem uma isoenzima adicional, a metil-coenzima M redutase II (MCRII).

Além da coenzima M, a metanogênese celular requer de uma série de enzimas específicas para as reações inerentes as diferentes vias de degradação a metano. São, portanto, enzimas peculiares e muitas delas extremamente sensíveis ao oxigênio. A coenzima ou fator 420 (F_{420}) é uma flavina (5-deazaflavina) envolvida é envolvida no transporte de elétrons e biossíntese de moléculas. Está presente na célula em quantidades entre 1,1 e 4,7 nM/mg de proteína. O F_{420} pode ser reduzido pelo hidrogênio e formiato, e provavelmente pelo metanol e acetato, e assim transferir elétrons para o NADP via a enzima NADP- F_{420} oxidoreductase (JONES; NAGLE; WHITMAN, 1987; ROUVIÉRE; WOLFE, 1988). Como já comentado, esta coenzima é também responsável pela fluorescência das metanogênicas sob luz ultravioleta (DODDEMA; VOGELS, 1978). O F_{430} é uma coenzima encontrada em todas as metanogênicas e também está envolvida na transferência de elétrons. Possui um níquel em sua estrutura tetrapirrólica (VOGELS; KELTJENS; DRIFT, 1988). Estas e outras enzimas necessárias à metanogênese são listadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Principais coenzimas presentes nas arqueias metanogênicas

Coenzimas	Função
Fator de Redução do Dióxido de Carbono (RDC)	Transportador de carbono a nível formil
Tetrahidrometanopterinina	Transportador do C_1 ao formil, metileno e nível metil
Coenzima M (ácido 2 - mercaptoetanosulfônico)	Transportador do C_1 ao nível metil
Fator III (5 - hidroxibenzimidazolilcobamida)	Transportador do C_1 ao nível metil
Fator F_{430}	Coenzima no passo terminal
Componente B	Coenzima no passo terminal
Coenzima F_{420} (5 - deazarriboflavina)	Transportador de elétron
Citocromos, Ferredoxina, FAD, ATP	Funções limitadas como coenzimas

Fonte: Adaptado de VOGELS; KELTJENS; DRIFT., 1988.

2.1.4 Cultivo e isolamento de linhagens de arqueias metanogênicas

Por muito tempo, o estudo de microrganismos anaeróbios estritos foi restringido pela falta de técnicas apropriadas de amostragem e cultivo. O conhecimento sobre os microrganismos anaeróbios deu-se graças ao desenvolvimento de procedimentos para a manipulação desses microrganismos em laboratório, na ausência de oxigênio. Os métodos tradicionais, como as jarras de anaerobiose, somadas às práticas microbiológicas comuns de preparo e inoculação de meios líquidos e sólidos foram bem sucedidos com microrganismos esporulantes, como é o caso do gênero *Clostridium*. Entretanto, muitas espécies de microrganismos anaeróbios estritos, que requerem ausência completa de oxigênio e potenciais de óxido-redução muito baixos, não resistem a tais procedimentos e exigem maiores cuidados para que possam ser cultivados e isolados (HOLLAND; KNAPP; SHOESMITH, 1987).

Os métodos para o cultivo e manipulação desses organismos demandam uma série de exigências na manutenção de anaerobiose estrita (99% de remoção do oxigênio). Hungate, em 1950, desenvolveu uma metodologia com os procedimentos possíveis para a remoção do oxigênio e preparação dos meios reduzidos, denominada “Técnica de Hungate” para manipulação de anaeróbios estritos (HUNGATE, 1950). A técnica consistia basicamente na fervura do meio para expelir O₂, e realização de toda a manipulação subsequente sob gás inerte, usualmente N₂ ou CO₂, ou uma mistura de ambos.

Hungate também concebeu a técnica de *Roll-Tube* (HUNGATE, 1969). O método de *roll-tube* compreende a adição de alíquotas das amostras em frascos contendo meio de cultivo com ágar ainda liquefeito, e toda a manipulação feita com o frasco em banho-maria, e somente solidificado quando girado em recipiente com água e gelo. O interior do tubo é revestido desse modo com uma fina camada de meio solidificado. Os frascos são incubados invertidos, e após o crescimento das colônias, estas são coletadas com pipeta Pauster de ponta afilada e curva, e transferidas para um novo meio (VAZOLLER, 1995). Este método permitiu o isolamento de novas espécies de arqueias metanogênicas, e estimulou o aparecimento de técnicas e equipamentos úteis para a obtenção de culturas anaeróbias obrigatórias (BRYANT, 1972; BALCH; WOLFE, 1976).

Miller e Wollin (1974) desenvolveram o preparo de um meio de cultivo basal sob fluxo gasoso, seguido pela distribuição do meio em frascos de antibiótico, fechados com batoque de

borracha e lacre de alumínio. As adições de soluções com fontes de carbono, vitaminas, agente redutor e outras, assim como o inóculo, eram feitas após a autoclavação, com o uso de seringas. As soluções adicionadas após a autoclavação eram também mantidas sob anaerobiose.

Hungate (1969) e Ljungdahl e Wiegel (1986) observaram que a retirada física do oxigênio dos frascos de cultivo era insuficiente para a manutenção da anaerobiose no meio, passando então a utilizar agentes redutores como cisteína ($E^{\circ} = -210$ mv) e Na_2S ($E^{\circ} = -270$ mv), eram usados, e o corante resazurina ($E^{\circ} = -51$ mv para o rosa/ transmissão clara) utilizado como um indicador de oxidação-redução.

No final da década de 70, Balch et al. (1979) conceberam o sistema de distribuição simultânea de gases, com um tubo com várias ligações, após uma coluna de cobre aquecida através do qual passava o gás a ser distribuído em vários frascos ao mesmo tempo, sob pressão controlada.

Outros sistemas também foram desenvolvidos, como o uso de câmaras anaeróbias. A câmara anaeróbia, com o uso de luvas foi desenvolvida por Edwards & McBride (1975), permitindo assim o uso de placas de Petri nos experimentos de isolamento e identificação de arqueias metanogênicas. A câmara contém uma área de trabalho mantida sob atmosfera de anaerobiose estrita através da entrada de uma mistura de gases livre de oxigênio, geralmente composta por N_2 : CO_2 : H_2 (80:10:10). A pressão na câmara é ligeiramente positiva, para que possíveis vazamentos possam ser detectados, e toda a manipulação das culturas é feita através de luvas inseridas na parede da câmara. A área de trabalho é precedida por uma antecâmara, através da qual se faz a transferência do material sem que ocorra a contaminação com o oxigênio (HOLLAND; KNAPP; SHOESMITH, 1987). Mas ainda assim, a técnica de *roll-tube* se mostrou mais eficiente a fim de se isolar colônias, já que em placas, mesmo em câmaras anaeróbias, dificilmente se consegue manter o potencial de oxi-redução exigido pelas arqueias metanogênicas (-300 mv).

Atualmente são dois os principais tipos de sistemas empregados na manipulação de microrganismos anaeróbios estritos. Um deles é a câmara anaeróbia, imprescindível para os estudos bioquímicos. Entretanto, a manutenção do sistema exige a checagem de pontos de vazamento e um consumo bastante intenso de gás. Um outro sistema comumente utilizado é o sistema de distribuição simultânea de gases, descrito por Hungate (1950) para o cultivo de

anaeróbios estritos, onde os cultivos são realizados em frascos lacrados e fechados sob pressurização. Os meios de cultivo, em geral são meios minerais simples, pré-reduzidos previamente à esterilização, após a qual recebem soluções estoque específicas ao cultivo celular de interesse.

2.1.5 Estudo da diversidade de *Archaea* por técnicas moleculares

O Brasil é reconhecido como um dos países que apresenta um dos mais elevados índices de biodiversidade animal e vegetal. A floresta tropical amazônica é caracterizada pela elevada diversidade biológica sob regime de precipitação e temperatura elevadas e, sustenta mais de 230 espécies lenhosas por hectare, além das epífitas e outras espécies de porte pequeno. Esta diversidade vegetal se traduz em uma grande diversidade animal, principalmente insetos (ERWIN, 1997), devido ao grande número de nichos existentes. Também é de se esperar que a diversidade de organismos do solo seja afetada por esta alta diversidade vegetal. Entretanto, ao procurar dados sobre a diversidade microbiana brasileira, verifica-se que estes são escassos ou, em alguns casos, comunicados por pesquisadores estrangeiros em periódicos internacionais. No primeiro relatório nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica apresentado pelo Ministério do Meio Ambiente dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal (MMA), elaborado em 1998, apenas duas referências bibliográficas mencionam microrganismos no total de 283 páginas redigidas (www.cria.org.br/cgee/documentos/microtax.doc).

Em 1997, Borneman e Triplett publicaram o primeiro trabalho sobre a diversidade microbiana na Amazônia utilizando apenas métodos moleculares, independentes de cultivo. Neste trabalho, que se tornou clássico, os autores estudaram cerca de 100 clones obtidos pela amplificação do gene 16S rDNA, destes, 98 foram classificados no Domínio *Bacteria*, apenas 2, no Domínio *Archaea* (BORNEMAN; TRIPLETT, 1997). Um estudo recente sobre a diversidade de bactérias em solo de Terra Preta e sob floresta na Amazônia foi realizado por Kim e colaboradores, estudando um total de 1500 seqüências de clones de 16S rDNA. Os resultados mostraram que as comunidades bacterianas nos dois solos foram similares, embora a Terra Preta apresentasse uma maior riqueza de espécies (KIM et al., 2007). Embora estes trabalhos sejam os primeiros a trazer uma maior compreensão da diversidade microbiana em solos amazônicos, eles contemplam apenas o Domínio *Bacteria*, em detrimento ao Domínio *Archaea*.

A identificação de *Archaea* do solo é de grande importância para o entendimento do significado ecológico da *Archaea* na biosfera e para a análise da ocorrência de comunidades microbianas naturais. Como as arqueias foram inicialmente isoladas de ambientes inóspitos ou nichos especializados, por muito tempo estes microrganismos não foram considerados para a importância da ecologia de comunidades microbianas em diferentes ambientes (BINTRIM et al., 1997). O interesse pela ecologia destes microrganismos começou a aumentar a partir do isolamento de arqueias nos mais diversos ambientes, como ambiente marinho (DeLONG, 1992; MASSANA et al., 1997), solos (UEDA; SUGA; MATSUGUCHI, 1995; BINTRIN et al., 1997; TREUSCH et al., 2004) e sedimentos de água doce (MacGREGOR et al., 1997). Embora estes microrganismos sejam hoje amplamente estudados, segundo o site <http://wit.integratedgenomics.com/GOLD>, existem apenas 32 genomas completos de *Archaea* seqüenciados, um número bastante inferior ao de *Bacteria*, com 554 genomas completos. Estes números demonstram a necessidade de um estudo mais amplo deste importante grupo de microrganismos.

Solos e sedimentos estão entre os mais complexos de todos os habitats microbianos. A diversidade microbiana dos solos sempre foi considerada como alta, mas a primeira tentativa para quantificar essa diversidade somente foi reportada após 1990, com os trabalhos de Torsvik; Goksoyr e Daae (1990) e Amann; Ludwig e Schleifer (1995). Segundo os autores, apenas uma pequena fração dos organismos na natureza (0,1% a 10% do total da população), é cultivável através do uso de técnicas microbiológicas de rotina (TORSVIK; GOKSOYR; DAAE, 1990; AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995). Desta forma, apesar de intensamente estudada, a diversidade microbiana do solo por técnicas de cultivo era muito pouco conhecida. Esse cenário começou a mudar em 1980 quando Torsvik publicou o primeiro protocolo de extração de DNA de amostra de solo (TORSVIK, 1980). Os avanços na área de biologia molecular permitem a identificação independente de cultivo de número abrangente de espécies microbianas, incluindo aquelas fastidiosas ou não passíveis de cultivo, as quais dificilmente seriam identificadas pelos métodos convencionais.

Outro grande impacto foi devido ao uso de seqüências de rDNA como ferramenta na classificação microbiana a partir de amostras ambientais. O uso de marcadores moleculares para investigar a estrutura e a diversidade de comunidades microbianas por meio de análises comparativas de seqüências do DNA ribossomal vem possibilitando o desenvolvimento de

metodologias para o estudo destes organismos. Em 1977, Woese e Fox publicaram o trabalho sobre o uso de seqüências do 16S rRNA para a reconstrução da “árvore da vida” (WOESE; FOX, 1977). Em 1987, Carl Woese publicou seu trabalho sobre o uso de cronômetros filogenéticos, principalmente o 16S rDNA, o que mudou o rumo da taxonomia de procariontes, demonstrando que o 16S rDNA seria extremamente útil na afiliação filogenética de bactérias em espécies, gêneros e famílias (WOESE, 1987), e seu uso foi prontamente incorporado à taxonomia polifásica (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1987).

Entre os três DNA ribossomais existentes (5S, 16S/18S, e 23S/28S), o 16S rDNA tornou-se o marcador mais amplamente utilizado. A escolha do 16S rDNA decorreu do fato dele apresentar todas as características necessárias a um marcador molecular ideal. Primeiramente, estes genes uma distribuição universal, uma vez que todos realizam síntese de proteínas ribossomais. Portanto, os genes rDNA são muito antigos e têm sido usados para derivar filogenias universais da vida (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990; PACE, 1997). Possuem conservadas a estrutura e a função entre os *taxa* e tamanho suficiente que permite o aparecimento de divergências na seqüência. Ainda, a estrutura primária possui uma alternância entre regiões mais e menos conservadas permitindo a investigação de um amplo espectro de distâncias filogenéticas, desde o nível de domínio até o nível de espécie (LUDWIG; SCHLEIFER, 1994). Além disso, as moléculas de rDNA, sendo os componentes principais da estrutura dos ribossomos, são muito abundantes nas células, tornando possível a identificação individual de uma célula em comunidades microbianas complexas, ou possíveis reuniões, por técnicas de hibridização *in situ*, com moléculas de rDNA marcado e sondas de oligonucleotídeos. Por fim, o grande número de seqüências do gene 16S rRNA disponíveis atualmente (≈190 mil seqüências segundo o *Ribosomal Database Project-II* rdp.cme.msu.edu), favorece ainda mais o uso desse gene como marcador molecular filogenético por permitir uma vasta gama de comparações.

Além das seqüências de DNA ribossomal, outras regiões do genoma também podem ser utilizadas para análises de diversidade e estrutura de populações, bem como estudos filogenéticos. Estudos com genes funcionais têm demonstrado potencial como marcadores moleculares. Para as arqueias metanogênicas, o gene *mcr* tem sido apontado como um bom marcador molecular, por ser único e ubíquo dentre as metanogênicas (ALLMANSBERGER et al., 1986; BOKRANZ et al., 1988; WEIL et al., 1988; HALES et al., 1996; LUTON et al., 2002).

Além disso, eficiente para estudos filogenéticos, já que aparentemente este gene evoluiu de um ancestral comum (THAUER, 1998).

Essas seqüências com regiões conservadas (16S rDNA e *mcr*) permitem o desenvolvimento de iniciadores e sondas que possibilitam a amplificação ou identificação de seqüências até o nível de espécies. Iniciadores para o estudo de populações metanogênicas tem sido desenhados para amplificar várias regiões do 16S rDNA. Alguns iniciadores permitem a amplificação de todos os organismos do Domínio *Archaea* (MOYER et al., 1998; EMBLEY et al., 1992; LUEDERS; FRIEDRICH, 2002), enquanto outros são específicos para metanogênicas (MARCHESI et al., 2001). Outros iniciadores para identificação de metanogênicas têm sido desenhados para amplificar a subunidade A do gene *mcr* (HALES et al., 1996; SPRINGER et al., 1995; LUTON et al., 2002).

Várias técnicas moleculares baseadas na amplificação enzimática por PCR têm sido concebidas e utilizadas. A técnica de ARDRA (“*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*”) ou PCR-RFLP (“*Restriction Fragment Length Polymorphism*”) explora o uso de oligonucleotídeos iniciadores universais para amplificar as seqüências do rDNA de arqueias e bactérias, seguidas pela digestão com enzimas de restrição para se determinar a diversidade e para identificar/classificar os isolados ao nível de gênero e algumas vezes ao nível de espécie (LOUWS et al., 1999). As variações nos nucleotídeos do DNA devidas a mutação, deleção, inserção ou inversão podem ser detectadas se ocorrem num dos sítios de corte das enzimas de restrição. A técnica gera dados do tipo “*fingerprinting*” que podem ser usados para análises numéricas ou qualitativas. A limitação dessa técnica pode estar relacionada à presença de diferentes seqüências de ITS (Intergenic Spacer) numa mesma espécie, dificultando posteriormente o entendimento dos resultados. O ARDRA permite que diferentes padrões de bandas sejam acumulados em bases de dados de domínio público e comparados com facilidade.

Em 1995, Hiraishi; Kamagata e Nakamura aplicaram a técnica de ARDRA para a diferenciação de três espécies metanogênicas, *Methanogenium bourgense*, *Methanogenium barkeri* e *Methanotherix soehngeii*, utilizando oito enzimas de restrição. Foi a primeira utilização desta técnica com espécies metanogênicas (HIRAISHI; KAMAGATA; NAKAMURA, 1995). Desde então, esta técnica tem sido amplamente utilizada para estudos de identificação (SPRINGER et al., 1995; JEANTHON et al., 1999; WRIGHT; PIMM, 2003), e diversidade de

arqueias metanogênicas (FERNANDEZ et al., 2000; WHITBY et al., 2004; LOMANS et al., 2001; McHUGH et al., 2003; SHERIDAN; MITEVA; BRENCHLEY, 2003; SIZOVA et al., 2003; KIM et al., 2005).

Wright e Pimm (2003) realizaram um estudo extensivo de identificação de arqueias metanogênicas pela restrição dos produtos de amplificação do gene 16S rRNA. Os autores testaram 55 enzimas de restrição em 82 espécies metanogênicas. Das 55 enzimas avaliadas, os melhores resultados foram observados com *AluI*, *MaeI*, *Sau3AI* e *HaeIII*, sendo esta última considerada como a mais eficiente, devido ao número de sítios de clivagem, padrão de restrição de cada espécie e número de espécies diferenciadas. Os autores concluíram que esta técnica consiste de um método simples e rápido para a identificação de espécies metanogênicas.

Além do gene 16S rRNA, o gene *mcr* também é utilizado em estudos de restrição pela técnica de ARDRA. Galand et al. (2005), após a construção de biblioteca de clones pela amplificação do gene *mcrA* realizaram a clivagem das seqüências com a enzima *MspI*. De acordo com o padrão de restrição, as seqüências foram agrupadas, e cada grupo foi considerado um UTO (Unidade Taxonômica Operacional). A partir dos UTOs obtidos, os autores calcularam a abrangência de cobertura, estimativa de riqueza e diversidade da bibliotecas de clones, mostrando o potencial da técnica de ARDRA para estudos de diversidade de microrganismos.

A disponibilidade atual da capacidade de seqüenciamento de DNA em larga escala em vários laboratórios do mundo permite ainda o desenvolvimento de estudos de genômica ambiental, ou metagenômica, nos quais fragmentos grandes de DNA são clonados e seqüenciados. A análise de comunidades microbianas através do seqüenciamento de clones de 16S rRNA que se baseia na amplificação de um fragmento específico do 16S rDNA, a partir do DNA metagenômico, utilizando-se iniciadores específicos, clonagem desses produtos de PCR ou “amplicons” em vetores apropriados e seqüenciamento dos insertos (AMANN; LUDWIG, 2000; McCAIG; GLOVER; PROSSER, 1999).

As seqüências geradas a partir do seqüenciamento de 16S rDNA representam uma grande quantidade de dados que precisam ser processadas com auxílio de algoritmos específicos que podem ser utilizados para diferentes tipos de análises (LAMBAIS et al., 2005). Informações geradas a partir do seqüenciamento de genes de 16S rRNA, podem ser comparadas com seqüências depositadas em bancos de dados públicos (GeneBank do NCBI), para determinação

do organismo com seqüência mais similar e suas possíveis funções no solo (CURY, 2006), e o Ribossomal Database Project II, o qual permite a determinação das relações filogenéticas das seqüências de 16S rDNA obtidas com seqüências depositadas. O RDP obtém as seqüências de rDNA mensalmente a partir do Banco de Dados de Seqüência Internacional (GenBank/ NCBI). Essas seqüências são alinhadas com seqüências gerais de rDNA através de um modelo que incorpora informações sobre a estrutura secundária da molécula, aumentando a sua confiabilidade. O RDP possui também um sistema de classificação taxonômica (RDP Hierarchy), que segue a proposta do manual Bergey's, no qual os principais níveis taxonômicos em ordem decrescente são: Domínio, Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie. A comparação do Banco de dados do RDP feita pelo programa Classifier utiliza um sistema de pareamento de palavras combinado com uma estatística Baesyana (COLE et al., 2005). O programa Classifier tem como objetivo fornecer uma classificação taxonômica inicial para a seqüência submetida e requer um alinhamento prévio dessa seqüência com as seqüências disponíveis no RDP Hierarchy. A comparação entre bibliotecas metagenômicas, pode ser feita pelo programa S-LibShuff (<http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/S-LibShuff.html>), que determina as dissimilaridades entre duas ou mais bibliotecas de 16S rDNA, e determina se as comunidades as quais elas representam são estatisticamente diferentes.

A diversidade e a estrutura de comunidades microbianas são normalmente analisadas com base no grau de similaridade entre seqüências de 16S rDNA, as quais serão agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (UTO) ou filotipos (NÜBEL et al., 1999; Stach et al., 2003). Normalmente seqüências de 16S rDNA com similaridade maiores do que 97% são consideradas da mesma espécie, maiores que 95% do mesmo gênero e, maiores que 80% do mesmo filo (BORNEMAN; TRIPLETT, 1997; NÜBEL et al., 1999; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005). O programa DOTUR (Distance Based OTU and Richness Determation) é um programa de alinhamento utilizado para definir UTOs em um conjunto de seqüências. Contudo, a estimativa da diversidade baseada em UTOs deve ser cautelosamente interpretada, já que os níveis de similaridade entre as seqüências de rDNA 16S para definição de UTOs não são consensuais.

Para estimar a riqueza de espécies microbianas em amostras ambientais são utilizados métodos paramétricos e não-paramétricos (BOHANNAN; HUGHES, 2003; GASTON, 1996; CHAO; SHEN; HWANG, 2006; SHEN; CHAO; LIN, 2003). Modelos paramétricos são muito eficientes para avaliar a abundância relativa de UTOs em amostras relativamente grandes.

Portanto, este método é recomendado para estimar diversidade de microrganismos que são dominantes necessitando de grandes quantidades de dados para suportar os modelos de abundância. Já os métodos não-paramétricos foram desenvolvidos para estimar diversidade a partir de pequenas amostras da comunidade considerando as espécies raras, presentes uma ou duas vezes por amostra e não depende do conhecimento prévio do tipo de distribuição de frequência de ocorrência dos microrganismos (KEMP; ALLER, 2004; CHAO, 2006).

Os estimadores não-paramétricos mais utilizados para avaliar a diversidade de espécies microbianas são o Chao1 e ACE (Abundance-Based Coverage Estimator). O primeiro utiliza o número de espécies raras para estimar a riqueza de UTOs (BOHANNAN; HUGHES, 2003, CHAO, 2006), considerando os filotipos que aparecem uma ou duas vezes dentro de uma biblioteca determinada. O segundo separa as espécies em grupos raros e abundantes e somente os grupos raros são utilizados para estimar a diversidade não-conhecida (CHAO; LEE, 1992), estimando o número total de filotipos em um ambiente.

- **Objetivos**
- **Objetivo geral:**
 - Estudar a comunidade de arqueias metanogênicas presentes em solos de várzea e terra firme na região de Santarém, PA, por métodos de isolamento e cultivo e técnicas moleculares.
- **Objetivos específicos:**
 - Isolar e identificar microrganismos metanogênicos presentes em solos de várzea e terra firme, na região de Santarém, PA;
 - Detectar a presença dos microrganismos metanogênicos ao longo dos perfis de terra firme, na região de Santarém, PA, através e potencial da produção de metano;
 - Identificar a comunidade arqueias presentes em solos de várzea, na região de Santarém, PA, a partir da construção de bibliotecas genômicas pelo seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA de *Archaea*.

2.2 Material e Métodos

Para a realização de todos os experimentos foi utilizado como inóculo solo proveniente da Amazônia Oriental, dos municípios de Santarém e Belterra (PA). Para uma melhor compreensão, a Figura 4 traz um diagrama explicativo dos experimentos realizados e técnicas empregadas.

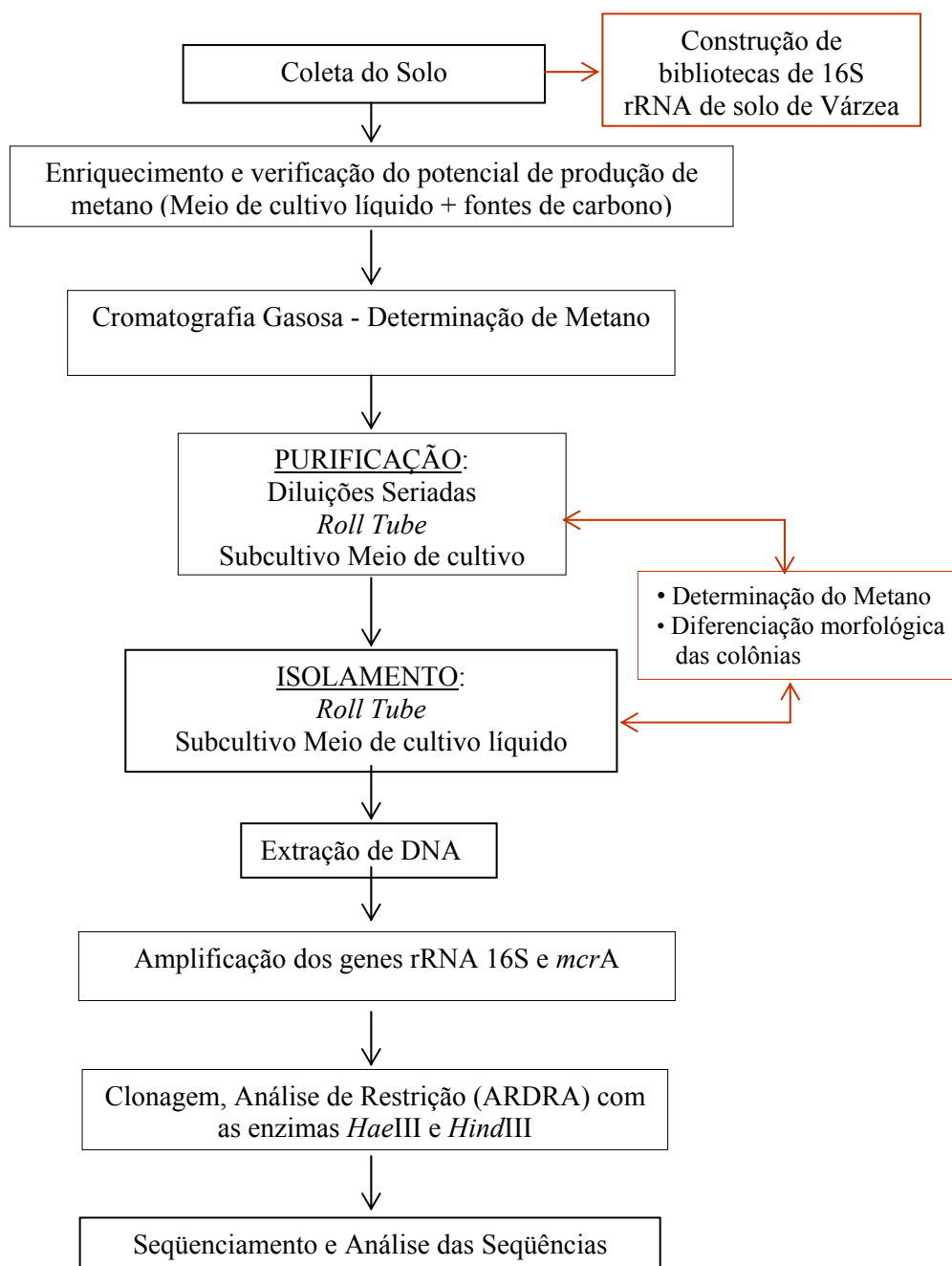


Figura 4 - Diagrama dos experimentos de diversidade, cultivo, isolamento e caracterização de arqueias metanogênicas

2.2.1 Descrição geral da área de estudo

Localização. As áreas de estudo estão localizadas na região centro-oeste do Pará, na Meso-região do Baixo Amazonas, nos municípios de Santarém e Belterra. A cidade de Santarém é um dos principais centros de desenvolvimento do Estado do Pará, e a de maior importância econômica da região do Baixo Amazonas. O município de Belterra foi emancipado de Santarém em 1995, tendo a maior parte de seu território inserido na Floresta Nacional do Tapajós - FLONA do Tapajós.

Clima. A região encontra-se sob características gerais de clima quente úmido. As temperaturas médias, máximas e mínimas anuais oscilam, respectivamente, entre 25 e 26°C, 30 e 31°C e 21 e 23°C. Os índices pluviométricos apresentam valores anuais oscilantes em torno de 2.000 mm, com distribuição irregular durante os meses, mostrando a ocorrência de dois períodos nítidos de chuvas, com o mais chuvoso abrangendo o período de dezembro a junho, concentrando em mais de 70% a precipitação anual (OLIVEIRA JÚNIOR; CORREA, 2001). O clima da região, segundo a classificação de Köppen é do tipo Am (clima megatérmico, tropical úmido), com temperatura média do mês mais frio acima de 18°C e com estação seca sob influência das monções (PEREIRA et al., 2002). O tipo Am pertence ao domínio de clima tropical caracterizado por apresentar precipitação total anual elevada e moderado período de estiagem. Segundo o sistema de Thornthwaite, os tipos B3ra 'a' e B2ra 'a' caracterizam-se por elevados índices de umidade, sendo o B3 na ordem de 67% e o B2 na ordem de 52%, com pequena deficiência hídrica (r). A' simboliza clima megatérmico e a' baixa concentração de verão estacional (EMBRAPA, 1983).

A Figura 5 mostra a precipitação mensal determinada na Estação Micrometeorológica Belterra no PA, referente ao período entre abril de 2003 e junho de 2006.

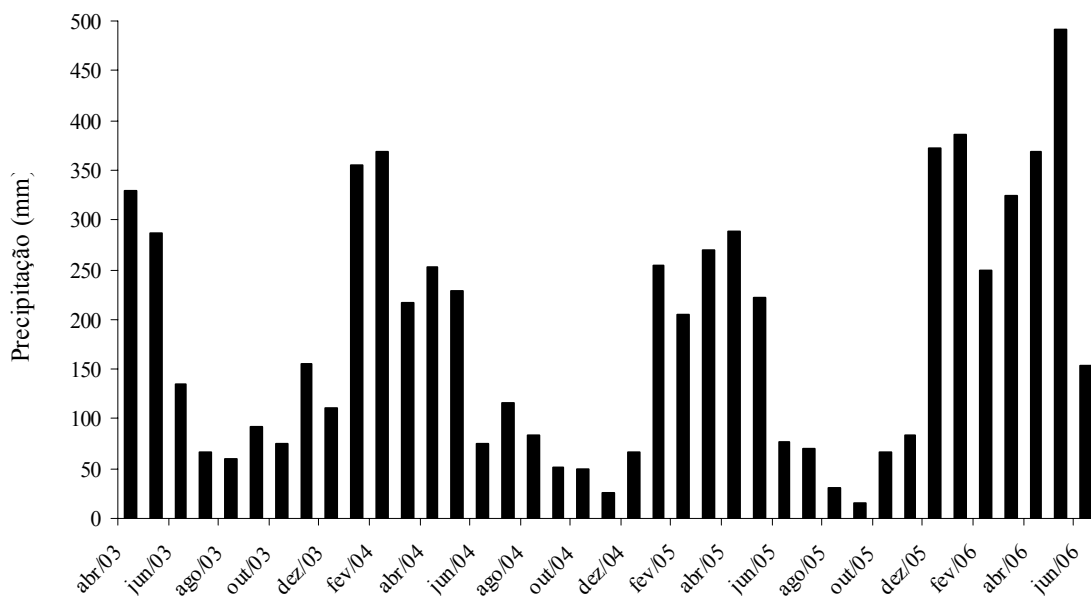


Figura 5 - Valores (mm) da precipitação mensal medida pela estação micrometeorológica Belterra no PA, referentes ao período entre abril de 2003 e junho de 2006

Relevo e solos. Na região é possível constatar várias formas de relevo com seus respectivos graus de dissecação, solos e cobertura vegetal (RODRIGUES et al., 2001). Os principais solos identificados no Planalto de Belterra são os Latossolos Amarelos, Argissolos Amarelos, os Neossolos Quartzarênicos, os Neossolos Flúvicos e os Gleissolos (RODRIGUES et al., 2001). Encontra-se também o Latossolo Amarelo Distrófico húmico com horizonte A húmico e textura arenosa a muito argilosa, oriundos de sítios arqueológicos, como a Terra Preta e a Terra Mulata.

2.2.2 Amostragem

Foram coletadas amostras de solo em nove pontos, sendo eles denominados:

- Várzea (Gleissolo): várzea 1, várzea 2 e várzea 3.
- Terra firme (sítios arqueológicos e áreas adjacentes): Terra Preta 1 e adjacente, Terra Preta 2 e adjacente, Terra Mulata e adjacente;

A amostragem foi feita em quatro profundidades para cada ponto: 0-20, 20-40, 40-70 e 70-100 cm, compreendendo 36 amostras e 3 repetições.

Para a coleta, escavaram-se trincheiras de 1x1x1 metros. Tubos de PVC de 1" e de comprimento 25 cm foram utilizados para realizar a coleta de solo. Os tubos foram inseridos horizontalmente na trincheira, tendo posteriormente as extremidades tampadas com os *caps* e seladas com fita adesiva (Figura 6). Este procedimento se fez necessário a fim de evitar a entrada de oxigênio, uma vez que a pesquisa se destina ao isolamento de microrganismos anaeróbios estritos (potencial de óxido-redução da ordem de -350mV). As amostras foram acondicionadas em caixas térmicas com gelo e levadas ao laboratório para as análises químicas e microbiológicas.

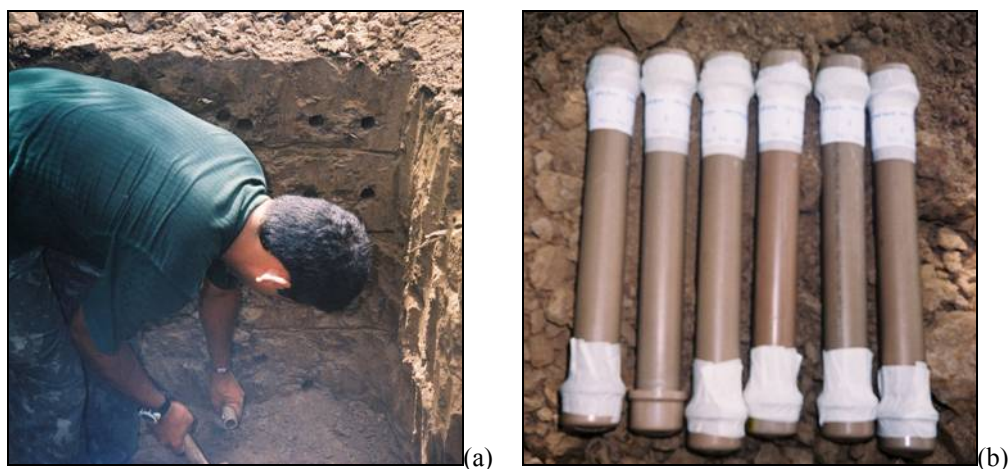


Figura 6 - Amostragem do solo: a) Trincheira de coleta; b) tubos de PVC lacrados, contendo amostras de solo

As coletas de várzea foram realizadas na fazenda Cacoal Grande da EMBRAPA na Amazônia Oriental - Núcleo do Médio Amazonas, Santarém (02° 23' 20" S e 54° 19' 39.5" W). O solo não é cultivado, embora, ocasionalmente, seja ocupado com a criação de búfalos (Figura 7a).

A Terra Preta 1 (TP1) foi coletada no município de Beterra (02° 27' 13.8" S e 54° 54' 41.1" W) e apresenta horizonte A antropogênico de cerca de 30 cm de profundidade, com passagem abrupta para o horizonte B Latossolico. No local encontra-se um pomar de frutíferas, com predomínio de mangueiras, mas não é cultivado há cerca de 80 anos (Figura 7b). O solo adjacente amostrado, encontrado acerca de 100 m da TP1, é um Latossolo Amarelo textura muito argilosa, sob mata natural.

A Terra Preta 2 (TP2) foi coletada próxima a Praia de Ponta de Pedras, em Santarém. (Figura 7c). Apresentava escurecido bastante profundo, ocupando toda a profundidade amostrada (1m). Encontra-se sob mata natural, com solo nunca cultivado. O solo adjacente, também sob mata natural, apresentava coloração bastante escura, embora significativamente mais clara que a Terra Preta.

A Terra Mulata (TM) foi amostrada no município de Belterra (02° 36' 46" S e 54° 56' 32.1" W) apresentava horizonte A antropogênico bastante escuro, embora não seja classificada como Terra Preta. Este horizonte apresenta cerca de 50 cm de profundidade, com passagem para o horizonte B Latossolico suave. A mancha de Terra Mulata é bastante extensa, sendo encontrado Latossolo Amarelo adjacente a cerca de 400 m do local de TM (Figura 7d).

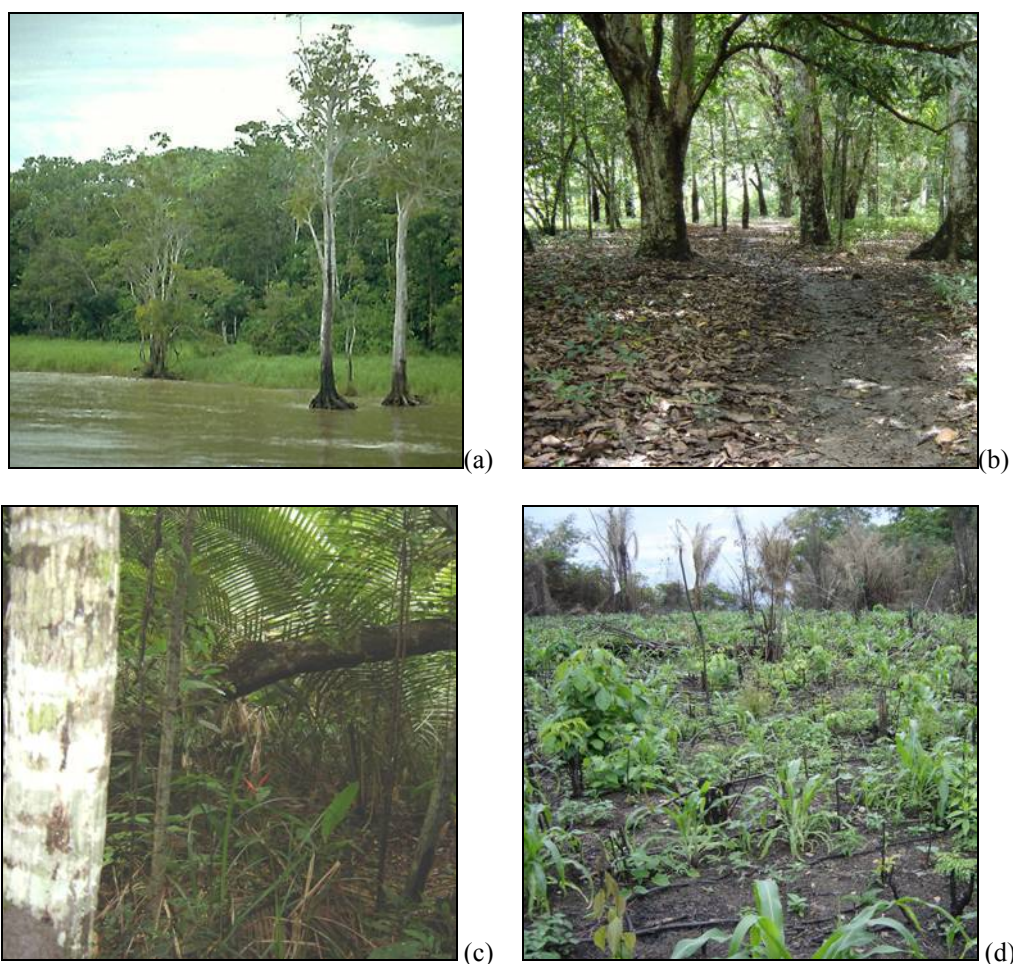


Figura 7 - Vista das áreas de coleta. (a) Várzea - Fazenda Cacoal Grande. (b) Pomar de Mangueiras em Terra Preta 1. (c) Terra Preta 2 sob Mata. (d) Roçado em Terra Mulata

2.2.3 Caracterização físico-química do solo

Para fins de caracterização físico-química dos solos foram realizadas as análises química e física das 36 amostras avaliadas neste estudo (Tabela 3). São elas: Várzeas 1, 2 e 3; Terra Preta 1 e Adjacente, Terra Preta 2 e Adjacente, e Terra Mulata e Adjacente; nas quatro profundidades, 0-20, 20-40, 40-70 e 70-100 cm. As análises foram feitas de amostras compostas de 3 repetições.

Tabela 3 - Características físicas das amostras de solo (Análises realizadas no laboratório de Solos da ESALQ/USP, Piracicaba, SP)

Amostra	Profundidade (cm)	Areia %	Silte%	Argila%	Classe de Textura
VZ1	00-20	16	66	18	md-ar.
	20-40	22	60	18	md-ar.
	40-70	11	61	28	md-arg.
	70-100	9	53	38	arg.
VZ2	00-20	12	58	30	md-arg.
	20-40	10	64	26	md-arg.
	40-70	14	62	24	md-arg.
	70-100	11	47	42	arg.
VZ3	00-20	22	58	20	md-ar.
	20-40	20	60	20	md-ar.
	40-70	17	65	18	md-ar.
	70-100	7	65	28	md-arg.
TP1	00-20	7	10	83	m.arg.
	20-40	3	8	89	m.arg.
	40-70	2	8	90	m.arg.
	70-100	2	6	92	m.arg.
Ad. TP1	00-20	8	10	82	m.arg.
	20-40	3	6	91	m.arg.
	40-70	3	6	91	m.arg.
	70-100	2	6	92	m.arg.
TP2	00-20	86	4	10	ar.
	20-40	86	4	10	ar.
	40-70	86	4	10	ar.
	70-100	86	4	10	ar.
Ad. TP2	00-20	74	8	18	md-ar.
	20-40	74	6	20	md-ar.
	40-70	74	8	18	md-ar.
	70-100	74	6	20	md-ar.
TM	00-20	32	23	45	arg.
	20-40	32	23	45	arg.
	40-70	14	17	69	m.arg.
	70-100	13	16	71	m.arg.
Ad. TM	00-20	26	20	54	arg.
	20-40	16	17	67	m.arg.
	40-70	6	12	82	m.arg.
	70-100	2	10	88	m.arg.

Classes de textura: até 14% - arenosa: ar.; 15 a 24% - média arenosa:md-ar.; 25 a 34% - média argilosa: md-arg.; 35 a 59% - argilosa: arg.; 60% ou superior - muito argilosa: m.arg. V1: Várzea 1, V2: Várzea 2, V3: Várzea 3; TP1: Terra Preta 1; TP2: Terra Preta 2; TM: Terra Mulata; Ad.: Adjacente.

Tabela 4 - Características químicas das amostras de solo (Análises realizadas no laboratório de Solos da ESALQ/USP, Piracicaba, SP)

Amostra	Profundidade (cm)	pH	M.O	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	T	V	M	B	Cu	Fe	Mn	Zn
		CaCl ₂	g dm ⁻³	mg dm ⁻³mmolc dm ⁻³						%mg dm ⁻³						
VZ1	00-20	4,7	13	15	1,9	36	12	4	22	49,9	71,9	69	7	0,58	3,1	129	16,9	1,4
	20-40	5,0	13	16	1,5	41	13	0	16	55,5	71,5	78	0	0,54	3,0	90	10,6	1,2
	40-70	5,4	8	22	1,3	40	17	0	15	58,3	73,3	80	0	0,58	2,5	71	8,6	1,0
	70-100	5,5	12	9	1,4	58	27	0	16	86,4	102,4	84	0	0,43	2,5	46	10,8	1,0
VZ2	00-20	4,5	9	10	5,7	28	13	5	22	46,7	68,7	68	10	0,54	3,6	180	21,9	1,4
	20-40	5,4	7	12	2,3	47	22	0	13	71,3	84,3	85	0	0,50	2,6	62	12,2	1,2
	40-70	5,4	8	5	0,5	43	22	0	12	65,5	77,5	85	0	0,52	2,5	49	6,4	0,8
	70-100	5,5	8	4	0,5	42	25	0	16	67,5	83,5	81	0	0,45	2,0	53	7,5	1,0
VZ3	00-20	5,7	12	11	10,9	71	30	0	12	111,9	123,9	90	0	0,48	2,4	57	15,1	1,3
	20-40	6,0	10	13	1,2	75	33	0	10	109,2	119,2	92	0	0,21	1,7	27	8,4	0,9
	40-70	5,7	9	11	0,8	76	32	0	10	108,8	118,8	92	0	0,44	2,0	27	6,6	0,8
	70-100	6,1	11	11	0,8	70	31	0	11	101,8	112,8	90	0	0,43	2,0	30	7,7	0,9
TP1	00-20	5,6	37	7	0,5	40	10	0	58	50,5	108,5	47	0	0,53	0,3	55	2,1	0,4
	20-40	4,8	17	2	0,2	22	5	1	38	27,2	65,2	42	4	0,56	0,2	32	0,7	0,2
	40-70	4,7	14	1	0,1	13	5	3	31	18,1	49,1	37	14	0,57	0,1	19	0,2	0,2
	70-100	4,4	9	1	0,1	4	2	5	25	6,1	31,1	20	45	0,54	-	5	-	0,1
Ad. TP1	00-20	4,0	33	4	0,4	4	2	15	80	6,4	86,4	7	70	0,78	0,1	85	0,6	0,3
	20-40	4,1	20	1	0,2	3	1	16	58	4,2	62,2	7	79	0,67	0,1	40	0,4	0,3
	40-70	4,2	15	1	0,1	2	1	11	47	3,1	50,1	6	78	0,56	-	17	0,2	0,2
	70-100	4,3	10	1	0,1	1	1	10	34	2,1	36,1	6	83	0,53	-	5	-	0,1
TP2	00-20	3,4	51	4	0,3	1	1	28	150	2,3	152,3	2	92	-	0,1	155	0,4	0,2
	20-40	4,1	23	1	0,1	1	1	15	64	2,1	66,1	3	88	0,41	0,1	27	0,2	0,1
	40-70	4,2	18	1	0,1	2	1	10	42	3,1	45,1	7	76	0,45	0,1	12	0,2	0,1
	70-100	4,2	13	1	0,1	1	1	9	34	2,1	36,1	6	81	0,54	0,1	14	0,2	9,2
Ad. TP2	00-20	3,9	32	4	0,3	1	1	20	88	2,3	90,3	3	90	0,57	0,2	71	0,5	11,0
	20-40	4,1	19	1	0,1	1	1	13	47	2,1	49,1	4	86	0,58	0,1	25	0,3	1,1
	40-70	4,0	21	2	0,2	1	1	14	58	2,2	60,2	4	86	0,54	0,1	27	0,2	0,1
	70-100	4,2	13	1	0,1	1	1	10	38	2,1	40,1	5	83	1,23	0,1	20	0,2	0,1
TM	00-20	5,1	60	72	0,5	78	23	0	34	101,5	135,5	75	0	0,62	0,2	39	1,2	0,6
	20-40	5,2	47	74	0,2	47	31	0	38	78,2	116,2	67	0	0,41	0,2	36	0,8	2,3
	40-70	5,0	26	10	0,2	28	12	0	42	4,2	82,2	49	0	0,44	0,1	40	0,2	0,2
	70-100	5,1	20	9	0,1	28	12	0	38	40,1	78,1	51	0	0,50	0,1	33	0,2	0,1
Ad. TM	00-20	4,4	60	1	0,2	10	4	10	80	14,2	94,2	15	41	0,45	-	21	0,4	-
	20-40	4,4	30	2	0,1	13	5	10	64	18,1	82,1	22	36	0,54	-	23	0,2	0,1
	40-70	4,1	26	1	0,1	2	1	15	72	3,4	75,1	4	83	0,52	-	19	0,1	-
	70-100	4,6	15	1	0,1	1	1	11	47	2,1	49,1	4	84	0,49	-	8	0,1	-

SB: Soma de Bases; T: CTC pH 7,0; V: Saturação por Bases; M: Saturação por Alumínio. V1: Várzea 1, V2: Várzea 2, V3: Várzea 3 TP1: Terra Preta 1; TP2: Terra Preta 2; TM: Terra Mulata; Ad.: Adjacente

2.2.4 Cultivo de microrganismos anaeróbios estritos

O cultivo das arqueias metanogênicas foi feito no Laboratório de Microbiologia Ambiental (ICB/USP), utilizando-se uma variação do sistema de distribuição simultânea de gases (EDWARD; McBRIDE, 1975) para o cultivo de anaeróbios estritos, como proposto por Vazoller (1995). O sistema de distribuição simultânea de gases é composto por tubos de cobre que conectam os cilindros de gases utilizados no cultivo de microrganismos anaeróbios (nitrogênio puro e as misturas de nitrogênio:dióxido de carbono 70:30 e hidrogênio:dióxido de carbono 80:20) a um sistema de distribuição com 4 saídas de fluxo regulável. A escolha do tipo de gás é feita por um conjunto de válvulas e, no trajeto para as saídas, os gases passam por uma coluna purificadora (CG Analítica), contendo um catalisador aquecido a 300°C, para retirar traços de contaminação por oxigênio. As saídas são acopladas a um manômetro e também possuem conexão para aplicação de vácuo, importante para os procedimentos de troca de atmosfera dos frascos de cultura (Figura 8) (NAKAYAMA, 2005).

Assim como na microbiologia geral, a pesquisa de microrganismos anaeróbios estritos envolve procedimentos de preparo e inoculação de meio de cultivo, repiques em meio novo e transferências das culturas para novos frascos, realimentação das culturas e retirada de amostras para análises diversas. Contudo, os procedimentos adotados requerem o controle constante da atmosfera das culturas, a pré-redução e redução dos meios de cultura e soluções e a “lavagem” do material com nitrogênio durante o manuseio das culturas, para evitar a contaminação dos cultivos com oxigênio atmosférico. Os equipamentos e procedimentos principais de microbiologia de microrganismos anaeróbios estritos são descritos a seguir. Essas práticas encontram-se descritas em detalhes por Vazoller (1995) e Nakayama (2005).

2.2.5 Equipamentos

Sistema de Distribuição Simultânea de Gases. O objetivo do sistema de distribuição simultânea de gases é a manutenção de condições de anaerobiose nos frascos utilizados nos trabalhos experimentais. O sistema consiste de uma canalização com 4 saídas de gases simultâneas e controle de fluxo por válvulas de agulha. Em cada saída, é instalada uma mangueira com cerca de 30 cm, apropriada para gases, em que na extremidade contrária é instalada uma seringa de 3 mL. Nas seringas com sistema de travas são fixadas agulhas com 1

mm de diâmetro. A pressão dos gases é regulada por manômetros na saída dos cilindros de gases. Uma bomba de vácuo opera na mesma linha de distribuição dos gases, o que permite a lavagem da atmosfera dos frascos antes da introdução do gás desejado (VAZOLLER, 1995). O sistema atualmente implantado e empregado foi descrito em Nakayama (2005).

Coluna Catalítica. A coluna catalítica visa a remoção de traços de oxigênio presentes nos gases utilizados para cultivo de anaeróbios estritos. A coluna consiste por um cilindro de cobre com cerca de 20 cm de diâmetro, internamente preenchido por pedaços de cobre. O cilindro é revestido por amianto e inserido em uma caixa de aço, com sistema de aquecimento elétrico até 300°C. A entrada de gases na coluna é feita por uma cânula de cobre ligada aos cilindros. Outra cânula de cobre liga a saída dos gases da coluna catalítica e entrada no sistema de distribuição simultânea de gases (VAZOLLER, 1995).

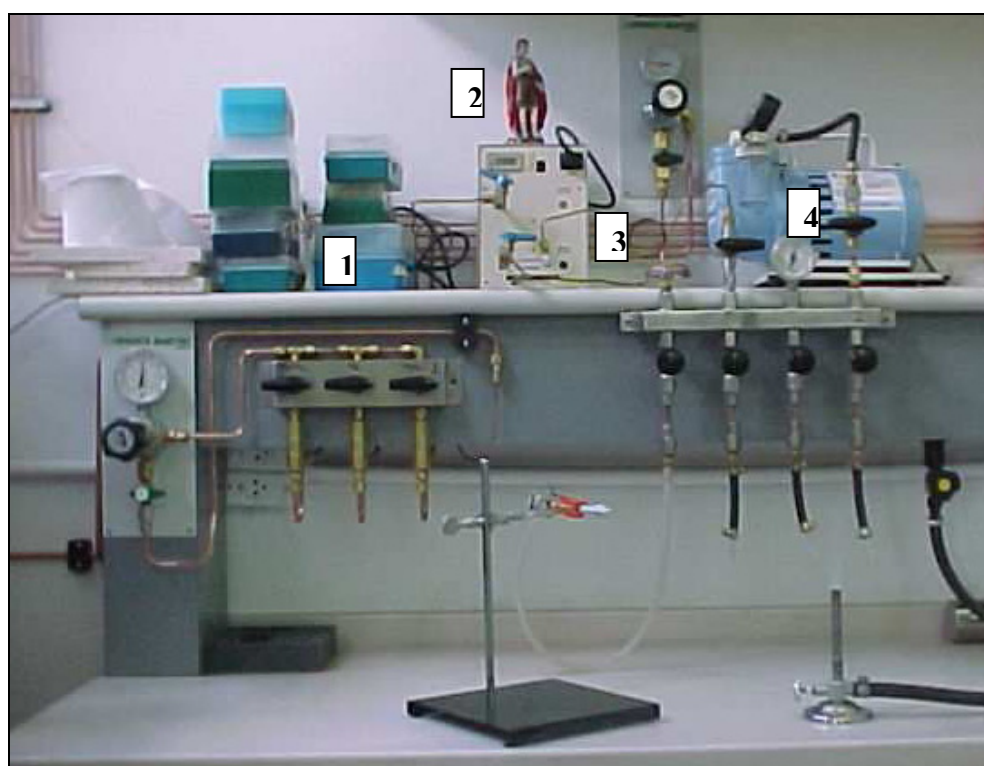


Figura 8 - Sistema de distribuição simultânea de gases – Laboratório de Microbiologia Ambiental ICB-USP. (1) Sistema de válvulas para seleção dos gases de trabalho (N_2 , $N_2:CO_2$ 70:30% ou $H_2:CO_2$ 80:20%); (2) Coluna removedora de traços de oxigênio; (3) Saídas de fluxo regulável, acopladas ao manômetro e com válvula e (4) conexão para a bomba de vácuo

2.2.6 Meios de cultivo e soluções estoque

Todo o preparo dos meios de cultura e das soluções estoque utilizadas nos cultivos anaeróbios devem ser realizados visando a remoção do oxigênio e a manutenção de um estado pré-reduzido. Nesta fase, utiliza-se como indicador de potencial de óxido-redução a resazurina, para garantir as condições exigidas de anaerobiose. A resazurina tem a cor rosa quando oxidada e se torna incolor em potenciais abaixo de -100mV. A preparação dos meios de cultura reduzidos exige a utilização de frascos bem fechados, a fim de garantir o isolamento da atmosfera. Por isso, os frascos são fechados com tampas de borracha de butila e lacrados com lacres de alumínio, ou ainda tampados com batoques de butila e fechados com tampa de rosca. Além de assegurar um fechamento eficiente, os frascos de cultura devem ser resistentes à pressão, uma vez que os procedimentos de esterilização em autoclave devem ser feitos com os frascos já lacrados.

Meio de Cultivo Basal – Zinder. O meio basal Zinder (ZINDER; KOCH, 1984) foi utilizado nos ensaios de enriquecimento, nas diluições seriadas e para o “*Roll-Tube*”, visando o isolamento de arqueias metanogênicas. O meio de cultivo foi preparado pela dissolução dos componentes em água destilada previamente fervida por 5 minutos para a expulsão do oxigênio na ordem apresentada na Tabela 5. Após homogeneização dos componentes, o meio foi fluxionado com atmosfera de nitrogênio (100%) durante 20 minutos. Ainda sob fluxo desse gás, o meio foi distribuído em frascos de antibiótico de 100 mL e 30 mL, em volumes necessários para os respectivos ensaios. Em seguida, os frascos foram fechados com tampas de borracha de butila e lacrados com selo de alumínio para garantir as condições anaeróbias do meio. Os frascos foram autoclavados a 120°C por 20 minutos e estocados em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A preparação e distribuição do meio de cultivo foram realizadas de acordo com as técnicas de manipulação de anaeróbios estritos, descritos detalhadamente por Vazoller (1995).

Tabela 5 - Composição do Meio Basal Zinder

Componente	Quantidade ou Concentração
NH ₄ Cl	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05 g
Solução de Resazurina 0,1 % m/v	1,0 mL
Solução Traços de Metais	10,0 mL
Solução de Vitaminas	1%
Água Milli-Q	q.s.p 1000 mL

Fonte: ZINDER; KOCH.(1984)

Meio Rondônia. Um outro meio de cultivo utilizado neste trabalho foi o Meio Rondônia. Este meio possui a mesma composição do meio Zinder (Tabela 5), diferindo apenas na composição da solução Traço de Metais, já que no meio Rondônia a solução traço de metais é a descrita por Vazoller (1995) (Tabela 6).

Solução Traço de Metais. A solução traço de metais foi preparada adicionando-se primeiramente o Tritriplex III na água destilada. O pH foi ajustado para 7,0 com uma solução de KOH 10 N. Posteriormente foram acrescentados os demais componentes, descritos na Tabela 4. A solução foi fluxionada por nitrogênio 100% por 20 minutos, distribuída em frascos Duran, tampadas com tampas de borracha de butila e lacradas com selo de alumínio. Após a esterilização, por autoclavagem, a solução foi estocada sob refrigeração e ao abrigo da luz.

Tabela 6 - Composição da solução Traço de Metais Vazoller (1995), utilizada no meio de cultivo Rondônia, e a solução Traço de Metais Zinder, utilizada no meio de cultivo Zinder

Solução traço de metais	Vazoller	Zinder
Reagentes	Quantidade	
Ácido nitrilotriacético (NTA)	1,5 g	4,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,556 g	0,556 g
MgSO ₄	0,244 g	--
MnSO ₄ .H ₂ O	0,5 g	0,086 g
Na ₂ MoO ₄	0,2043 g	0,01 g (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O)
Na ₂ WO.2H ₂ O	0,24 g	--
Na ₂ SeO ₃	0,15 g	--
NiCl ₂ .6H ₂ O*	0,1 g	0,02 g
CoCl ₂ .6H ₂ O*	0,1 g	0,17 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g	0,21 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01 g	--
AlK(SO ₄) ₂	0,0054 g	--
H ₃ BO ₃	0,01 g	0,19 g
Água Milli-Q	q.s.p. 1000 mL	q.s.p. 1000 mL

Fonte: VAZOLLER (1995) e ZINDER; KOCH (1984).

Solução Redutora de Sulfeto de Sódio 5% e Solução de Cisteína/Sulfeto. Para a redução do meio de cultivo foram utilizadas as soluções redutoras de cisteína /sulfeto e redutora de sulfeto de sódio 5%. A solução redutora de sulfeto de sódio 5% foi preparada pela dissolução de 5 g de

$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água destilada previamente fervida e sob atmosfera de nitrogênio (100%). Por tratar-se de um sal altamente higroscópico, anteriormente a pesagem a umidade do sal era retirada em filtro de papel. A solução foi fluxionada com nitrogênio (100%) durante 10 minutos, e distribuída sob frascos de antibiótico de 30 mL sob fluxo do mesmo gás. Os frascos foram imediatamente fechados com tampas de borracha de butila, lacrados com selo de alumínio e autoclavados a 120°C durante 20 minutos. Após a esterilização, os frascos foram armazenados a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

A solução redutora de cisteína/sulfeto foi preparada pela dissolução de 3,1 g cisteína HCl. $6\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água destilada previamente fervida e sob fluxo de nitrogênio (100%). O pH foi corrigido para 9,5 com solução NaOH (3N). Em seguida, 3,1 g de $\text{NaS} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (sulfeto de sódio) foram adicionadas e o volume completado para 250 mL com água destilada previamente fervida e medida em balão volumétrico. O fluxo de nitrogênio foi mantido por 15 minutos para garantir a anaerobiose. A solução foi então distribuída sob fluxo de nitrogênio (100%) em frascos de antibiótico. Posteriormente, os frascos foram autoclavados (121°C por 20 minutos) e estocados a temperatura ambiente.

Solução de resazurina. A solução de resazurina 0,1% é uma solução indicadora do potencial de óxido-redução do meio de cultivo, ou seja, indicadora de anaerobiose. Para o preparo, 0,1g de resazurina era diluída em 100 mL de água destilada, e armazenada sob refrigeração (4°C), em frasco âmbar. A solução não era esterilizada, já que era adicionada ao meio Zinder antes da autoclavação.

Soluções de bicarbonato de sódio 10% e vitaminas. Devido à sensibilidade as altas temperaturas, as soluções de bicarbonato de sódio e vitaminas (VAZOLLER, 1995) foram esterilizadas a frio por filtração rápida pelo sistema Millipore em membrana de 0,22 μm de porosidade, em condições de assepsia. Todo o material utilizado na preparação dessas soluções foi previamente esterilizado por autoclavagem a 120 °C durante 20 minutos.

A solução de Bicarbonato de Sódio 10% foi preparada para a manutenção do pH pela dissolução do respectivo sal em água destilada previamente fervida e sob atmosfera de nitrogênio (100%). A solução foi fluxionada por esse gás durante 10 minutos, esterilizada por filtração rápida em sistema Millipore com membrana de 0,22 μm , e distribuída sob frascos de antibiótico de 30 mL, sob fluxo de nitrogênio (100%). Os frascos foram imediatamente fechados com

tampas de borracha de butila, lacrados com selo de alumínio e armazenados a temperatura ambiente na ausência de luz.

A solução de vitaminas para o crescimento de arqueias metanogênicas foi preparada pela dissolução dos componentes descritos na Tabela 7, em água destilada previamente fervida durante 5 minutos para expulsão do oxigênio, e sob fluxo de nitrogênio (100%). A solução foi esterilizada por filtração através do sistema Millipore com membrana de 0,22 μm . O frasco coletor foi imediatamente submetido ao fluxo de nitrogênio 100% e borbuhlado por esse gás durante 20 minutos. Em seguida, distribuiu-se a solução em frascos Duran de 250 mL, fechada com batoques de butila e lacradas com roscas plásticas. Os frascos foram envolvidos com papel alumínio e armazenadas sob refrigeração a 4°C.

Tabela 7 - Composição da solução de vitaminas para crescimento de arqueias metanogênicas

Reagente	Quantidade (g/L água destilada)
Biotina	0,002
Ácido Fólico	0,002
Tiamina. HCl	0,005
Riboflavina	0,005
Ácido Nicotínico	0,005
Pantotenato de Cálcio	0,005
Pridoxina. HCl	0,010
Vitamina B12	0,0001
Ácido Lipóico	0,005

Solução de acetato de sódio. A solução de acetato de sódio foi preparada pela dissolução de 16,4 g de acetato em 100 mL de água destilada previamente fervida. A solução foi borbuhlada pelo gás nitrogênio (100%) por 20 minutos. A seguir, alíquotas de 20 mL foram distribuídas em frascos de antibiótico de 50 mL sob fluxo de nitrogênio (100%), tampadas com tampas de borracha de butila, lacradas com selo de alumínio e esterilizadas por autoclavagem (120°C por 20 minutos) e armazenada a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Solução de formiato de sódio. A solução foi preparada pela dissolução de 5,19 g de formiato de sódio em 50 mL de água destilada previamente fervida. A solução foi borbuhlada pelo gás nitrogênio (100%) por 20 minutos. A seguir, alíquotas de 10 mL foram distribuídas em frascos de antibiótico de 30 mL sob fluxo de nitrogênio (100%), tampados com tampas de borracha de

butila, lacradas com selo de alumínio e esterilizadas por autoclavagem (120° por 20 minutos). A solução foi armazenada a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Solução de metanol. A solução de metanol foi preparada pela adição de 20 mL de metanol (99,9%) em 100 mL de água destilada. A água destilada foi borbulhada com nitrogênio (100%) durante 15 minutos, distribuída em alíquotas de 9,2 mL em frascos de antibiótico. O metanol foi borbulhado por nitrogênio (100%) por 3 minutos. Ambos foram lacrados e esterilizados por autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos. Após a esterilização, alíquotas de 0,8 mL do metanol foram transferidas sob condições de assepsia para os frascos contendo a água destilada.

Solução do antibiótico vancomicina. Para auxiliar na purificação de culturas de arqueias metanogênicas foi empregada uma solução 0,025% de vancomicina hidrocloreídica. A vancomicina foi diluída em água destilada, esterilizada por filtração em sistema Millipore com membrana de 0,22 µm e estocada sob refrigeração e ao abrigo da luz. Anteriormente a sua utilização, a solução foi fluxionada por 5 minutos com nitrogênio (100%) com auxílio do sistema Millipore com membrana de 0,22 µm.

2.2.7 Isolamento e cultivo de arqueias metanogênicas

Para isolar os microrganismos metanogênicos estão sendo empregados os ensaios de enriquecimento das amostras, diluição seriada, obtenção de colônias isoladas pela técnica de *Roll-Tube* e subcultivos e em meio líquido.

2.2.7.1 Ensaio de enriquecimento e potencial de produção de metano

Foram utilizados tubos de antibiótico de 100 mL, com 45,5 mL de meio Zinder. Antes das adições realizou-se a troca de atmosfera dos frascos estocados sob atmosfera de nitrogênio (100%). Para a troca de atmosfera, o nitrogênio foi retirado com bomba de vácuo, e imediatamente foi inserida a mistura gases N₂:CO₂ (70:30%), pelo sistema de distribuição simultânea de gases. O procedimento de retirada de nitrogênio e adição de N₂:CO₂ foi repetido por 3 vezes, durante 20 segundos cada etapa. Em seguida, os frascos eram despressurizados com agulha hipodérmica. Após a troca de atmosfera os meios de cultivo foram suplementados com vitaminas, solução tamponante de bicarbonato de sódio 10%, soluções redutoras de cisteína-

sulfeto e sulfeto de sódio, além das fontes orgânicas formiato, acetato e metanol (10 mM), utilizando seringas estéreis de 1 mL. A manipulação dos frascos sempre foi realizada sob condições de assepsia, em que as tampas dos frascos lacrados e estéreis eram flambadas com uma gota de álcool. Após a adição da solução redutora esperava-se a mudança da coloração do meio pela resazurina, para então, proceder à inoculação com seringas estéreis. Para a inoculação, o frasco contendo o meio completo foi aberto e imediatamente colocado sob fluxo de N₂:CO₂ (70:30%). A seguir, adicionou-se 1g de solo. O frasco foi fechado imediatamente com tampa de borracha de butila e lacrado com selo de alumínio. Foi feita uma nova troca de atmosfera, conforme descrito anteriormente. Os frascos foram então agitados vigorosamente durante 20 minutos e incubados a 30°C. A dosagem do gás metano foi realizada a cada período de 10 dias, por cromatografia gasosa (item 2.2.8).

2.2.7.2 Ensaio de diluição seriada

A inoculação das culturas foi feita em triplicatas de diluições seriadas decimais em frascos de antibiótico de 30 mL, contendo 9 mL do meio de Zinder acrescido de vitaminas, bicarbonato a 10%, solução redutora e fontes de carbono. A atmosfera dos frascos de antibiótico com meio Zinder (nitrogênio 100%) foi trocada para N₂:CO₂ (70:30%), conforme descrito anteriormente. Após a troca de atmosfera, os meios de cultivo foram suplementados com as soluções de bicarbonato de sódio, vitaminas, fontes orgânicas e redutoras, utilizando seringas estéreis de 1 mL. Em uma das repetições, adicionou-se 0,2 mL da solução de antibiótico vancomicina, previamente fluxionada por 20 minutos com nitrogênio (100%). Foi transferido 1 mL do cultivo do ensaio de enriquecimento em que foi detectada presença de metano para os frascos de antibiótico contendo 9 mL do meio Zinder completo, e agitou-se até homogeneizar a amostra. Transferiu-se 1 mL da diluição 10⁻¹ para outro frasco de antibiótico contendo 9 mL do meio Zinder completo, obtendo assim, a diluição 10⁻². Agitou-se. Transferiu-se 1 mL da diluição 10⁻² para outro frasco de antibiótico contendo 9 mL do meio Zinder completo, obtendo assim, a diluição 10⁻³. Agitou-se. Em seguida, as culturas foram incubadas em estufa a 30 °C.

2.2.7.3 Isolamento das culturas metanogênicas pela técnica do *Roll-Tube*

Para o preparo dos frascos com meio sólido utilizou-se frascos de antibiótico de 100 mL. Foram pesados 0,2 g de ágar bacteriológico e transferidos para os frascos mantidos sob fluxo de N₂ (100%). Transferiu-se 9,3 mL de meio basal Zinder para perfazer um volume total de 10 mL. Imediatamente os frascos foram tampados com tampa de borracha de butila, lacrados com selo de alumínio e autoclavados por 20 minutos a 121°C. Assim que foram retirados da autoclave, os frascos foram colocados em banho-maria a 57°C. Foi então realizada a troca de atmosfera para H₂:CO₂ (80:20%). A suplementação do meio de cultivo foi feita com vitaminas, solução tampão de bicarbonato de sódio 10% e solução redutora de sulfeto de sódio, além de 10 mM de cada fonte orgânica estudada formiato, acetato e metanol.

Ao final das adições, procedeu-se a inoculação com o meio ainda líquido, utilizando-se 0,2 mL de inóculo. Após a inoculação, os frascos foram deitados rapidamente e transferidos para uma bacia com gelo, onde foram girados rápida e incessantemente, até que se observasse a formação de uma película de ágar na parede do frasco. Os frascos foram então retirados do gelo e mantidos na posição horizontal por 5 minutos até que o ágar se solidificasse totalmente, e foram incubados invertidos a 30°C.

2.2.7.4 Transferência de culturas do *roll-tube* para subcultivo em meio líquido

Para a transferência das colônias selecionadas e a serem purificadas, foram preparados previamente tubos de ensaios para anaeróbios do tipo HUNGATE[®] da Bellco[®] Glass Inc., contendo meio basal Zinder sob atmosfera de N₂ (100%), fechados sob pressurização. Após a troca de atmosfera para H₂:CO₂ (80:20%), o meio de cultivo foi suplementado com solução de vitaminas, bicarbonato de sódio 10%, solução redutora de sulfeto de sódio, e as fontes orgânicas formiato, acetato e metanol (10 mM). As purificações foram feitas em duplicata, sendo que em uma das réplicas foi adicionado o antibiótico vancomicina. As colônias foram coletadas com o auxílio de uma pipeta Pauster de ponta afilada e curva, e transferidas para o meio líquido. Em seguida, as culturas foram incubadas em estufa a 30 °C. A dosagem do gás metano foi realizada após a visualização de turbidez no meio.

2.2.7.5 Repiques de subcultivos em frascos de antibiótico de 100 mL

Foram utilizados tubos de antibiótico de 100 mL, para um volume final de 50,0 mL. Nos frascos contendo 42,0 mL de meio Rondônia realizou-se a troca de atmosfera de nitrogênio (100%), para a mistura de gases $H_2:CO_2$ (80:20%), pelo sistema de distribuição simultânea de gases. Após a troca de atmosfera o meio de cultivo foi suplementado com vitaminas, solução tamponante de bicarbonato de sódio 10%, soluções redutoras de cisteína-sulfeto e sulfeto de sódio, as fontes orgânicas formiato, acetato e metanol (10 mM), além de extrato de levedura (10 mM), utilizando seringas estéreis de 1 mL. Para a inoculação, utilizou-se 10% do volume final de inoculo. Como inóculo, foram utilizados 5,0 mL das culturas de crescimento nos subcultivos em frascos HUNGATE[®]. Foi feita então uma nova troca de atmosfera, e os frascos foram incubados a 30°C. A dosagem do gás metano foi realizada por cromatografia gasosa (item 2.2.8). Após as dosagens de metano e retirada de alíquotas para microscopia e extração de DNA, os meios de cultivo foram novamente suplementados com vitaminas e fontes orgânicas, e reduzidos, quando necessário.

2.2.8 Determinação da concentração de metano por cromatografia gasosa

O monitoramento da produção de metano das culturas foi feito pela determinação, por cromatografia gasosa, da % do gás metano produzido na atmosfera livre do sistema. As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a gás modelo HP6850A com detector de ionização de chama (FID).

Os frascos de cultura tiveram suas tampas flambadas e foram agitados para a liberação do metano para o espaço livre. Para a injeção da atmosfera dos frascos no cromatógrafo utilizou-se seringa de vidro, com volume de 1 mL, e sistema de válvula Pressure-Lok, da marca Precision Analytical Syringe (Figura 9). A seringa foi inserida na tampa e lavada com a atmosfera do frasco por 5 vezes. Após a lavagem, 0,3 mL da atmosfera do frasco foi retirada e injetada rapidamente no cromatógrafo.



Figura 9 - Seringa de amostragem de gás

2.2.9 Caracterização morfológica das culturas metanogênicas

A caracterização microbiana foi realizada ao longo do experimento de enriquecimento e purificação, utilizando-se microscópio de fase e fluorescência para observar as morfologias celulares predominantes e detectar a presença de arqueias metanogênicas (que fluoresce sob luz UV, devido à enzima F420, emitindo luz azulada quando expostas ao comprimento de onda na faixa do ultravioleta).

Microscopia ótica. As lâminas utilizadas para detecção de autofluorescência e observação das morfologias celulares foram preparadas sob condições de assepsia. As lâminas foram observadas em microscópio marca Zeiss, modelo Axiovert S100, com câmera CCD Hamamatsu, cuja fotografia é processada através do software KS400 Imaging System 3.0. Primeiramente as lâminas foram percorridas em contraste de fase, de forma que as morfologias celulares possam ser observadas. Para visualização de autofluorescência nas amostras utilizou-se luz UV e filtro Dapi, que permite passagem de comprimento de onda de 365 nm e de 397 nm para excitação, de modo que as células autofluorescentes ficam azuis.

Microscopia eletrônica de varredura. Para a observação das células por microscopia eletrônica de varredura utilizou-se o protocolo descrito por Schneider et al. (2005), com algumas adaptações. Para a coleta das células, alíquotas do meio de cultivo foram retiradas com o auxílio de seringas estéreis de 1 mL e filtradas em membrana de acetato de celulose de 0,22 µm. As células foram fixadas com uma solução de glutaraldeído 2%, em tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,2, por 10 minutos, e em seguida foram lavadas e tratadas com tampão 1% OsO₄ por 1 hora, por duas vezes. As células foram desidratadas em séries graduais de etanol (25, 50, 75, 95, e 100%), lavadas uma vez com hexamethyldisilazina, e secas durante toda a noite a temperatura ambiente. Em seguida, foram cobertas com ouro e carbono, e observadas em microscópio.

2.2.10 Identificação de arqueias metanogênicas cultivadas por técnicas moleculares

2.2.10.1 Extração do DNA genômico das culturas

A extração do DNA genômico das arqueias metanogênicas foi realizada de acordo com Massana et al. (1997) com algumas adaptações. Foram centrifugados 5 mL de cultura por 10 minutos a 13.000 RPM. Em seguida, dispensou-se o sobrenadante. As células foram ressuspensas em 900 µL de tampão de lise (EDTA 40 mM; TRIS HCl pH 8,0 50 mM; sacarose

0,75M) em tubos de *ependorf* de 2 mL. Após, adicionou-se lisozima (concentração final de 1 mg/mL), e ressuspendeu-se com a pipeta, já que a lisozima não deve ir ao vórtex. Incubou-se em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado SDS (concentração final de 1%) e proteinase K (concentração final de 0,5 mg/mL), homogeneizando-se por inversão dos tubos gentilmente. Novamente incubou-se em banho-maria a 55°C pelo período de 2 horas. A fase aquosa foi extraída com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1). A amostra foi homogeneizada devagar e depois centrifugada a 13.000 RPM por 7 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo *ependorf*. Esta etapa foi repetida 2 vezes. Novamente extraiu-se a fase aquosa, agora com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Depois de homogeneizada, a amostra foi centrifugada a 13.000 RPM por 7 minutos. Todo o sobrenadante foi transferido para um novo tubo *ependorf*. A precipitação do DNA genômico foi feita pela adição de 0,1 volume de NaCl 5 M e 2 volumes de etanol absoluto gelado. As amostras ficaram incubadas durante toda a noite a -20°C. Depois deste período, foram centrifugadas a 12.000 RPM por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet e as paredes do tubo foram lavadas com etanol 70% gelado. O pellet foi ressuspendido e centrifugado a 12.000 RPM por 10 minutos a 4°C. O etanol foi dispensado cuidadosamente. O pellet foi seco no concentrador de DNA e ressuspendido em 20 µL de água ultra pura esterilizada. A documentação do gel foi feita pelo programa “Multi Analyst” do “Fluor-STM Multimager” (Biohad, Hercules, Califórnia, E.U.A.). Como padrão de tamanho de DNA foi utilizado o marcador molecular λ Hind. O material foi armazenado a temperatura de -20°C até o momento da próxima análise.

2.2.10.2 Amplificação do gene *mcrA*

Para detectar a presença das arqueias metanogênicas utilizou-se o par de iniciadores MLf (5'-GGTGGTGTMGGATTCACACARTAYGCWACAGC-3') e MLr (5'-TTCATTGCRTAGTTWGGRTAGTT-3') (LUTON et al., 2002), adquirido da empresa IDT – Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville – IA, EUA, a fim de amplificar especificamente uma região de aproximadamente 470 pb do gene *mcrA*. A amplificação foi feita em solução contendo 2,5 µL de tampão para PCR 10 X, 0,2 mM de cada dNTP (0,5 µL), 3,0 mM de MgCl₂ (1,5 µL), 10 ng de DNA (1 µL), 5 pmol de cada iniciador (1 µL), 1 U de Taq DNA polimerase recombinante (Gibco) (0,2 µL), água ultrapura esterilizada para um volume final de 25 µL. As

condições de reação foram 30 ciclos de 96°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos e 72 °C por 5 minutos, acordo com o protocolo de Luton et al. (2002). A verificação do tamanho dos *amplicons* resultantes foi feita por comparação com o padrão de 100 pb, após corrida eletroforética a 90 V por 35 minutos, em gel de agarose 1%. A documentação do gel foi feita pelo programa “Multi Analyst” do “Fluor-STM Multimager” (Biohad, Hercules, Califórnia, E.U.A.).

2.2.10.3 Amplificação do gene 16S rRNA

A amplificação do gene 16S rDNA de *Archaea*, foi realizada com os iniciadores ARCH21f (5' TTC YGG TTG ATC CYG CCR GA 3') e ARCH958r (5' YCC GGC GTT GAN TCC AAT T 3') (MOYER et al., 1998) – da empresa IDT – Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville – IA, EUA, para amplificar especificamente uma região de aproximadamente 937 pb do gene 16S rRNA. A amplificação foi feita em solução contendo: 2,5 µL de tampão para PCR 10 X, 0,2 mM de cada dNTP (0,5 µL), 3,0 mM de MgCl₂ (1,5 µL), 10 ng de DNA (1 µL), 5 pmol de cada iniciador (1 µL), 1 U de Taq DNA polimerase recombinante (Gibco) (0,2 µL), água ultrapura esterilizada para um volume final de 25 µL. As condições de reação foram 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto; e 72°C por 10 minutos. A verificação do tamanho dos *amplicons* resultantes foi feita por comparação com o padrão de 100 pb, após corrida eletroforética a 90 V por 35 minutos, em gel de agarose 1%. A documentação do gel foi feita pelo programa “Multi Analyst” do “Fluor-STM Multimager” (Biohad, Hercules, Califórnia, E.U.A.).

2.2.10.4 Purificação do produto de PCR

Todo o volume do produto de PCR (25 µL) foi transferido para tubos *ependorf* de 500 µL. Foram adicionados 60 µL de isopropanol 100% e 20 µL de água ultrapura esterilizada, e agitada vigorosamente (vórtex). Em seguida, as amostras foram incubadas por 2 horas a -20°C. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, por 25 min, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado totalmente com micropipeta (P 200). Adicionou-se 250 µL de etanol 70% (diluído em água ultrapura imediatamente antes de usar), e agitou-se (vórtex). A seguir, centrifugou-se a 14.000 rpm, por 5 min, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi totalmente descartado com micropipeta (P 200 e P 10). As amostras foram secas

no concentrador de DNA por 10 min. Os pellets foram ressuspensos em 30 μL de água ultrapura esterilizada. A qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose 1%. O restante foi armazenado a -20°C .

2.2.10.5 Mini-bibliotecas de clones do gene 16S rRNA

Clonagem. Os fragmentos amplificados e purificados do gene 16S rRNA (itens 2.3.10.3 e 2.3.10.4) foram clonados em vetor p-GEM-T (Promega), segundo as instruções do fabricante. A reação de ligação dos produtos de PCR ao plasmídeo pGEM-T-Easy foi feita utilizando-se tampão de ligação rápida 1X (30 mM de Tris-HCl pH 7,8, 10 mM de MgCl_2 , 10 mM de DDT, 1mM de ATP e 5% de polietileno glicol - PEG) e 3 U de T4 DNA ligase. Esse material foi incubado a 4°C durante toda a noite.

Transformação. O vetor p-GEM-T contendo o inserto foi utilizado para transformar células de *Escherichia coli* linhagem DH5 α por choque térmico. Na transformação 10 μL do produto de ligação e 50 μL de suspensão de células competentes foram misturados em microtubo e incubados no gelo por 30 minutos. Após esse período, a solução foi submetida a um choque térmico por incubação a 42°C por 30 segundos em banho-maria. Às células de *E. coli* foi adicionado 1mL de meio SOC e incubadas por 60 minutos em agitador a 37°C . Após o tempo de recuperação, as amostras foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo ampicilina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactoside) como substrato para a enzima β -galactosidase nas concentrações de 250 $\mu\text{g/mL}$ e 30 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Em seguida as placas foram incubadas na estufa a 37°C durante 16 horas. As colônias contendo o plasmídeo recombinante (brancas) foram coletadas aleatoriamente com o auxílio de palitos de madeira e inoculadas em 1 mL de meio LB líquido contendo ampicilina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), a 38°C , sob agitação, durante 22 horas.

Extração do DNA Plasmidial. O meio foi centrifugado a 4.000 rpm por 6 minutos a 20°C , para sedimentar as células. O pélete resultante foi lavado com GTE (25 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10 mM de EDTA pH 8,0, e 50 mM de glicose). Após descartar o sobrenadante, foram adicionados 80 μL de GTE; em seguida, as células foram ressuspensas por agitação. Em uma microplaca de fundo U (tipo Elisa) contendo 2,5 μL de RNase em cada cavidade (10 mg mL^{-1}), foram transferidos 60 μL de cada suspensão de células. A cada poço da placa foram adicionados 60 μL

de solução de lise (NaOH 0,2 mol/L e SDS 1%). A placa foi selada, misturada por inversão e incubada em temperatura ambiente por 10 min.. Em seguida, foram adicionados 60 µL de solução contendo 3M de acetato de potássio, 10 % de ácido acético glacial e misturou-se por inversão. A placa foi deixada 10 minutos a temperatura ambiente e então incubada aberta em estufa a 90°C por 30 minutos. Após esse tempo, a placa foi resfriada em banho de gelo por 10 minutos e centrifugada por 4 minutos (4000 rpm, 20°C). O sobrenadante foi então coletado e transferido para uma placa de 96 poços Millipore (MAGV N22), fixada sobre uma placa de fundo “V” de 250 µL e o conjunto centrifugado (sem a tampa) por 4 minutos a 4000 rpm, a 20°C. Ao filtrado que passou para a microplaca adicionaram-se 110 µL de isopropanol e em seguida centrifugou-se por 45 minutos a 4000 rpm. O precipitado de DNA foi então lavado com 200 µL de etanol 70%. Centrifugou-se novamente a 4.000 rpm, por 5 min, a 20°C. Após o descarte do sobrenadante, inverteu-se a placa sobre papel absorvente e centrifugou-se 900 rpm, por 3 min, a 20 °C. Após secar durante 1 hora a temperatura ambiente, o DNA foi ressuspensionado em 40 µL de água ultra pura, durante toda a noite, e armazenado a -20°C.

2.2.10.6 Análise de Restrição do DNA Ribossomal (ARDRA)

As reações de digestão foram realizadas utilizando-se aproximadamente 500 ng do produto de PCR resultante da amplificação do gene 16S rRNA de *Archaea*, 1,8 µL do tampão da enzima, 0,4 µL da enzima de restrição (10 U µL⁻¹), 0,15 µL de solução BSA 10 µL µg⁻¹, em volume final de 18 µL. As reações foram incubadas a 37°C por 3 horas. Todo o produto de PCR foi analisado em gel de agarose 2%, utilizando como padrão de tamanho de DNA o marcador molecular 100 BP DNA LadderTM (Invitrogen Life Technologies). O gel foi documentado através do programa “Multi Analyst” do “Flúor-STM Multimager” (BioRad, Hercules, Califórnia, E.U.A).

Abaixo se encontram descritas as enzimas de restrição (endonucleases) utilizadas neste estudo, com suas respectivas seqüências de corte:

- *HaeIII*: 5' G G ↓ C C 3'

- *HindIII*: 5' A ↓ A G C T ↑ T 3'

Para confirmar os resultados de restrição obtidos com a técnica de ARDRA, realizou-se uma análise de restrição *in silico*, utilizando a ferramenta NEBcutter do site REBASE (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>).

2.2.10.7 Seqüenciamento do gene 16S rRNA

Para o seqüenciamento utilizou-se uma alíquota de 200 ng de DNA plasmidial. Ao DNA plasmidial foram adicionados 5 pmoles. μL^{-1} do iniciador T7 ou SP6 (para cada reação), 2 μL de “DYEnamic ET Terminador” (Amersham Biosciences), 2 μL de tampão de diluição (200 mM Tris-HCl pH 9,0 e 5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e água ultra pura para um volume final de 10 μL . A amplificação foi realizada nas seguintes condições: 30 ciclos de 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C e 1 minuto a 60°C. Os produtos de PCR foram precipitados com uma solução de 2 μL de acetato de sódio 1,5 M e EDTA 250 mM, e 60 μL de etanol 100%. Após boa homogeneização, centrifugou-se a 4000 RPM por 45 minutos e lavou-se o pélete com 200 μL de etanol 70%. Centrifugou-se 4000 RPM por 10 minutos, a temperatura ambiente. Após o descarte do sobrenadante, o pélete foi seco 40 °C, por 10 minutos, em bloco aquecedor e ressuspendido em formamida. O sequenciador utilizado foi o ABI 3100 (Applied Biosystems).

2.2.10.8 Análise filogenética das seqüências

As seqüências foram analisadas através dos programas Phred/Phrap/Consed em sistema operacional Linux (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, et al., 1998) para a formação dos *contigs*. As seqüências *consensus* de cada indivíduo foram analisadas e editadas removendo as bases de baixa qualidade (<20). As seqüências foram analisadas pelo BLASTn contra a base de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information, website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A classificação taxonômica das seqüências foi realizada pelo RDP Classifier utilizando o nível máximo de restrição (*Confidence threshold*: 95%). A construção e visualização da árvore filogenética foram realizadas com o auxílio do programa Mega 3.1 (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004). O alinhamento das seqüências foi realizado através do programa Clustal W 1.8 (<http://www.ebi.ac.uk/index.html>) (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). O ajuste das extremidades das seqüências de DNA, de forma que

todas elas tivessem o mesmo número de bases e estivessem completamente alinhadas foi realizado manualmente. Para o cálculo da significância estatística da similaridade entre as seqüências foi utilizada uma re-amostragem para 1000 replicações (SWOFFORD et al., 1996). O método de distância “Neighbor Joining” (SAITOU; NEI, 1987) baseado no modelo Kimura-2 (KIMURA, 1980) foi usado na construção da árvore filogenética.

2.2.10.9 Análise da diversidade de *Archaea* do solo por biblioteca genômica

2.2.10.9.1 Extração do DNA genômico total do solo

Para a extração do DNA genômico total das amostras de solo, utilizou-se o kit “Ultra Clean–Soil DNA KitTM”, Mo Bio Laboratories, conforme instruções do fabricante. Primeiramente adicionou-se 500 mg de amostra de solo ao tubo contendo solução Bead, e homogeneizou-se (vórtex) gentilmente. Então, adicionaram-se 60 µl da Solução 1 do kit e homogeneizaram-se as amostras, invertendo os tubos várias vezes. Em seguida, as amostras foram incubadas a 70° C por 10 minutos. Após este período, adicionaram-se 200 µl de Solução IRS (Solução de Remoção de Inibidor) e as amostras foram submetidas à agitação (vórtex) na velocidade máxima por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 9.700 RPM por 30 segundos. O sobrenadante (400-450 µl) foi transferido para um novo tubo do Kit. Foram adicionadas as amostras 250 µL de Solução 2 e agitou-se (vórtex) por 5 segundos. As amostras foram então incubadas a 4° C por 5 minutos. Após a incubação, foram centrifugadas a 9.700 RPM por 1 minuto. Todo o sobrenadante foi transferido para um novo tubo do kit. 1.300 µL da Solução 3 do kit foram adicionados às amostras, que foram agitadas (vórtex) por 5 segundos. Foram transferidos 700 µl da amostra para o filtro do kit, e centrifugados a 9.700 RPM por 1 minuto. Após o descarte do líquido, repetiu-se o processo até que todo o sobrenadante tivesse passado pelo filtro. Adicionaram-se 300 µl da solução 4 e centrifugou-se a 9.700 RPM por 30 segundos. Todo o líquido do tubo foi descartado, e centrifugou-se novamente por 1 minuto. O filtro foi transferido para um novo tubo do kit, e adicionou-se 50 µl da Solução 5 no centro do filtro, centrifugando a 9.700 RPM por 30 segundos. O filtro foi então descartado e o tubo contendo o DNA foi armazenado a -20° C.

2.2.10.9.2 Bibliotecas de 16S rDNA

Amplificação e clonagem do gene 16S rRNA. Para a construção de bibliotecas de seqüências de 16S rDNA de *Archaea* foram utilizados na PCR os iniciadores ARCH21f e ARCH958r (MOYER et al., 1998), conforme descrito no item 4.2.3. Os fragmentos amplificados e purificados foram clonados em vetor p-GEM-T (Promega), segundo as instruções do fabricante.

Transformação. A transformação foi feita por eletroporação, utilizando-se alíquotas de 40 µL células competentes da estirpe JM109 de *E. coli* foram misturadas a 3 µL do sistema de ligação a ser eletroporado. A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm (BioRad) previamente resfriada e colocada na câmara de eletroporação. As amostras foram submetidas a um choque elétrico de 1,8 kV utilizando o eletroporador *GenePulser II* (BioRad). Os demais procedimentos da transformação bacteriana, coleta dos clones transformantes e extração do DNA plasmidial encontram-se descritos em detalhes no item 4.8.5.

Seqüenciamento do gene 16S rDNA. Utilizou-se uma alíquota de 200 ng de DNA plasmidial, 5 pmoles.µL⁻¹ do iniciador T7, 2 µL de “DYEnamic ET Terminador” (Amersham Biosciences), 2 µL de tampão de diluição (200 mM Tris-HCl pH 9,0 e 5 mM MgCl₂.6H₂O) e água ultra pura para um volume final de 10 µL. A amplificação foi realizada nas seguintes condições: 30 ciclos de 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C e 1 minuto a 60°C. Os produtos de PCR foram precipitados com uma solução de 2 µL de acetato de sódio 1,5 M e EDTA 250 mM, e 60 µL de etanol 100%. Após boa homogeneização, centrifugou-se a 4000 RPM por 45 minutos e lavou-se o pélete com 200 µL de etanol 70%. Centrifugou-se 4000 RPM por 10 minutos, a temperatura ambiente. Após o descarte do sobrenadante, o pélete foi seco 40 °C, por 10 minutos, em bloco aquecedor e ressuspenso em formamida. O sequenciador utilizado foi o ABI 3100 (Applied Biosystems).

2.2.10.9.3 Análise das seqüências de 16S rDNA

Os cromatogramas gerados pelo seqüenciamento dos clones de rDNA 16S de *Archaea* foram analisados através dos programas Phred/Phrap/Consed em sistema operacional Linux (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998), para remoção de seqüências do vetor e as bases de baixa qualidade. Somente seqüências contendo qualidade >20 (1 erro a cada 100 bases lidas) foram consideradas para análises posteriores. A

afiliação taxonômica das seqüências foi feita comparando-se as seqüências de rDNA 16S com as seqüências depositadas no Ribossomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu>), utilizando-se o programa RDP Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>).

O número de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) foi determinados utilizando-se o programa DOTUR (Distance Based OTU and Richness Determination) (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005). Para tanto, as seqüências foram alinhadas utilizando o programa Clustal X 1.83 (THOMPSON et al., 1997) com os parâmetros “gap-opening penalty” de 10.0 e “gap-extention penalty” de 0.1. O alinhamento foi utilizado para calcular uma matriz de distância evolutiva através do DNADIST, programa do pacote PHYLIP 3.63, usando o algoritmo de Jukes–Cantor.

As estimativas de riqueza de UTOs considerando distância evolutiva de 0.01 e 0.03 para definição de UTOs, foram feitas pelo programa SPADE, utilizando métodos não-paramétricos ACE (Abundance-based Coverage Estimator) e Chao1. Os índices de diversidade de Shannon e Recíproco de Simpson e a cobertura de amostragem também foram determinados utilizando-se o programa SPADE. As bibliotecas de 16S rDNA foram comparadas utilizando-se o programa S-Libshuff (SINGLETON et al, 2001) (<http://www.arches.uga.edu/~whitman/libshuff.html>), o qual determina o nível de probabilidade de duas bibliotecas diferentes entre si com base em curvas de coberturas homólogas e heterólogas.

2.3. Resultados e Discussão

2.3.1 Enriquecimento das amostras de solo e potencial de produção de metano

O método de enriquecimento adotado tem-se mostrado adequado para o crescimento de culturas metanogênicas. As fontes de carbono, bem como as concentrações escolhidas foram baseadas no trabalho de Vazoller (1995), por serem importantes para estimular a degradação anaeróbia em todas as suas etapas.

O ensaio de enriquecimento do solo foi realizado a fim de estimular o crescimento microbiano metanogênico. O meio de cultivo utilizado foi o meio basal Zinder acrescido de vitaminas, solução tampão de bicarbonato de sódio 10% e soluções redutoras de cisteína-sulfeto e/ou sulfeto de sódio, além das fontes orgânicas precursoras diretas do metano, como formiato, acetato e metanol (item 2.2.6, Material e Métodos). O meio de cultura foi descrito por Zinder em Zinder e Koch (1984) para o desenvolvimento de culturas anaeróbias estritas, particularmente de arqueias metanogênicas. Sua constituição básica é simples, contendo equilibradamente as fontes de macronutrientes nitrogênio e fósforo (Tabela 5). A complementação com os demais micronutrientes e fatores de crescimento é determinada pela seleção prévia da cultura alvo. Assim, os organismos metanogênicos requerem uma série de vitaminas, minerais e fontes de enxofre bastante específicas, bem como são pobremente exigentes em relação à fonte de carbono, necessitando em geral compostos de um carbono (GARCIA; PATEL; OLLIVIER, 2000; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). A opção, na presente pesquisa, pelo uso de fontes acetotróficas e hidrogenotróficas em conjunto na etapa de enriquecimento das culturas foi fundamental para promover o desenvolvimento da maioria dos grupos metanogênicos (REEVE et al., 1997; GARCIA; PATEL; OLLIVIER, 2000; MEUER et al., 2002).

As amostras de solo TP1 e Adjacente, TP2 e Adjacente, TM e Adjacente, VZ1, VZ2 e VZ3, nas profundidades 0-20, 20-40, 40-70 e 70-100 cm foram inoculadas no meio de enriquecimento como descrito, em um total de 36 frascos de enriquecimento. Como também observado, as amostras foram inicialmente cultivadas sob atmosfera de $N_2:CO_2$ (70:30), e após 50 dias de incubação a atmosfera dos frascos foi substituída pela mistura gasosa de $H_2:CO_2$ (80:20). O objetivo da troca foi manter controlada a anaerobiose, visto que o hidrogênio é um gás utilizado pelas metanogênicas e, ao ser consumido, provoca vácuo na atmosfera livre do sistema de reação. A formação do vácuo pode ser prejudicial aos cultivos, pois favorece a entrada de

oxigênio nos frascos durante sua manipulação para dosagens cromatográficas do gás metano. O ensaio de enriquecimento foi mantido até os 90 dias de incubação, e os 36 frascos de enriquecimento foram analisados quanto à produção de metano em intervalos de 10 dias.

O enriquecimento da amostra VZ1 (Figura 10a) apresentou produção de metano a partir do 20° DI (dia de incubação), com aumento na porcentagem de metano até os 40 DI. Somente a amostra coletada à profundidade de 0 a 20 cm apresentou produção de metano já a partir do 10° DI, com aumento notável do gás até o 30° DI, seguido por uma redução abrupta no 40° DI. Após a alteração da atmosfera dos frascos de enriquecimento no 50° DI para H₂:CO₂, houve expressivo aumento na produção do gás metano em todas as profundidades coletadas da amostra VZ1, e no 90° DI verificou-se a maior produção na amostra coletada entre 0 e 20 cm, ou seja, cerca de 40% de metano na atmosfera total do frasco de reação. As demais amostras apresentaram valores em torno de 20 a 30%.

Nos cultivos VZ2 (Figura 10b) ocorreram aumentos progressivos de metano até o 40° DI, exceto pela amostra obtida a 40-70 cm, a qual não apresentou produção do gás. Entretanto, após a alteração da atmosfera de todos os frascos no 50° DI, observou-se que a amostra 40-70 cm respondeu positivamente, sendo que no 90° DI a composição do metano na atmosfera atingiu valores elevados, em torno de 90%.

A amostragem no ponto VZ3 (Figura 10c) resultou em enriquecimentos com baixa produção de metano até o 40° DI, particularmente das amostras coletadas nas profundidades 20 e 40 cm e 70 e 100 cm. Com a troca de atmosfera dos frascos no 50° DI, as duas amostras foram as que apresentaram maior composição de gás metano na atmosfera dos frascos de reação no 90° DI, em torno de 80%.

Os dados de produção de metano mostram que a troca da atmosfera de N₂:CO₂ para H₂:CO₂ foi fundamental para o crescimento metanogênico. Para o enriquecimento de arqueias metanogênicas de amostras desconhecidas pode ser fundamental o emprego da atmosfera de H₂:CO₂. Como já foi comentado, as metanogênicas utilizam um número limitado de substratos, sendo que a mistura de hidrogênio e dióxido de carbono é o substrato mais utilizado, e pode ser assimilado por todas as metanogênicas, em todos os ambientes metanogênicos (BALCH et al., 1979; REEVE et al., 1997; CONRAD, 1999). Embora a maioria das espécies hidrogenotróficas

possa também utilizar o formiato para a formação do metano (ZINDER, 1993; GARCIA; PATEL; OLLIVIER, 2000), várias espécies metanogênicas são autótrofas, ou seja, crescem somente sob hidrogênio e dióxido de carbono, e seu crescimento não é estimulado pela adição de fatores de crescimento ou suplementação de nutrientes, como vitaminas, extrato de levedura, ácidos graxos e outros (OREMLAND, 1988). Desta forma, a inclusão de hidrogênio e dióxido de carbono no meio de enriquecimento favoreceu o crescimento de todos os tipos metanogênicos.

Embora em muitas várzeas de arroz e sedimentos de lagos, a degradação do acetato tem sido demonstrada como a via preferencial para a metanogênese, sendo a acetogênese responsável por até 67% da produção de metano (CONRAD, 1999), já foi demonstrado que em várzeas de arroz subtropicais que tenham sido corrigidos com matéria orgânica, as metanogênicas hidrogenotróficas são dominantes (ADACHI, 1999). Também em solos turfosos - "*peat lands*", a redução do CO₂ é considerada a principal via para a metanogênese. Neste ambiente, a via hidrogenotrófica é tão dominante que outros precursores potenciais para a metanogênese, como o acetato, podem até mesmo se acumular (WHITICAR; FABER; SCHOELL, 1986; HINES; DUDDLESTON, 2001). As várzeas de arroz, assim com os solos turfosos, possuem algumas características semelhantes àsquelas encontradas nas várzeas amazônicas estudadas, como a sazonalidade de inundação e acúmulo de matéria orgânica.

Deve-se considerar também que o tempo requerido para o início da produção de metano foi necessário para a adaptação da microbiota. Como abordado anteriormente, na natureza as metanogênicas são dependentes da atividade de outros microrganismos anaeróbios, devido principalmente à suas necessidades de fontes orgânicas bastante simples, gerando assim consórcios microbianos que promovem a metanogênese (ZINDER, 1993; VAZOLLER, 1995). Somente quando os substratos para a formação do metano estão presentes no ambiente anaeróbio, porém, não gerados pela atividade de outros microrganismos é que os metanogênicos se desenvolvem independentemente (OREMLAND, 1988). Embora fosse este o caso do meio de cultivo, que dispunha de fontes orgânicas precursoras diretas do metano, há que se considerar a adaptação da comunidade microbiana. Se em ambientes naturais a distribuição de espécies metanogênicas é inteiramente dependente de sua adaptação à variação de temperatura, pH e salinidade (GARCIA; PATEL; OLLIVIER, 2000), é esperado que em meios de enriquecimento ocorra o mesmo.

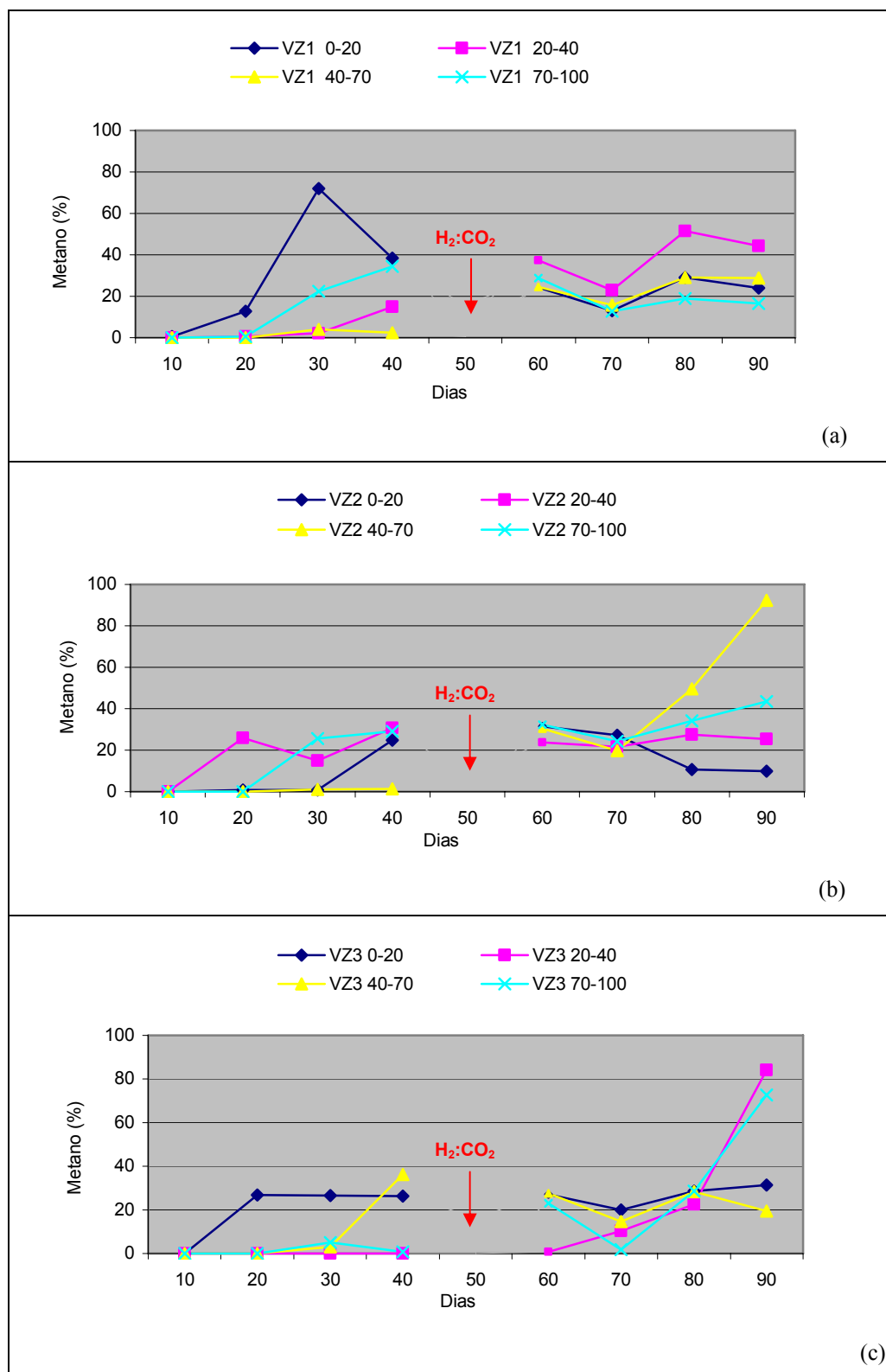


Figura 10 - Representação gráfica dos valores em porcentagem atmosférica do gás metano em função do tempo - Ensaio de enriquecimento amostras VZ1 (a), VZ2 (b) e VZ3 (c)

Nas amostras denominadas TP1 e adjacente (Figura 11a), a presença de metano somente foi observada no 80° DI, com exceção da amostra TP1 0-20 cm, que a partir da troca de atmosfera no 50° DI apresentou produção do gás. Nas amostras TP1 20-40 cm e adjacente 70-100 cm não ocorreu geração de metano durante todo o ensaio. A maior produção de metano foi observada na amostra adjacente TP1 na composição de 20%.

Embora a maior parte dos estudos de metanogênicas nos solos tenha sido realizada em várzeas de arroz, provavelmente elas sejam ubíquas nos solos (Le MER; ROGER, 2001). Ainda que apresentando teores de metano inferiores aos encontrados nos solos de várzea (Figura 10), foi detectada a produção de metano também na terra firme (Figura 11), comprovando a existência das arqueias metanogênicas nestes ambientes. Tanto pH, quanto a quantidade de matéria orgânica, a temperatura e a concentração de nutrientes influenciam a atividade das metanogênicas e a estrutura de sua comunidade (ZINDER, 1993). Desta forma, é natural que a comunidade de metanogênicas da terra firme tenha requerido um maior tempo de adaptação para crescimento e produção de metano, visto que este ambiente não apresenta as condições preferenciais para a metanogênese. A TP1 e adjacente, apesar de serem solos bastante densos, com alto teor de argila (Tabela 3), o que dificulta a drenagem e gera micro-ambientes anaeróbios, são solos quimicamente pobres. A TP1 apresenta valores de pH variando de 4,4 a 5,6, e P de 1 a 7 mg dm⁻³, e o solo adjacente pH 4,0 a 4,3, e P de 1 a 4 mg dm⁻³ (Tabela 4). Também nos solos, o conteúdo nutricional constitui o fator mais determinante ao desenvolvimento microbiano. Ainda que haja excesso de determinadas fontes de carbono como nutrientes, a carência de compostos contendo fósforo ou nitrogênio provocará uma limitação do crescimento (BARBOSA; TORRES, 1999).

As amostras TP2 foram as que apresentaram os mais baixos valores de metano de todas as amostras estudadas (Figura 11b). Os valores obtidos com todas as parcelas dos solos estudadas foram relacionados à textura deste solo, pois é um fator que afeta a produção de metano. Solos com elevados teores de argila são pobremente drenados e propensos à anaerobiose, o que favorece a metanogênese (Le MER; ROGER, 2001). Ao contrário, solos de textura argilosa são bem drenados e de fácil difusão de oxigênio, não fornecendo o potencial de óxido-redução requerido para anaeróbios estritos, particularmente de -350mV para as arqueias metanogênicas. Também o pH da TP2 e adjacente estiveram em torno de 3,4 a 4,2 (Tabela 3), e as metanogênicas possuem atividade ótima em pH neutro ou ligeiramente alcalino (Le MER; ROGER, 2001),

embora existam estudos de metanogênicas crescendo em ambientes ácidos como solos turfosos - “*peatlands*” (GALAND, 2004), pântanos turfosos - “*peat bogs*” (HALES et al., 1996) e serrapilheira em solos turfosos - “*Sphagnum peat bog*” (SIZOVA et al., 2003). Kotsyurbenko et al. (2007) isolaram de um solo turfoso uma *Methanobacterium* sp. utilizadora de $H_2:CO_2$, em meio de cultivo com pH 4,5. Contudo, a maioria das metanogênicas crescem em pH 6 (ZINDER, 1993).

Os enriquecimentos das amostras TM e adjacente (Figura 11c) resultaram em apenas 3 amostras positivas em oito para a produção de metano. Os maiores valores de metano na composição da atmosfera dos frascos de cultura foram determinados nas amostras TM 20-40 cm com 35%, adjacente TM 20-40 cm com 28% e adjacente TM 40-70 cm com 12%.

Assim como nos solos de várzea, na terra firme o $H_2:CO_2$ foi essencial para estimular a atividade metanogênica. Em todos os cultivos de terra firme a metanogênese foi observada apenas após a troca da atmosfera para $H_2:CO_2$. A utilização da mistura gasosa em 4 partes de hidrogênio para 1 parte de dióxido de carbono como substrato de crescimento das arqueias metanogênicas é indicado em função da estequiometria da reação de formação do metano (HUNGATE, 1969). Provavelmente nestas amostras, predominaram as metanogênicas hidrogenotróficas, que oxidam o hidrogênio e reduzem o dióxido de carbono para a formação do metano (GARCIA; PATEL; OLLIVIER, 2000). O dióxido de carbono é utilizado como substrato universal para a metanogênese e é reduzido a metano pela presença do hidrogênio como doador de elétrons (CANHOS; VAZOLLER, 1999).

O crescimento metanogênico hidrogenotrófico em meios de enriquecimento foi verificado também por Joulian et al. (1998), em seu trabalho de isolamento de metanogênicas em várzeas de arroz. Os autores utilizaram em separado as fontes de carbono formiato, metanol, acetato e a mistura de hidrogênio e dióxido de carbono, e verificaram a dominância das hidrogenotróficas em 8 dos 13 solos estudados. Sizova et al. (2003), em enriquecimento de metanogênicas de serrapilheira de solo ácido utilizando em separado acetato, metanol e hidrogênio e dióxido de carbono, somente observaram atividade metanogênica em $H_2:CO_2$. A ampla distribuição e dominância das metanogênicas hidrogenotróficas pode ser entendida, já que do ponto de vista energético, a redução do CO_2 é a reação mais favorável, enquanto a reação menos favorável é a reação acetoclástica. Assim a pressão da seleção natural conduziu à evolução

de muitas mais espécies hidrogenotróficas do que acetotróficas (GARCIA; PATEL; OLLIVIER, 2000).

Contudo, deve-se considerar que quando se trata de amostras ambientais desconhecidas, o uso de todas as fontes de carbono deve ser considerado, evitando desta forma, privilegiar o crescimento de um grupo metanogênico em detrimento a outro. Principalmente no caso de amostras amazônicas, onde não há conhecimento prévio das comunidades metanogênicas, já que este é o primeiro estudo de isolamento de metanogênicas da Amazônia.

A atividade metanogênica no solo pode ser facilmente detectada porque a atividade é diretamente relacionada à quantidade de metano produzida. Entretanto, as quantidades de metano emitidas nem sempre são proporcionais à atividade metanogênica, porque as taxas da emissão representam a quantidade de metano produzido em camadas anóxicas, menos a quantidade de metano oxidada por metanotróficas em camadas aeróbias (GALAND, 2004). Assim, a atividade metanogênica é mais precisamente relacionada à produção potencial do metano. Por isso, o método escolhido de verificação do potencial de metano em enriquecimentos, incubados sob anaerobiose é hoje o método mais utilizado (Le MER; ROGER, 2001; GALAND, 2004). A quantificação do metano por cromatografia gasosa mostrou-se ser um método não destrutivo, que simplifica os procedimentos de amostragem, e eficiente para monitorar o crescimento metanogênico. Além disso, permite monitorar o crescimento de culturas como as sarcinas, que crescem em agregados densos e difíceis de separar em células individuais, que teriam suas populações subestimadas em análises visuais de turbidez ou leituras de densitometria ótica (JOULIAN et al., 1998).

As porcentagens de metano nos enriquecimentos, sobretudo nos solos de várzea, indicam o alto potencial de produção de metano nestes solos. Na amostra VZ2, profundidade 40-70 cm, e nas amostras VZ3 20-40 cm e VZ3 70-100 cm, os percentuais de metano chegaram a 92, 83 e 72, respectivamente. Estes valores mostram a alta atividade metanogênica de cultivos anaeróbios de solos tropicais.

Para a VZ1, VZ3, Adjacente TP1, TM, Adjacente TM e TP2, a maior produção de metano ocorreu na camada 20-40 cm de profundidade. Na VZ2, a maior produção foi na camada 40-70 cm, e para a TP1, na camada 00-20 cm. É sabido que a maior atividade biológica do solo geralmente encontra-se na camada 00-20 cm, devido ao maior acúmulo de matéria orgânica,

disposição de resíduos vegetais e animais, além do efeito das raízes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). Contudo, quando se trata de metanogênese, deve-se considerar que a disponibilidade de substratos é o principal fator limitante. Conseqüentemente, a produção máxima de metano irá ocorrer na profundidade do solo onde a maior parte da degradação anaeróbia ocorre (BERGMAN; SVENSSON; NILSSON, 1998). Assim, o menor potencial de produção de metano pode ser reflexo da deficiência de substratos apropriados ou à presença de substratos menos favoráveis naquelas profundidades.

O tempo de incubação requerido para produção de metano para os solos de terra firme foi expressivamente superior àquele requerido pelos solos de várzea. Enquanto no 30° DI 92% das amostras de várzea produziam metano, no mesmo período, nenhuma das amostras de terra firme apresentou produção deste gás. Provavelmente, características abióticas destes solos, como atributos químicos e físicos sejam os maiores responsáveis da maior atividade metanogênica em nas amostras de solo de várzea. Como previamente abordado, as várzeas apresentaram maior índice de pH, bem como maiores teores de macronutrientes, como P, K, Ca e Mg, do que as terras firmes, exceção feita à TM. Mas o provável principal motivo é o fato das várzeas permanecerem submersas durante parte do ano, ou seja, inundadas, o que gera um ambiente anaeróbio propício ao crescimento das arqueias metanogênicas (Le MER; ROGER, 2001). Para a maior parte das amostras de várzea, a produção de metano foi detectada a partir do 20° ou 30° DI. Mas deve-se considerar que longos períodos de incubação são requeridos pelas arqueias metanogênicas devido às suas exigências de anaerobiose estrita e crescimento fastidioso (ZINDER, 1998; SOWERS; SCHREIER, 1995). Sizova et al. (2003) relataram que no enriquecimento de amostras de serrapilheira em solo ácido, apesar de detectarem presença de metano a partir da segunda semana de cultivo, somente depois de 1 a 2 meses verificaram turbidez do meio de cultivo, e mesmo depois de 2 a 3 meses de cultivo, a porcentagem de metano foi em torno de 5-8 %.

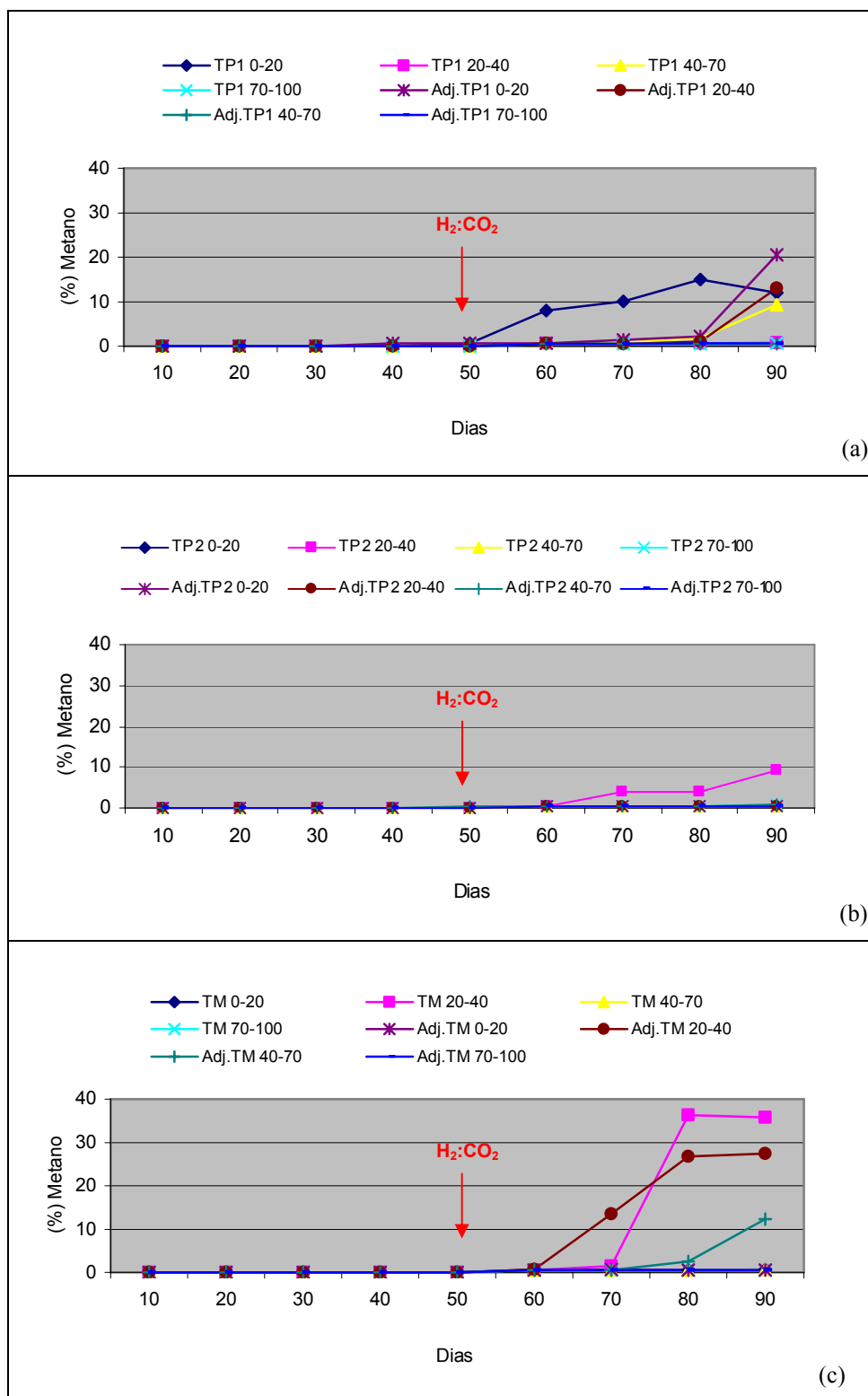


Figura 11 - Representação gráfica dos valores em porcentagem atmosférica do gás metano em função do tempo - Ensaio de enriquecimento amostras TP1 e Adjacente (a), TP2 e Adjacente (b), TM e Adjacente (c)

Muito embora a estratégia de enriquecimento utilizada neste trabalho não tenha sido realizada com base nos fatores abióticos do local, é possível destacar alguns dados de interesse quanto à ecologia da metanogênese local. Foi detectada atividade metanogênica em solos com pH em torno de 4,0, característico de solos amazônicos, indicando um possível caráter acidofílico ou ácido-tolerantes da comunidade metanogênica presente nestes solos. Além do baixo pH, os altos valores de Al encontrados nas amostras Ad.TP1, Ad.TM, e principalmente em TP1 e Ad.TP1 podem ser limitantes para o crescimento celular. Ainda hoje são poucos os trabalhos que conseguiram crescimento metanogênico a baixos valores de pH (WILLIAMS; CRAWFORD, 1985; HALES et al., 1996; SIZOVA et al., 2003; GALAND, 2004; KOTSYURBENKO et al., 2007). Williams e Crawford (1985) conseguiram isolar estirpes de metanogênicas de solo turfoso ácido somente quando utilizaram meio de cultivo com pH neutro, embora o solo de origem possuísse pH 3,5 - 4,5. Sizova et al. (2003) conseguiram crescimento metanogênico de isolados de serrapilheira ácida em meios de cultivo com pH variando de 3,9 a 5,3. Contudo, sabe-se que o ótimo de crescimento metanogênico ocorre em pH próximo a 6,0, como foi possível observar nos enriquecimentos VZ3. Ainda, outros atributos químicos do solo, como a relação C:P podem ter refletido nos resultados de metanogênese. Solos com melhor relação C:P, como as várzeas e a Terra Mulata apresentaram maior produção de metano. Outro fator limitante ao crescimento celular é a baixa disponibilidade de fósforo, observada nas amostras TP1, Ad.TP1, Ad.TM, que sabidamente pode ocasionar um menor crescimento celular ou um desenvolvimento mais lento.

Os resultados do presente estudo mostram que as metanogênicas encontram-se distribuídas em todos os solos estudados nesta região da Amazônia Oriental.

O solo enriquecido foi utilizado posteriormente como inóculo no ensaio de isolamento por diluição seriada.

2.3.2 Isolamento e purificação das culturas metanogênicas enriquecidas

A estratégia para conseguir linhagens purificadas de arqueias metanogênicas, a partir das amostras enriquecidas com produção de metano, envolveu o emprego da técnica de diluição decimal seriada de amostras e do método do *roll-tube* para obtenção de colônias e subcultivos em meio líquido (item 2.2.7, Material e Métodos). O método do *roll-tube*, desenvolvido por Hungate (1969) para a obtenção de culturas microbianas anaeróbias, é, ainda hoje, uma das melhores

opções para esse fim. Em conclusão, deve-se afirmar que os passos adotados para a obtenção de culturas metanogênicas purificadas foram bastante apropriados, como apontado anteriormente por Vazoller (1989; 1995).

2.3.2.1 Obtenção de cultivos metanogênicos pela técnica da diluição decimal seriada

As diluições decimais seriadas foram feitas para purificar as culturas obtidas no ensaio de enriquecimento. Das amostras de solo de várzea foram selecionadas 12 culturas que apresentaram notável produção do gás metano como mostrado na Figura 10. Das culturas enriquecidas a partir das amostras de terra firme, apenas 5 amostras foram selecionadas para isolamento em virtude da ausência ou baixa produção de metano (Figura 11). Foram feitas diluições decimais seriadas até 10^{-3} em triplicata, totalizando 153 frascos de cultura incubados.

Embora existam indicações na literatura especializada do emprego de faixas maiores de diluição seriada para obtenção de arqueias metanogênicas de amostras de lodos de esgoto ou de resíduos sólidos em processos anaeróbios de tratamento de resíduos (VAZOLLER, 1989; BADRA, 1993; VAZOLLER, 1995), a escolha da faixa de diluição empregada nesse estudo (até 10^{-3}) foi aleatória, ainda que tenha sido levada em conta a provável ocorrência de um baixo número de arqueias metanogênicas nas amostras enriquecidas de várzea e terra firme, pela possível presença de oxigênio na origem dessas amostras.

Para auxiliar a purificação das culturas metanogênicas, em uma das repetições foi adicionado o antibiótico vancomicina na concentração final de 0,1%. Os organismos do Domínio *Archaea*, como as metanogênicas, são resistentes há alguns tipos de antibióticos devido à composição química de sua parede celular (ZINDER, 1998). Esta resistência pode ser utilizada como uma vantagem para eliminar contaminantes bacterianos durante o isolamento de arqueias metanogênicas. Antibióticos como a penicilina e a vancomicina afetam a biossíntese da parede celular de bactérias por interferência nas reações envolvendo o aminoácido D-alanina, o que não ocorre durante a biossíntese da pseudomureína em metanogênicas (JONES; NAGLE; WHITMAN, 1987). Ainda, o emprego da vancomicina possui a vantagem de não inibir o crescimento do gênero metanogênico *Methanosaeta* sp., o que ocorre com a penicilina (ZINDER, 1998). Segundo Vazoller (1989), a aplicação da vancomicina na concentração de 0,001 mg/mL é satisfatória para purificar culturas metanogênicas.

Para a análise de crescimento das culturas metanogênicas empregaram-se as técnicas de cromatografia gasosa e a leitura visual do crescimento em função da turbidez, da formação de flocos ou grumos e de biofilmes no meio cultivado. Os valores de gás metano obtidos por cromatografia gasosa na atmosfera dos tubos foram sempre qualitativos, uma vez que a finalidade da análise era apenas constatar o crescimento metanogênico. Para as culturas de várzea foram feitas 3 leituras de gás metano, aos 20, 40 e 60 dias de incubação. Por sua vez, nos cultivos de terra firme foram realizadas 2 quantificações do metano, aos 30 e 90 dias de incubação. A leitura de produção de metano do ensaio de diluição decimal seriada, positiva ou negativa, encontra-se na Tabela 8 para cultivos enriquecidos de solos de várzea e Tabela 9 para os cultivos enriquecidos de terra firme.

Tabela 8 - Leitura da produção de gás metano ao longo do tempo - Diluições decimais seriadas das amostras enriquecidas de solo de várzea

Profundidade (cm)	Diluição	Vancomicina	Produção de Metano								
			VZ1			VZ2			VZ3		
			20 DI*	40 DI	60 DI	20 DI	40 DI	60 DI	20 DI	40 DI	60 DI
0-20	10 ⁻¹	-	+	+++	+++	+	+	++	++	+++	+++
	10 ⁻¹	+	+	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++
	10 ⁻²	-	+++	+++	+++	+	++	+	+	+	+
	10 ⁻²	+	-	+	++	+	+	+	-	-	+
	10 ⁻³	-	-	++	+++	-	+	+	-	+	+
	10 ⁻³	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
20-40	10 ⁻¹	-	+	+	+	+	++	+++	-	++	++
	10 ⁻¹	+	-	+	+	+++	+++	+++	-	+	+
	10 ⁻²	-	-	+	+	+	++	+++	-	++	++
	10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	10 ⁻³	-	-	-	-	+	+	++	-	++	++
	10 ⁻³	+	-	-	-	+	++	++	-	++	++
40-70	10 ⁻¹	-	+	+	++	+	+	+	+	++	++
	10 ⁻¹	+	+	+	+	+	++	++	+	+	+
	10 ⁻²	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻²	+	-	-	-	+	+	++	+	+	+
	10 ⁻³	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻³	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
70-100	10 ⁻¹	-	+	+++	+++	+	+	+	+	+	++
	10 ⁻¹	+	++	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++
	10 ⁻²	-	+	+	+	-	+	+	+	+++	+++
	10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻³	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
	10 ⁻³	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

VZ1: Várzea 1; VZ2: Várzea 2; VZ3: Várzea 3. Leitura: - = 0; + = < 5%; ++ = > 5%; +++ = > 10%. *DI: Dias de incubação. + = com vancomicina; - = sem vancomicina.

Tabela 9 - Leitura da produção de gás metano em função do tempo do ensaio - Diluições decimais seriadas das amostras enriquecidas de terra firme

Amostra	Profundidade (cm)	Diluição	Vancomicina	Produção de Metano	
				30 DI	90 DI
TP1	00-20	10 ⁻¹	-	-	+
	00-20	10 ⁻¹	+	+	+
	00-20	10 ⁻²	-	+	+
	00-20	10 ⁻²	+	+	+
	00-20	10 ⁻³	-	-	+
	00-20	10 ⁻³	+	-	-
Ad.TP1	20-40	10 ⁻¹	-	+	+
	20-40	10 ⁻¹	+	+	+
	20-40	10 ⁻²	-	+	++
	20-40	10 ⁻²	+	+	++
	20-40	10 ⁻³	-	+	+
	20-40	10 ⁻³	+	+	++
TP2	20-40	10 ⁻¹	-	+	+
	20-40	10 ⁻¹	+	+	+
	20-40	10 ⁻²	-	+	+
	20-40	10 ⁻²	+	+	++
	20-40	10 ⁻³	-	-	-
	20-40	10 ⁻³	+	+	+
TM	20-40	10 ⁻¹	-	+	+
	20-40	10 ⁻¹	+	+	+++
	20-40	10 ⁻²	-	+	+++
	20-40	10 ⁻²	+	+	++
	20-40	10 ⁻³	-	+	++
	20-40	10 ⁻³	+	+	++
Ad.TM	20-40	10 ⁻¹	-	+	++
	20-40	10 ⁻¹	+	+	+
	20-40	10 ⁻²	-	+	+
	20-40	10 ⁻²	+	+	++
	20-40	10 ⁻³	-	+	+
	20-40	10 ⁻³	+	+	++

TP1: Terra Preta 1; Ad. TP1: Adjacente Terra Preta 1; TP2: Terra Preta 2; TM: Terra Mulata; Ad.TM: Adjacente Terra Mulata.

Leitura: - = 0; + = < 5%; ++ = > 5%; +++ = > 10%. *DI: Dias de incubação.

+ = com vancomicina; - = sem vancomicina.

A presença ou ausência de metano, bem como turbidez do meio de cultura não apresentou relação com a presença de vancomicina. Entretanto, para dar continuidade ao processo de purificação a preferência sempre foi ao frasco com o antibiótico. Além disso, uma das trélicas, sem vancomicina, foi mantida apenas como frasco de segurança, não tendo sido utilizada para fins de isolamento. Esses frascos foram mantidos estocados, após leitura de presença de turbidez

nos meios de cultura. Não se utilizou o método das diluições com o fim de determinar-se nenhuma ordem de grandeza da presença de metanogênicas nas amostras.

As diluições das amostras enriquecidas tanto de solo de várzea quanto terra firme apresentaram ótimo crescimento e produção de metano, sendo que não se observou metano apenas nas repetições VZ1 a 20-40cm e na diluição 10^{-3} , TP1 a 00-20 cm na diluição 10^{-3} , e Ad.TP2 a 20-40 cm, diluição 10^{-3} .

O meio de cultivo utilizado, meio Zinder acrescido de fontes orgânicas, apresentou os requerimentos básicos para o crescimento celular. Segundo Vazoller (1995), o meio de cultivo isento de fontes de carbono mais complexas, como açúcares, proteínas, ácidos orgânicos de cadeia carbônica maior que o ácido acético, desfavorece o crescimento da maioria dos procariontes não metanogênicos presentes em consórcios anaeróbios na natureza em que ocorre a metanogênese, como mostrado na Figura 3 (NOVAES, 1986). Assim, pode-se afirmar que o meio de cultivo empregado foi propício para o crescimento de metanogênicos acetotróficos e hidrogenotróficos, facilitando sua seleção.

As diluições originaram culturas mantidas em mesmo meio por sub-cultivos. Neste trabalho, foi possível obter 20 culturas selecionadas com base na produção de metano. Estas 20 culturas foram submetidas ao método de *roll-tube* para a obtenção colônias, e assim aprimorar a obtenção de culturas puras.

2.3.2.2 Isolamento das culturas metanogênicas pelo Método do *Roll-tube*

A técnica do *roll-tube* como referida anteriormente foi desenvolvida por Hungate (1969) com a finalidade de obter o crescimento e o isolamento de colônias de microrganismos anaeróbios estritos celulolíticos em meio sólido. As culturas selecionadas para aplicação da técnica do *roll-tube* foram as que produziram metano no ensaio de diluição decimal seriada, dando-se preferência aos cultivos nas maiores diluições e na presença de vancomicina. As diluições das amostras enriquecidas de solos de várzea foram inoculadas em meio sólido após 15 dias de incubação e certificada a presença do gás metano. As diluições das amostras enriquecidas de terra firme resultaram em crescimento tardio, e somente foram inoculadas em meio sólido após 90 dias de incubação das diluições decimais seriadas.

Assim, após os resultados do crescimento dos cultivos diluídos (Tabelas 8 e 9), as culturas selecionadas e a serem submetidas ao *roll-tube* foram: - solo de várzea - VZ1 00-20 cm, 10^{-2} ; VZ1 20-40 cm, 10^{-2} e vancomicina; VZ1 70-100 cm, 10^{-1} , vancomicina; VZ1 70-100 cm, 10^{-3} , vancomicina; VZ2 20-40 cm, 10^{-3} e vancomicina; VZ2 40-70 cm, 10^{-3} e vancomicina; VZ3 70-100 cm, 10^{-1} e vancomicina; VZ3 70-100 cm, 10^{-2} ; - solos de terra firme - TP1 0-20 cm, 10^{-1} e vancomicina; TP1 0-20 cm, 10^{-2} e vancomicina; Ad.TP1 20-40 cm, 10^{-2} ; Ad.TP1 20-40 cm, 10^{-2} e vancomicina; Ad.TP1 20-40 cm, 10^{-3} e vancomicina; TP2 20-40 cm, 10^{-2} e vancomicina, TM 20-40 cm, 10^{-1} e vancomicina; TM 20-40 cm, 10^{-2} e vancomicina; TM 20-40 cm, 10^{-3} e vancomicina; Ad.TM 20-40 cm, 10^{-1} ; Ad.TM 20-40 cm, 10^{-2} e vancomicina; Ad.TM 20-40 cm, 10^{-3} e vancomicina.

Após 7 dias de cultivo, colônias foram observadas em alguns frascos - *roll-tube* das amostras oriundas de solos de várzea. A primeira quantificação de metano foi feita no 30° DI, quando foi nítido o desenvolvimento de colônias isoladas (Figura 12). A segunda quantificação do gás metano, bem como as análises morfológicas das células crescidas sob microscopia ótica de contraste de fase, foi realizada após 120 dias de incubação, o que permitiu o melhor desenvolvimento das colônias e maior atividade metanogênica.

Nos *roll-tubes* com amostras oriundas de solos de terra firme, os cultivos provenientes de TM e Adjacente TM apresentaram crescimento rápido tal como no solo de várzeas, ou seja, após uma semana de incubação, com formação de colônias isoladas. Nas demais culturas, a formação de colônias foi verificada após o 90° dia de cultivo. A determinação do metano foi realizada no 120° DI.



Figura 12 - Fotografias dos frascos de *roll-tube* com a presença de colônias

Após o crescimento e produção de metano, as colônias das diferentes amostras foram observadas a fim de avaliar a cor e forma das mesmas. A análise morfológica revelou diferentes morfotipos de colônias, porém, a maioria em formato circular, amarela ou branca. As colônias obtidas e suas morfologias encontram-se descritas na Tabela 10.

Tabela 10 - Descrição dos morfotipos das colônias obtidas pela técnica de *roll-tube* de solos de várzea e terra firme da Amazônia Oriental

Amostra	Profundidade (cm)	Diluição	Morfologia da Colônia
VZ1	0-20	10 ⁻²	Circular, branca
VZ1	0-20	10 ⁻²	Circular, amarela, pequena
VZ1	70-100	10 ⁻¹	Circular, amarela, pequena
VZ1	70-100	10 ⁻¹	Circular, branca
VZ1	70-100	10 ⁻¹	Circular, branca, pequena
VZ1	70-100	10 ⁻³	Circular, pequena, marrom escura
VZ1	70-100	10 ⁻³	Amorfa, transparente
VZ2	40-70	10 ⁻³	Circular, amarela, pequena
VZ2	40-70	10 ⁻³	Circular, branca, pequena
VZ2	40-70	10 ⁻³	Amorfa, transparente
VZ2	20-40	10 ⁻³	Circular, amarela, grande
VZ2	20-40	10 ⁻³	Circular, amarela, pequena
VZ2	20-40	10 ⁻³	Circular, branca, pequena
VZ3	70-100	10 ⁻¹	Circular, marrom, c/ halo
VZ3	70-100	10 ⁻¹	Rugosa, marrom
VZ3	70-100	10 ⁻¹	Circular, branca, c/ ponto escuro ao centro
VZ3	70-100	10 ⁻²	Circular, marrom, pequena
VZ3	70-100	10 ⁻²	Rugosa, branca
TP1	0-20	10 ⁻¹	circular, branca, pequena
TP1	0-20	10 ⁻²	rugosa, branca
Ad. TP1	20-40	10 ⁻²	circular, marrom
Ad. TP1	20-40	10 ⁻²	circular, branca, pequena
TP2	20-40	10 ⁻²	circular, marrom, pequena
TM	20-40	10 ⁻¹	circular, branca
TM	20-40	10 ⁻¹	circular, branca, pequena
TM	20-40	10 ⁻²	amorfa, transparente
TM	20-40	10 ⁻²	circular, branca, pequena
TM	20-40	10 ⁻³	circular, branca, pequena
TM	20-40	10 ⁻³	amorfa, transparente
Ad. TM	20-40	10 ⁻¹	circular, branca, pequena
Ad. TM	20-40	10 ⁻¹	amorfa, transparente
Ad. TM	20-40	10 ⁻²	circular, esbranquiçada
Ad. TM	20-40	10 ⁻³	circular, amarela, pequena
Ad. TM	20-40	10 ⁻³	amorfa, transparente

VZ1: Várzea 1; VZ2: Várzea 2; VZ3: Várzea 3; TP1: Terra Preta 1; Ad. TP1: Adjacente Terra Preta 1; TP2: Terra Preta 2; TM: Terra Mulata; Ad.TM: Adjacente Terra Mulata. Leitura: - = 0; + = < 5%; ++ = > 5%; +++ = > 10%. *DI: Dias de incubação. Tamanho: Tamanho não indicado significa colônias de dimensão em mm; pequena: muito inferior a 0,5mm.

Dos 8 *roll-tubes* de solo de várzea, apenas 1 não apresentou crescimento de colônias, bem como produção de metano. Cada *roll-tube* apresentou de 2 a 3 tipos morfológicos diferentes de colônia. Dos 12 *roll-tubes* de terra firme, 9 apresentaram crescimento de colônias e foram positivos para a produção de metano. Destes, foi possível observar 1-2 tipos de colônias por frasco de cultivo (Tabela 10).

O método do *roll-tube* permitiu a obtenção de colônias isoladas, facilitando a análise dos morfotipos, da coloração e do tamanho das mesmas. A transferência das colônias para meio líquido foi então possível, e o crescimento nessas condições facilitou a continuidade das etapas de purificação das culturas metanogênicas, nos quais se incluiu um novo *roll-tube*. Os resultados serão apresentados nos itens a seguir.

1º Subcultivo de colônias em meio líquido

Como inóculo para subcultivo em meio líquido foram selecionadas as colônias provenientes dos frascos de *roll-tube* positivas para a produção de metano, descritas na Tabela 10. As primeiras colônias provenientes das amostras enriquecidas de solo de várzea somente foram sub-cultivadas em meio líquido após 137 dias de incubação, as demais no 170º DI. Foram selecionadas 18 colônias provenientes de 7 *roll-tubes*, e apenas um *roll-tube* permaneceu incubado devido à ausência de colônias. Os subcultivos foram feitos em duplicata, sendo um deles na presença do antibiótico vancomicina, totalizando 36 frascos de cultivo.

Por sua vez, as primeiras colônias de origem das amostras de terra firme foram sub-cultivadas no 33º DI e as demais após 120 dias de incubação. Foram selecionadas 18 colônias de 10 frascos de *roll-tube*. Destas, 10 foram sub-cultivadas em duplicata, sendo uma réplica cultivada na presença de vancomicina. As 8 colônias restantes não puderam ser repicadas em duplicata devido ao seu pequeno tamanho, tendo um único cultivo na presença de vancomicina. Os sub-cultivos das amostras oriundas de terra firme totalizaram 28 frascos.

O emprego desta técnica foi eficiente para a obtenção de colônias metanogênicas. Contudo, a técnica do *roll-tube* aliada à transferência das colônias em cultivos em meio líquido exige destreza e atenção em cada passo da técnica, conforme já verificado por Vazoller (1989). É

bastante trabalhosa, notadamente pelo cuidado da inserção dos gases durante a retirada das colônias e manutenção das condições sob anaerobiose.

O cultivo das células foi bem sucedido ao utilizar os frascos HUNGATE[®] da Bellco[®] Glass Inc. (Figura 13). Estes frascos, além de assegurar um fechamento eficiente, comportam um volume de meio de cultivo de até 10 mL, deixando um pequeno espaço livre, o que facilita a manutenção da anaerobiose do meio.



Figura 13 - Fotografia dos sub-cultivos em frascos HUNGATE[®] da Bellco[®] Glass Inc. contendo meio de cultivo Zinder líquido

A análise de crescimento das culturas foi feita por visualização da turbidez do meio e quantificação do metano por cromatografia gasosa na atmosfera dos frascos. A determinação do metano foi realizada após 32 dias de incubação. Dos sub-cultivos das amostras oriundas de solo de várzea, 53% apresentaram produção de metano, e daqueles originados de amostras de terra firme constatou-se a presença de metano em 60% dos frascos incubados. Os valores de quantificação de metano para as amostras de várzea encontram-se na Tabela 11 e das amostras de terra firme na Tabela 12.

Tabela 11 - Valores da produção de gás metano (%), origem dos sub-cultivos de culturas metanogênicas de solo de várzea da Amazônia Oriental em frascos HUNGATE®

Amostra	Profundidade (cm)	Morfologia Colônia Origem - <i>Roll-tube</i>	Vancomicina	(%) Metano - Frasco HUNGATE®	
VZ1	0-20	Circular, esbranquiçada	+	7,20	
	0-20	Circular, esbranquiçada	-	18,47	
	0-20	Circular, amarela, pequena	+	4,80	
	0-20	Circular, amarela, pequena	-	8,73	
VZ1	70-100	Circular, amarela, pequena	+	7,81	
	70-100	Circular, amarela, pequena	-	10,70	
	70-100	Circular, branca	+	-	
	70-100	Circular, branca	-	2,99	
	70-100	Circular, branca, pequena	+	0,02	
	70-100	Circular, branca, pequena	-	-	
	VZ1	70-100	Circular, pequena, marrom escura	+	-
		70-100	Circular, pequena, marrom escura	-	-
70-100		Amorfa, transparente	+	4,23	
70-100		Amorfa, transparente	-	7,80	
VZ2	40-70	Circular, amarela, pequena	+	4,07	
	40-70	Circular, amarela, pequena	-	5,18	
	40-70	Circular, branca, pequena	+	3,55	
	40-70	Circular, branca, pequena	-	3,70	
	40-70	Amorfa, transparente	+	4,02	
	40-70	Amorfa, transparente	-	7,32	
VZ2	20-40	Circular, amarela, grande	+	3,55	
	20-40	Circular, amarela, grande	-	-	
	20-40	Circular, amarela, pequena	+	1,16	
	20-40	Circular, amarela, pequena	-	2,60	
	20-40	Circular, branca, pequena	+	-	
	20-40	Circular, branca, pequena	-	-	
VZ3	70-100	Circular, marrom, c/ halo	+	-	
	70-100	Circular, marrom, c/ halo	-	-	
	70-100	Rugosa, marrom	+	-	
	70-100	Rugosa, marrom	-	-	
	70-100	Circular, branca, c/ ponto escuro ao centro	+	-	
	70-100	Circular, branca, c/ ponto escuro ao centro	-	-	
VZ3	70-100	Circular, marrom, pequena	+	-	
	70-100	Circular, marrom, pequena	-	-	
	70-100	Rugosa, branca	+	-	
	70-100	Rugosa, branca	-	-	

VZ1: Várzea 1; VZ2: Várzea 2; VZ3: Várzea 3; Leitura: - = 0; + = < 5%; ++ = > 5%; +++ = > 10%. *DI: Dias de incubação. Tamanho: Tamanho não indicado significa colônias de dimensão em mm; pequena: muito inferior a 0,5mm. + = com vancomicina; - = sem vancomicina.

Tabela 12 - Produção de gás metano (%) de sub-cultivos de culturas metanogênicas de solo de terra firme da Amazônia Oriental em frascos HUNGATE®

Amostra	Profundidade (cm)	Morfologia Colônia Origem - Roll-tube	Vancomicina	(%) Metano - Frasco HUNGATE®
TP1	0-20	circular, branca, pequena	+	2,65
	0-20	circular, branca, pequena	+	-
TP1	0-20	rugosa, branca	+	-
	0-20	rugosa, branca	+	3,22
Ad. TP1	20-40	circular, marrom	+	0,10
	20-40	circular, branca, pequena	+	-
TP2	20-40	circular, marrom, pequena	+	4,29
	20-40	circular, marrom, pequena	+	0,84
TM	20-40	circular, branca	+	3,33
	20-40	circular, branca	-	5,13
	20-40	circular, branca, pequena	+	2,71
	20-40	circular, branca, pequena	-	14,00
TM	20-40	amorfa, transparente	+	4,13
	20-40	amorfa, transparente	-	4,60
	20-40	circular, branca, pequena	+	-
	20-40	circular, branca, pequena	+	-
TM	20-40	circular, branca, pequena	+	-
	20-40	amorfa, transparente	+	-
Ad. TM	20-40	circular, branca, pequena	-	-
	20-40	amorfa, transparente	-	-
Ad. TM	20-40	circular, esbranquiçada	+	-
	20-40	circular, esbranquiçada	+	-
Ad. TM	20-40	circular, amarela, pequena	+	0,72
	20-40	circular, amarela, pequena	-	5,29
	20-40	amorfa, transparente	+	1,38
	20-40	amorfa, transparente	-	0,13
	20-40	amorfa, transparente	+	1,79
	20-40	amorfa, transparente	-	0,08

TP1: Terra Preta 1; Ad. TP1: Adjacente Terra Preta 1; TP2: Terra Preta 2; TM: Terra Mulata; Ad.TM: Adjacente Terra Mulata. Leitura: - = 0; + = < 5%; ++ = > 5%; +++ = > 10%. *DI: Dias de incubação. Tamanho não indicado significa colônias de dimensão em mm; pequena: muito inferior a 0,5mm. + = com vancomicina; - = sem vancomicina.

Através do exame sob microscopia de contraste de fase das células presentes nas colônias coletadas foi possível observar os morfotipos celulares predominantes e avaliar a pureza das culturas. Na maioria das amostras examinadas verificou-se a predominância de bacilos do tipo reto, livres ou em pares. A Figura 14 ilustra bem os tipos predominantes que foram encontrados nas colônias oriundas das amostras VZ1 40-70 cm, VZ1 70-100 cm, VZ2 20-40 cm e VZ2 40-70 cm. Na Figura 14b não é possível descrever claramente sobre os tipos arredondados observados, pois durante o exame microscópico observou-se movimento das células. Algumas lâminas

apresentaram bacilos com diversidade de forma e tamanho, alguns pequenos e curvos, além de formas filamentosas. Foi também observada a presença de cocos fluorescentes e diplococos. A leitura de fluorescência indicou a presença de arqueias metanogênicas, cujas células em boas condições de crescimento fluoresceram na cor azul esverdeada. Não foram obtidas boas imagens sob microscopia de fluorescência a fim de serem apresentadas no texto.

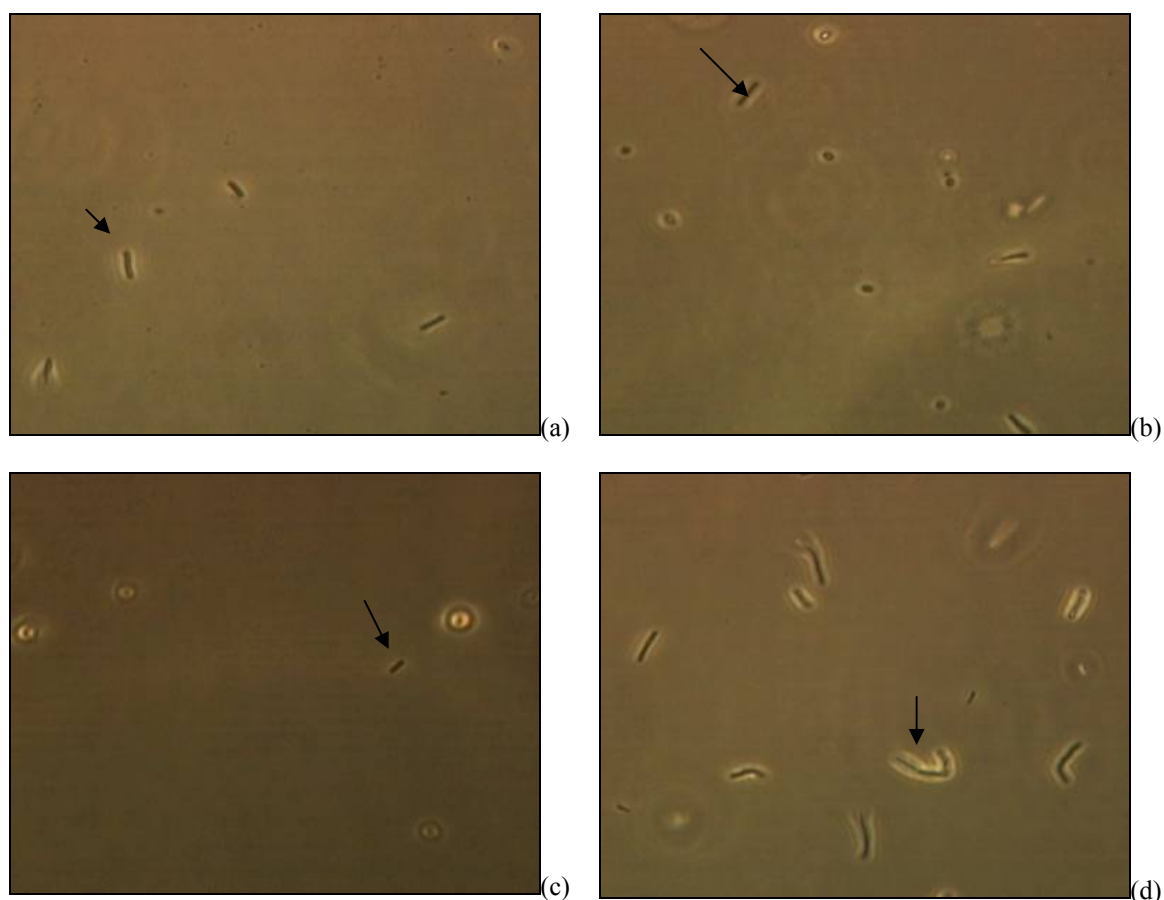


Figura 14 - Fotomicrografias das culturas metanogênicas purificadas, a saber: a) VZ1 40-70 cm, bacilos retos livres; b) VZ1 70-100 cm, bacilos retos livres; c) VZ2 20-40 cm, bacilo; d) VZ2 40-70 cm, bacilos retos livres ou em pares. Exame microscópico sob contraste de fase – ordem de magnitude (aumento de 1250 vezes)

2º Sub-cultivo para obtenção de novas colônias pelo método do *Roll-Tube*

Dando continuidade à purificação das culturas metanogênicas realizou-se um novo cultivo em meio sólido pela técnica do *roll-tube*. Como inóculos foram selecionados os subcultivos em meio líquido positivos quanto à presença de metano, dando preferência à réplica com

vancomicina. Após a retirada da alíquota de inóculo (0,2 mL), os frascos dos subcultivos foram realimentados com H₂:CO₂ e estes foram novamente incubados a 30°C, a fim de preservá-los. Foram preparados 10 e 5 *roll-tubes*, respectivamente dos sub-cultivos realizados em meio líquido das amostras de solos de várzea e de terra firme, sempre buscando privilegiar os cultivos com vancomicina aliada à presença de metano.

Analisando o crescimento das colônias dos novos *roll-tubes* para ambas as amostras de solo (Tabela 13), observou-se colônias com características distintas das inicialmente isoladas, mostrando que aparentemente as culturas ainda não estivessem puras. Como anteriormente abordado, a transferência de colônias do *roll-tube* para o meio de cultivo líquido exige muita destreza e rapidez, desta forma, é provável que no primeiro *roll-tube* tenham sido transferidas mais de uma colônia para o meio líquido. Outra possibilidade, ainda que remota devido às condições de anaerobiose estrita e presença de vancomicina em quase todas as etapas de purificação é a presença de contaminantes quando do cultivo em meio líquido.

Tabela 13 - Descrição das morfologias das colônias isoladas de solos de várzea e de terra firme da Amazônia Oriental obtidas na primeira e segunda purificações pelo método do *Roll-Tube*

Amostra	Profundidade (cm)	Morfologia Colônia Origem - 1° <i>roll-tube</i>	Morfologia Colônia 2° <i>roll-tube</i>
VZ1	0-20	- Circular, branca	- Rugosa, branca
	0-20	- Circular, amarela, pequena	- Circular, marrom clara
	70-100	- Circular, amarela, pequena	- Circular, marrom, pequena
	70-100	- Circular, branca	- Circular, branca
		- Circular, amarela.	- Circular, amarela.
70-100	- Amorfa, transparente	- Rugosa, creme, pequena	
VZ2	20-40	- Circular, amarela, grande	<i>Sem crescimento</i>
	20-40	- Circular, amarela, pequena	-Circular, amarela, grande, c/ halo
		- Circular, amarela, pequena	- Circular, marrom, pequena;
	40-70	- Circular, amarela, pequena	- Circular, creme, grande
		- Circular, branca, pequena	- Rugosa, creme, pequena
40-70	- Amorfa, transparente	- Circular, amarela, grande	
TM	20-40	- Circular, branca	- Circular, marrom, pequena
	20-40	- Circular, branca, pequena	<i>Sem crescimento</i>
	20-40	- Amorfa, transparente	<i>Sem crescimento</i>
Ad. TM	20-40	- Circular, amarela, pequena	- Circular, creme, pequena;
		- Circular, marrom, pequena.	
	20-40	- Amorfa, transparente	<i>Sem crescimento</i>

VZ1: Várzea 1; VZ2: Várzea 2; TM: Terra Mulata; Ad.TM: Adjacente Terra Mulata.

Tamanho não indicado significa colônias de dimensão em mm; pequena: muito inferior a 0,5mm.

O cultivo da amostra VZ1 00-20 cm, com origem a partir de uma colônia circular e borda lisa, quando novamente submetido a novo *roll-tube*, revelou a presença de colônias com extremidades irregulares e aparência rugosa. Ambas colônias se apresentaram de coloração branca. A colônia circular de borda lisa, coloração amarela e tamanho pequeno da amostra VZ1 00-20 cm foi escolhida para o primeiro *roll-tube*, e seu cultivo em meio líquido seguido de novo *roll-tube* mostrou a formação de colônias bastante semelhantes, porém de coloração marrom. Isso pode ser devido ao tempo de incubação, tornando a colônia mais espessa. O mesmo ocorreu para o cultivo da amostra VZ1 70-100 cm, cuja colônia escolhida, circular, de bordas lisas, cor amarela e tamanho pequeno, após sub-cultivo e novo *roll-tube* resultou no desenvolvimento de colônias mais escuras. A colônia escolhida de formato circular, com borda lisa e cor branca da amostra VZ1 70-100 cm, que deu origem no segundo *roll-tube* a colônias com as mesmas características, apresentou-se de coloração amarela. A amostra VZ1 70-100 cm deu origem a uma colônia amorfa e transparente, porém no segundo cultivo, as colônias dominantes apresentaram bordas irregulares, rugosa e coloração creme.

Nos cultivos da várzea 2, a colônia circular, de bordas lisas, cor amarela e tamanho grande da amostra VZ2 20-40 cm, não apresentou crescimento quando transferida do segundo *roll-tube*. Por outro lado, a colônia de morfologia circular, de bordas lisas, cor amarela e tamanho pequeno selecionada neste mesmo *roll-tube* deu origem a colônia de morfologia bastante semelhante no segundo cultivo em meio sólido, porém houve aparecimento de halo. A colônia selecionada no VZ2 40-70 cm, de formato circular, bordas lisas, cor amarela e tamanho pequeno originou dois tipos de colônias no segundo *roll-tube*: uma delas circular, marrom e de tamanho muito pequeno, e a outra também circular, porém de cor creme e tamanho grande. No cultivo da amostra VZ2 40-70 cm, a colônia selecionada de bordas lisas, cor amarela e tamanho pequeno, quando submetida a um segundo cultivo em meio sólido, originou colônias de bordas irregulares, rugosa e coloração creme. Por sua vez, a colônia amorfa e transparente também selecionada no *roll-tube* VZ2 40-70 cm originou no segundo cultivo, colônia circular, com bordas lisas, cor amarela e tamanho grande.

Nos cultivos provenientes de amostras de terra firme, a colônia selecionada do *roll-tube* TM 20-40 cm de morfologia circular, bordas lisas, e branca, apresentou no segundo subcultivo em meio sólido, colônia circular, de tamanho muito pequeno e cor marrom. No *roll-tube* Adjacente TM 20-40 cm a colônia circular, bordas lisas, amarela e pequena originou colônia

coma as mesmas características, exceto pela cor creme, e uma segunda colônia de tamanho muito pequeno e cor marrom. Já as colônias selecionadas nos cultivos TM 20-40 cm (colônia circular, branca, pequena), TM 20-40 cm (amorfa, transparente), e TM 20-40 cm (amorfa, transparente), não originaram colônias quando submetidas ao segundo *roll-tube*.

Como se pode perceber pela descrição das colônias, para a maioria delas as diferenças entre a colônia de origem e a colônia do segundo cultivo em meio sólido é muito pequena, geralmente apenas na coloração, que varia nos tons de creme a marrom e pode ser devida ao tempo de crescimento da colônia, apresentando maior ou menor espessura. Desta forma, há que se considerar que seja a mesma colônia, apenas obtida em condições diferentes mínimas, mas que tenham proporcionado ligeiras modificações no morfotipo.

Dos 10 frascos de cultivo de várzea, apenas um frasco não apresentou crescimento de colônias. Em relação aos cultivos de terra firme, em apenas 2 dos 5 frascos de cultivo cresceram colônias. A dosagem de metano nestes *roll-tubes* foi realizada somente na ocasião dos repiques para meio líquido, a fim de se evitar a oxidação dos *roll-tubes*. Em todos os *roll-tubes* com crescimento de colônias foi detectada produção de metano.

3º Subcultivo das novas colônias em meio líquido

Foi realizado um novo sub-cultivo em meio líquido de 11 colônias originadas das amostras em meio líquido de solo de várzea, sendo 9 delas sub-cultivadas em duplicata. Da mesma forma, foram preparados os sub-cultivos de 3 colônias de origem de solos de terra firme, sendo 2 delas em duplicata. Foram inoculados ao todo 25 frascos de cultivo HUNGATE®. As condições de cultivo foram idênticas às descritas no 1º subcultivo em meio líquido. As colônias sub-cultivadas estão listadas na Tabela 14.

Tabela 14 - Descrição das morfologias das colônias isoladas de solos de várzea e de terra firme da Amazônia Oriental selecionadas do subcultivo em meio Zinder líquido

Amostra	Profundidade (cm)	Morfologia Colônia
VZ1	0-20	Rugosa, branca
	0-20	Circular, marrom clara
	70-100	Circular, marrom, pequena
	70-100	Circular, amarela.
	70-100	Circular, branca, pequena;
	70-100	Rugosa, creme, pequena
VZ2	20-40	Circular, amarela, grande, c/ halo
	40-70	Circular, marrom, muito pequena;
	40-70	Circular, creme, grande
	40-70	Rugosa, creme, pequena
	40-70	Circular, amarela, grande
TM	20-40	Circular, marrom, pequena
Ad. TM	20-40	Circular, creme, pequena
	20-40	Circular, marrom, pequena

VZ1: Várzea; VZ2: Várzea 2; TM: Terra Mulata; Ad.TM: Adjacente Terra Mulata. Tamanho não indicado significa colônias de dimensão em mm; pequena: muito inferior a 0,5mm.

Até os 160 dias de incubação dos subcultivos de várzea, e 100 dias de incubação dos subcultivos de terra firme, em nenhum dos 25 frascos deste sub-cultivo havia sido detectada produção de metano. É sabido que as metanogênicas possuem crescimento fastidioso, e que ocorre uma diminuição do crescimento da cultura a cada subcultivo (VAZOLLER, 1989). Desta forma, para acelerar o crescimento metanogênico, estas culturas foram repicadas novamente em meio com algumas modificações e em maior volume, como descrito a seguir.

2.3.2.3 Sub-cultivos das amostras enriquecidas em frascos de antibiótico

Ao longo das etapas de purificação das culturas metanogênicas, alguns sub-cultivos não apresentaram crescimento, como descrito nos itens anteriores. Os cultivos com crescimento, como também mencionado, foram realizados em tubos HUNGATE[®], com um volume de 10 mL. Desta forma, optou-se por realizar o sub-cultivo em frascos de antibiótico em um volume final de 50 mL, visando estimular o crescimento celular das culturas que ainda não haviam apresentado produção de metano, bem como conseguir um maior volume de células crescidas e a obtenção das culturas metanogênicas mais purificadas com biomassa suficiente para a extração de DNA.

Desta forma, todos os 89 sub-cultivos realizados em tubos HUNGATE[®] oriundos do 1^o e 2^o sub-cultivo das colônias de *roll-tube* inoculadas em meio líquido, tanto das amostras de várzea quanto terra firme, foram repicados em frascos de antibiótico em um volume de 50 mL. Dos 89 sub-cultivos, 47 não apresentaram turvação do meio ou produção de metano, e 42 eram positivos para a produção de metano e turvação do meio.

Novos sub-cultivos foram realizados e algumas alterações foram feitas no meio de cultura como descrito no item 2.2.7.5 do capítulo Material e Métodos. Destacam-se as modificações em relação à adição de extrato de levedura no meio e de soluções traços de minerais e de vitaminas ligeiramente modificadas. Além disso, o cultivo foi obrigatoriamente sob atmosfera H₂:CO₂ (80:20%). Periodicamente também foram feitas novas adições de fontes para metanogênese das culturas (acetato, formiato, metanol e H₂:CO₂), sempre com o intuito de repor os substratos energéticos de crescimento. O respaldo a essas alterações foram os resultados positivos obtidos pelo Grupo Metano do Laboratório de Microbiologia Ambiental do ICB/USP no preparo e monitoramento dos enriquecimentos de sedimentos de rios de regiões do Estado de Rondônia com o meio em questão, que difere ligeiramente do meio Zinder.

A determinação do crescimento celular, feita pela turvação do meio de cultivo, verificação da produção do gás metano e exames microscópicos, mostrou que após 120 e 180 dias de incubação houve crescimento de 42 culturas. No 180^o DI, das 47 culturas que não apresentaram crescimento, apenas em 12 foi detectado gás metano e nas 35 restantes não foi observado crescimento, mesmo adotando a nova técnica. As demais 42 culturas que já haviam apresentado produção de metano nos ensaios de sub-cultivos em tubos HUNGATE[®] continuaram também a apresentar metano nestes sub-cultivos. Dentre as culturas positivas para a presença de metano (total de 54 amostras), foram selecionadas 41 com as maiores porcentagens de metano para a extração de DNA e posteriores estudos moleculares. A Figura 15 mostra alguns tipos microbianos observados após crescimento nos repiques, um deles proveniente de uma colônia rugosa, branca, selecionada no cultivo VZ3 70-100 cm, com presença de bacilos, alguns formando cadeias (Figura 15a) e originada de colônia circular, amarela, no cultivo VZ2 40-70 cm, com células muito pequenas, como cocobacilos e cocos (Figura 15b).

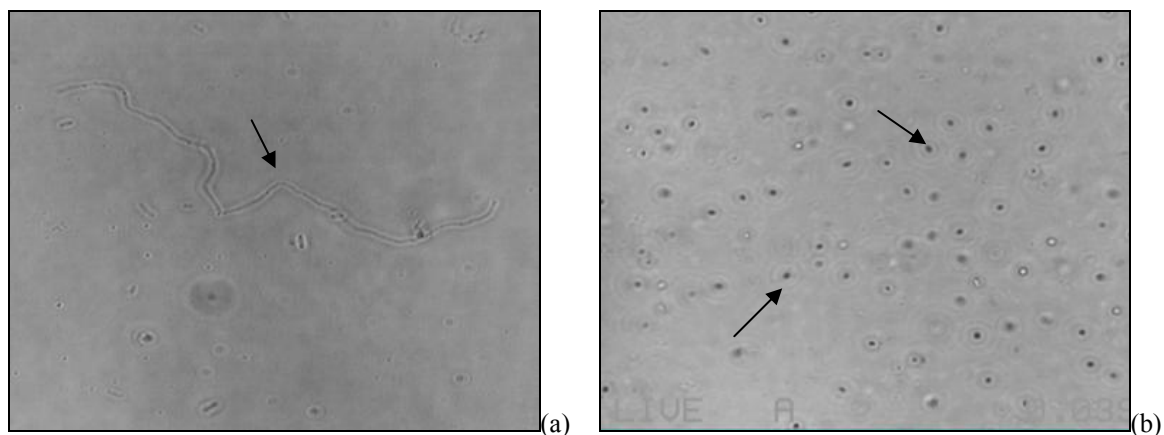


Figura 15 - Fotomicrografias das culturas metanogênicas purificadas, a saber: a) VZ3 70-100 cm, Cadeia de bacilos; b) VZ2 40-70 cm, Células em forma de cocos. Microscopia de contraste de fase (aumento 1250 vezes)

2.3.3 Identificação de arqueias metanogênicas por técnicas moleculares

2.3.3.1 Extração de DNA genômico das culturas isoladas de arqueias metanogênicas

A extração de DNA foi realizada em 43 culturas selecionadas nas etapas de purificação e isolamento, com base nos dados de produção de metano e microscopia ótica, descritas na tabela 15. A extração de DNA genômico das culturas de arqueias metanogênicas foi realizada com sucesso usando o protocolo descrito por Massana et al. (1997).

Tabela 15 - Descrição dos cultivos de arqueias metanogênicas utilizadas para extração de DNA e amplificação do gene *mcrA*

Código	Amostra	Profundidade (cm)	Morfologia da Colônia de Origem
01	VZ1	00-20	Circular, branca
02	VZ1	00-20	Circular, amarela, pequena
03	VZ1	70-100	Circular, amarela, pequena
04	VZ1	70-100	Circular, branca
05	VZ1	70-100	Circular, marrom, pequena
06	VZ1	70-100	Circular, amarela
07	VZ1	70-100	Circular, marrom, pequena
08	VZ1	70-100	Amorfa, transparente
09	VZ2	20-40	Circular, amarela
10	VZ2	20-40	Circular, amarela, pequena
11	VZ2	40-70	Circular, amarela, pequena
12	VZ2	40-70	Circular, branca, pequena
13	VZ2	40-70	Amorfa, transparente
14	VZ2	40-70	Circular, amarela
15	TM	20-40	Circular, branca
16	TM	20-40	Circular, branca, pequena
17	TM	20-40	Circular, branca
18	TM	20-40	Circular, branca
19	TM	20-40	Amorfa, transparente
20	Ad.TM	20-40	Circular, amarela, pequena
21	Ad.TM	20-40	Amorfa, transparente
22	Ad.TM	20-40	Amorfa, transparente
23	Ad.TM	20-40	Circular, amarela
24	Ad.TM	20-40	Circular, amarela
25	Ad.TM	20-40	Circular, amarela, pequena
26	Ad.TM	20-40	Amorfa, transparente
27	Ad.TM	20-40	Amorfa, transparente
28	TP2	20-40	Circular, marrom, pequena
29	VZ1	70-100	Circular, amarela, pequena
30	VZ2	40-70	Amorfa, transparente
31	VZ2	20-40	Circular, amarela
32	VZ2	20-40	Circular, amarela, pequena
33	VZ1	70-100	Amorfa, transparente
34	TP1	00-20	Circular, branca, pequena
35	TP1	00-20	Rugosa, branca
36	TP1	00-20	Rugosa, branca
37	TP2	20-40	Circular, marrom, pequena
38	TM	20-40	Amorfa, transparente
39	VZ2	40-70	Circular, branca, pequena
40	Ad.TM	20-40	Circular, amarela
41	VZ3	20-40	-
42	VZ3	00-20	-
43	VZ3	40-70	-

VZ1: Várzea 1; VZ2: Várzea 2; VZ3: Várzea 3; TP1: Terra Preta 1; TP2: Terra Preta 2; TM: Terra Mulata; Ad.TM: Adjacente Terra Mulata. Tamanho não indicado significa colônias de dimensão em mm; pequena: muito inferior a 0,5mm.

2.3.3.2 Screening da presença de arqueias metanogênicas pela amplificação do gene *mcrA*

Para confirmar a identidade dos isolados de arqueias metanogênicas foi feita a amplificação do DNA com os iniciadores MLf/ MLr (LUTON et al., 2002). O marcador molecular escolhido, o gene *mcrA*, codifica para a enzima metil-coenzima M redutase (MCR). Esta enzima participa da etapa final da síntese do metano. Além disso, é única aos microrganismos metanogênicos e é ubíqua dentro deste grupo (HALES et al. 1996; LUTON et al., 2002). As amplificações do fragmento de 470 pb do gene *mcrA* obtidas com estes oligonucleotídeos foram positivas para 95% dos isolados incluídos neste estudo, confirmando que estes isolados são de arqueias metanogênicas (Figura 16).

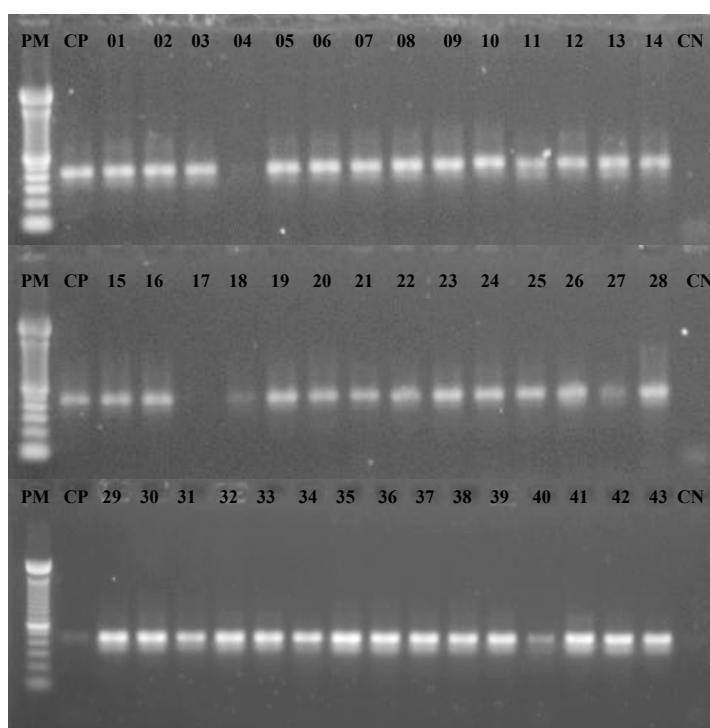


Figura 16 - Resultado da amplificação do gene *mcrA* de culturas metanogênicas. *A descrição das amostras encontra-se na Tabela 17

2.3.3.3 Análise de restrição do produto de amplificação do rDNA - ARDRA

Para a verificação da pureza das culturas de arqueias metanogênicas, realizou-se a construção de mini-bibliotecas de clones para análise pela técnica de ARDRA (do inglês *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*). Foram escolhidas 12 culturas, visando

contemplar isolados dos vários ambientes analisados neste estudo. A descrição das culturas encontra-se na Tabela 16.

Tabela 16 - Identificação dos cultivos selecionados com base em produção de metano e amplificação do gene *mcrA* para a construção de mini-bibliotecas de clones do gene 16S rRNA

Amostra	Clones	Profundidade (cm)	Estágio Purificação
VZ1	01 - 24	00-20	1° Subcultivo meio líquido
VZ1	25 - 48	70-100	1° Subcultivo meio líquido
VZ1	49 - 72	70-100	1° Subcultivo meio líquido
VZ2	73 - 96	20-40	1° Subcultivo meio líquido
VZ2	97 - 120	20-40	1° Subcultivo meio líquido
VZ2	121 - 144	40-70	1° Subcultivo meio líquido
VZ3	145 - 168	20-40	Diluição Seriada
VZ3	169 -192	40-70	Diluição Seriada
TP1	193 - 216	00-20	1° Subcultivo meio líquido
TP2	217 - 240	20-40	1° Subcultivo meio líquido
TM	241 - 264	20-40	1° Subcultivo meio líquido
Ad.TM	265 - 288	20-40	1° Subcultivo meio líquido

VZ1: Várzea 1; VZ2: Várzea 2; VZ3: Várzea 3; TP1: Terra Preta 1; TP2: Terra Preta 2; TM: Terra Mulata; Ad.TM: Adjacente Terra Mulata.

Para a construção das mini-bibliotecas realizou-se a amplificação do gene 16S rRNA, com os iniciadores ARCH21f/ ARCH958r (MOYER *et al.*, 1998). A escolha do gene 16S rDNA em detrimento ao gene *mcrA* considerou que análises filogenéticas do *mcr* podem ser imprecisas devido ao baixo número de seqüências presentes em bancos de dados (GALAND, 2004), enquanto que a molécula do gene 16S rRNA, além de constituir um excelente marcador molecular, possui um maior número de seqüências depositadas (LUTON *et al.*, 2002), permitindo uma vasta gama de comparações. Além disso, para estudos de restrição por endonucleases, Whitby *et al.* (2004) relataram encontrar maior diversidade com o uso do gene 16S rRNA comparada com o gene *mcr*. Finalmente, existe na literatura um número de trabalhos expressivamente superior com o gene 16S rRNA.

Para detectar a variabilidade genética entre os clones das culturas metanogênicas, foram escolhidos 24 clones recombinantes de cada cultivo. A técnica de ARDRA é um procedimento de alta resolução, baseada nos produtos de PCR, capaz de produzir caracterizações genótipo-específicas, que podem ser usadas para identificar amostras desconhecidas. O método não requer um conhecimento primário de dados da seqüência, ou uma elaborada base de dados dos perfis e, por esta razão, é perfeitamente aplicável como análise preliminar de material desconhecido (THÓRSSON; SVERRISSON; ANAMTHAWAT-JÓNSSON, 2000).

Após a reamplificação do DNA plasmidial com os iniciadores ARCH21f/ ARCH958r, os produtos de PCR foram submetidos análise de restrição individuais com duas endonucleases, uma de corte freqüente (*HaeIII*), e outra de corte raro (*HindIII*). Estas enzimas foram escolhidas por apresentarem potencial para diferenciar os maiores grupos de espécies de metanogênicos com base em seus sítios de restrição específicos (WRIGHT; PIMM, 2003; WHITBY et al., 2004).

Para a análise, foram considerados fragmentos entre 100 e 600 pb, onde o polimorfismo entre os clones de diferentes cultivos foi mais expressivo, e pela facilidade de análise visual das bandas no gel de agarose 2,5%. Desta forma, fragmentos de tamanho muito próximo foram considerados como um único fragmento.

Clones representativos de cada padrão de restrição foram seqüenciados e comparados com a base de dados do NCBI. No total, foram obtidas 33 seqüências de clones analisados no presente estudo. Para confirmar os resultados de restrição obtidos com a técnica de ARDRA, foi realizada uma análise de restrição *in silico*, pela ferramenta NEBcutter do site REBASE (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>). Para a simulação, foram utilizadas todas as seqüências dos clones que apresentaram diferentes padrões de restrição. Os fragmentos observados por meio da técnica ARDRA *in silico* e as características das seqüências de maior similaridade determinada pelo Blast do NCBI para seqüências de 16S rDNA dos clones analisados encontram-se descritas na Tabela 17. A classificação taxonômica das seqüências foi realizada pelo RDP Classifier utilizando o nível máximo de restrição (*Confidence threshold: 95%*).

No cultivo VZ1(1-24) foram observados 2 diferentes padrões de restrição com a enzima *HaeIII* (Figura 17). O clone VZ1-10 apresentou o fragmento superior de tamanho aproximado de 200 pb, enquanto nos demais clones este fragmento apresentava cerca de 230 pb. Este padrão de

clivagem foi confirmado pela análise *in silico* (Tabela 17). Com a enzima *HindIII* apenas um padrão de restrição foi observado. Pela análise *in silico* foi possível observar algumas pequenas diferenças de clivagem que não puderam ser visualizadas no gel de agarose 2,5%. Apesar de algumas pequenas diferenças no padrão de clivagem, todos os clones apresentaram similaridade como gênero *Methanobacterium* pela análise do Blast (Tabela 17).

Nos cultivos VZ1(25-48), VZ1(49-72) e VZ1(73-96) apenas um padrão de restrição foi observado para todos os clones, com ambas as enzimas (Figuras 18, 19 e 20). Assim como no cultivo VZ1(1-24), todos os clones seqüenciados foram similares ao gênero *Methanobacterium* pela análise do Blast (Tabela 17).

No cultivo VZ2(97-120) o clone VZ2-99 apresentou perfil de restrição diferente com a enzima *HaeIII* (Figura 21). O clone VZ2-99 apresentou o fragmento superior de tamanho aproximado de 200 pb, enquanto nos demais clones este fragmento apresentava cerca de 230 pb. O mesmo foi observado para os clones VZ2-131 e VZ2-142, do cultivo VZ2(121-144) (Figura 22). Estes resultados também foram comprovados pela análise *in silico* (Tabela 17). Com a enzima *HindIII* somente um perfil de clivagem foi obtido em ambos os cultivos. Embora com pequenas diferenças no padrão de clivagem, os clones se assemelharam ao gênero *Methanobacterium* (Tabela 17).

No cultivo VZ3(145-168) apenas o clone VZ3-152 apresentou padrão de clivagem diverso dos demais clones analisados, tanto com a enzima *HaeIII*, quanto com a enzima *HindIII* (Figura 23). O padrão de restrição apresentado por este clone é o padrão apresentado pelo gênero *Methanosarcina*, enquanto o padrão dos demais clones está relacionado ao gênero *Methanobacterium*, como foi comprovado pela análise no banco de dados do NCBI pela ferramenta Blast (Tabela 17). Somente o clone VZ3-152 foi clivado pela enzima *HindIII*.

Apenas o clone VZ3-186 do cultivo VZ3(169-192) apresentou perfil de ARDRA diferente dos demais clones (Figura 24). Enquanto os demais clones apresentaram perfis de restrição característicos de *Methanosarcina*, com três bandas bem definidas (\approx 350, 200 e 150 pb), o clone VZ3-186 apresentou fragmentos de 200, 180 e 150 pb aproximadamente. Ainda assim, pela análise pelo Blast do NCBI, o clone está relacionado ao gênero *Methanosarcina* (Tabela 17). Não houve digestão em nenhum dos clones com a enzima *HindIII*. A análise *in silico* confirmou os resultados.

Quatro diferentes perfis de ARDRA foram gerados no cultivo TP1(193-216) com a enzima *Hae*III e três com a enzima *Hind*III (Figura 25). O clone que mais diferiu dos demais padrões de restrição foi o TP1-199, que pela análise no banco de dados do NCBI não foi relacionado a nenhuma espécie metanogênica, sendo similar apenas a seqüências de arqueias não cultivadas (Tabela 17). Os demais clones apresentaram padrões de restrição característicos de *Methanobacterium*.

Para o cultivo TP2(217-240), apenas o clone TP2-224 apresentou perfil de restrição diferente do restante dos clones. O mesmo ocorrendo para os cultivos TM(241-264) e Ad.TM(265-288), onde somente os clones TM-255 e Ad.TM-284, respectivamente, produziram perfis de ARDRA diversos dos demais clones analisados (Figuras 26, 27 e 28).

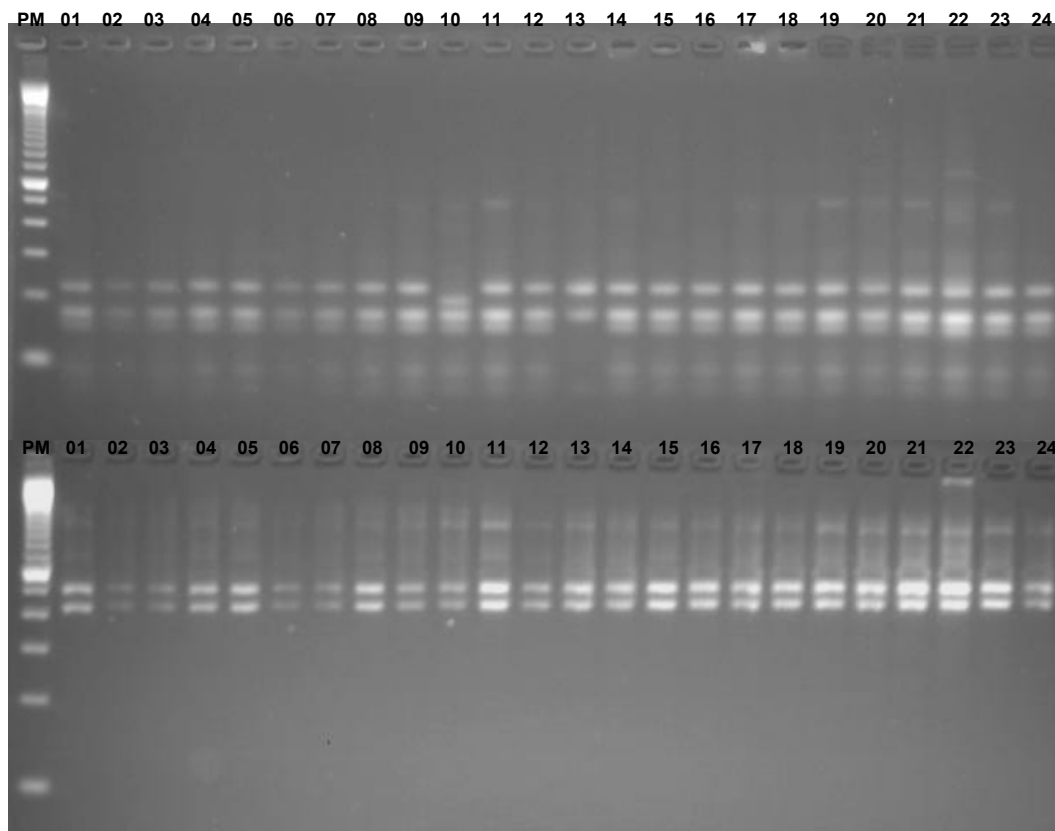


Figura 17 - Digestão enzimática da região 16S rDNA dos clones do cultivo VZ1 (1-24), com as endonucleases *Hae*III (foto superior) e *Hind*III (foto inferior)

PM – marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). Os números acima dos perfis correspondem à identificação dos clones.

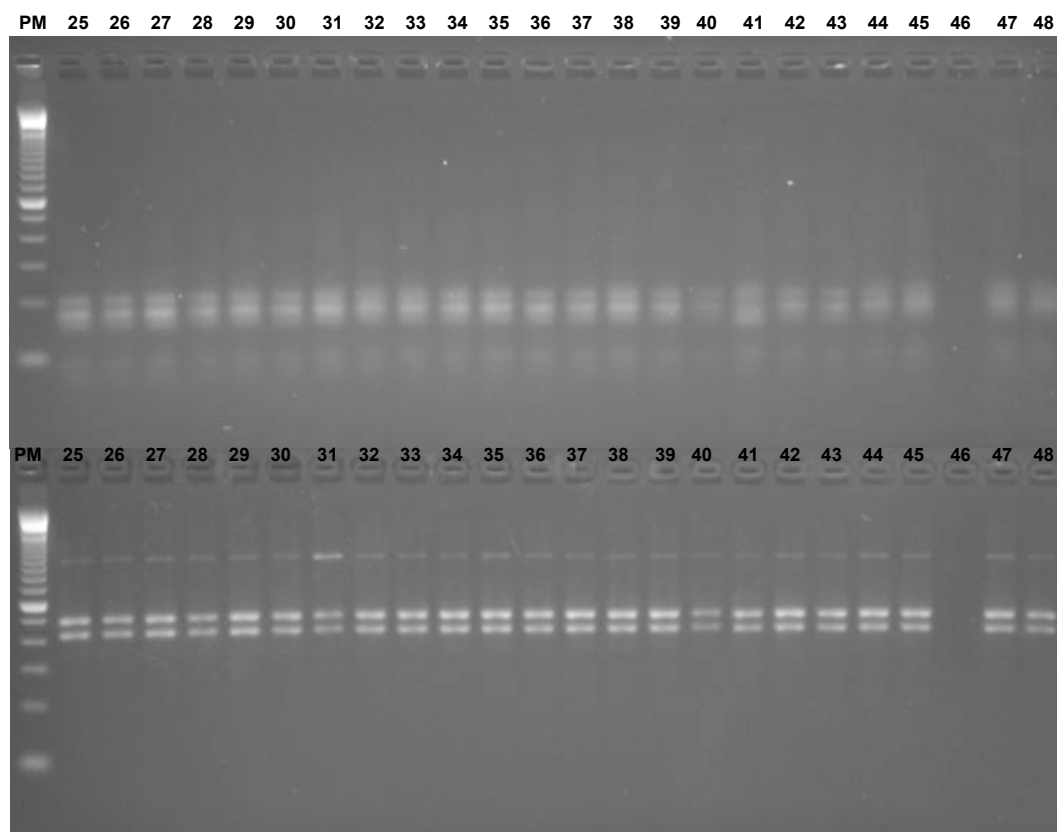


Figura 18 - Digestão enzimática da região 16S rDNA dos clones do cultivo VZ1 (25-48), com as endonucleases *Hae*III (foto superior) e *Hind*III (foto inferior)

PM – marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). Os números acima dos perfis correspondem à identificação dos clones.

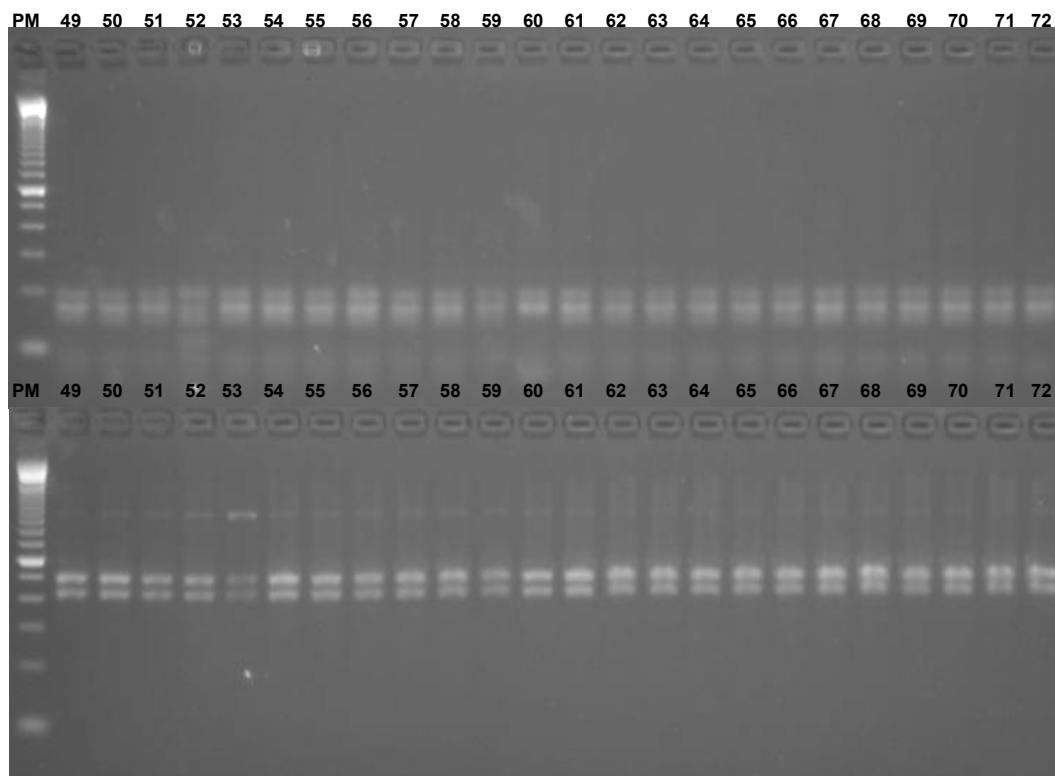


Figura 19 - Digestão enzimática da região 16S rDNA dos clones do cultivo VZ1 (49-72), com as endonucleases *Hae*III (foto superior) e *Hind*III (foto inferior)

PM – marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). Os números acima dos perfis correspondem à identificação dos clones.

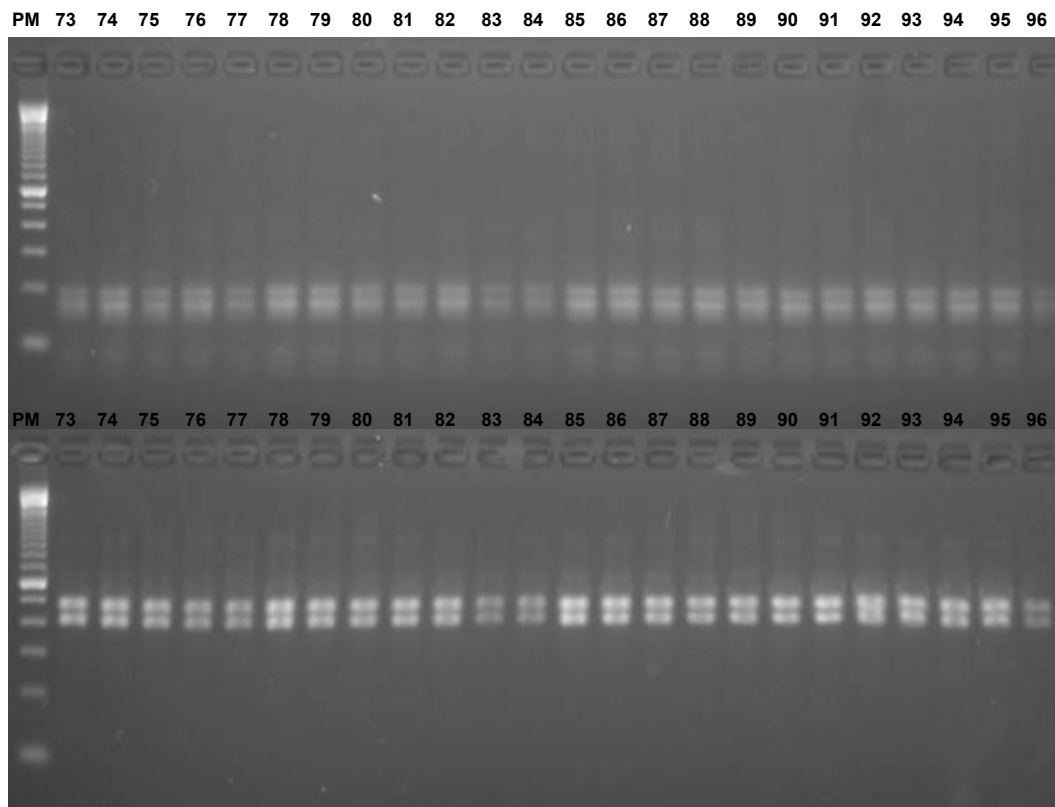


Figura 20 - Digestão enzimática da região 16S rDNA dos clones do cultivo VZ2 (73-96), com as endonucleases *Hae*III (foto superior) e *Hind*III (foto inferior)

PM – marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). Os números acima dos perfis correspondem à identificação dos clones.

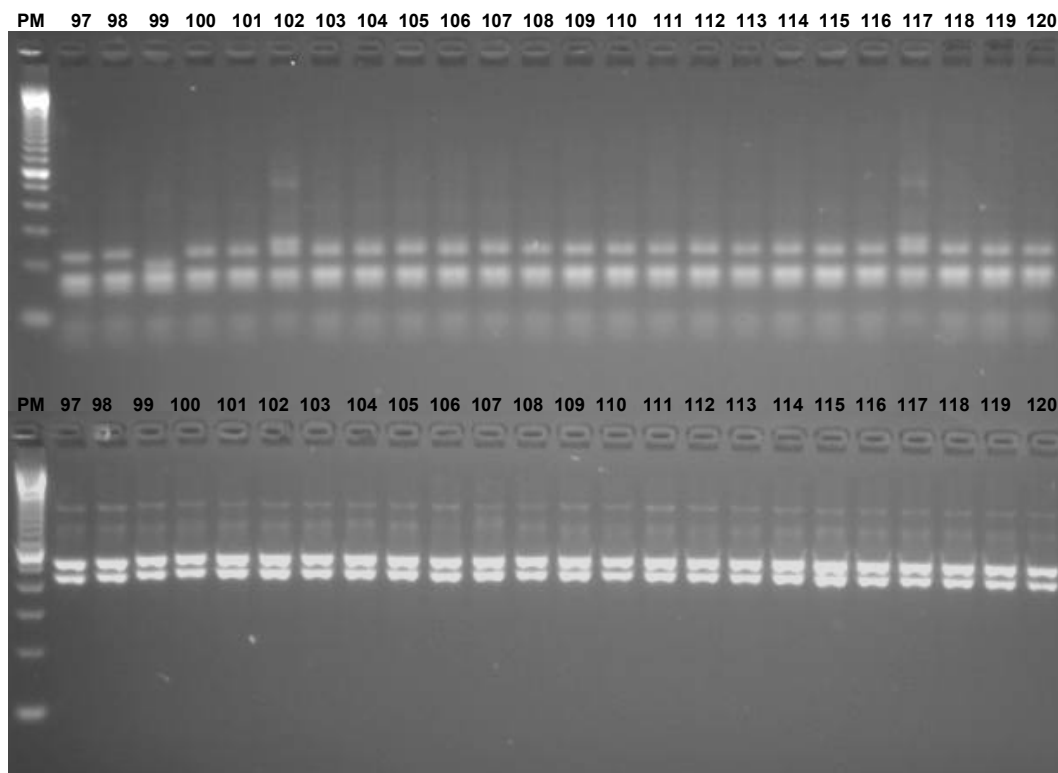


Figura 21 - Digestão enzimática da região 16S rDNA dos clones do cultivo VZ2 (97-120), com as endonucleases *Hae*III (foto superior) e *Hind*III (foto inferior)

PM – marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). Os números acima dos perfis correspondem à identificação dos clones.

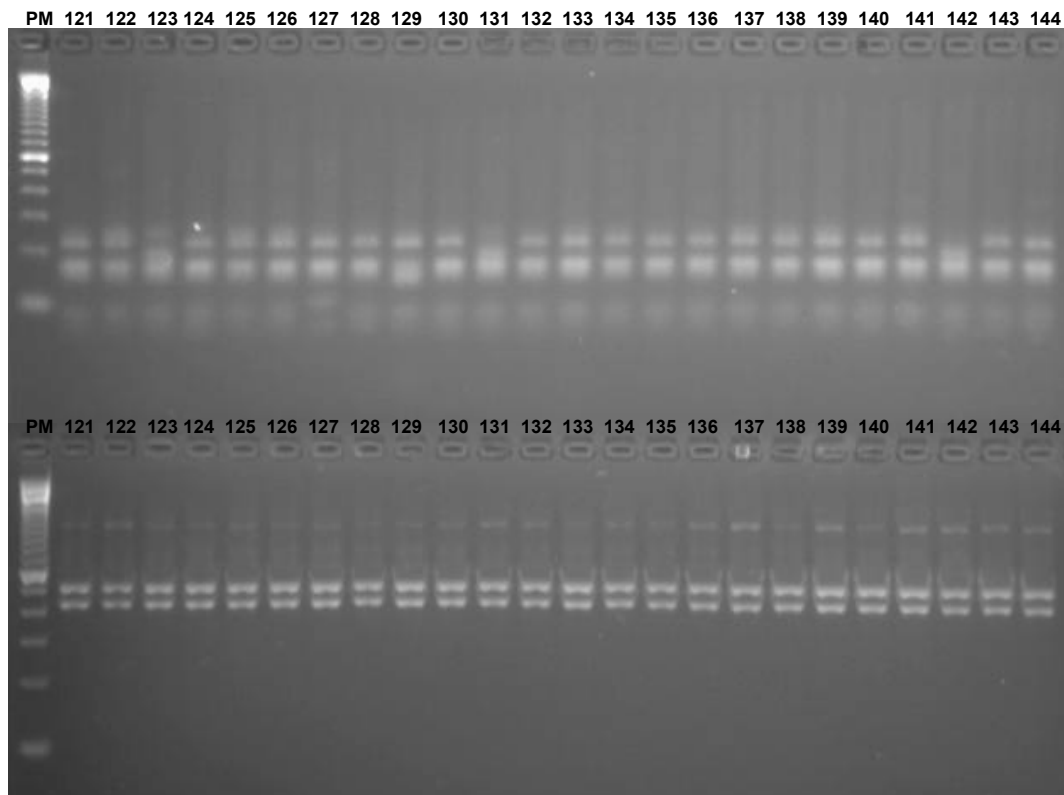


Figura 22 - Digestão enzimática da região 16S rDNA dos clones do cultivo VZ2 (121-144), com as endonucleases *Hae*III (foto superior) e *Hind*III (foto inferior)

PM – marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). Os números acima dos perfis correspondem à identificação dos clones.

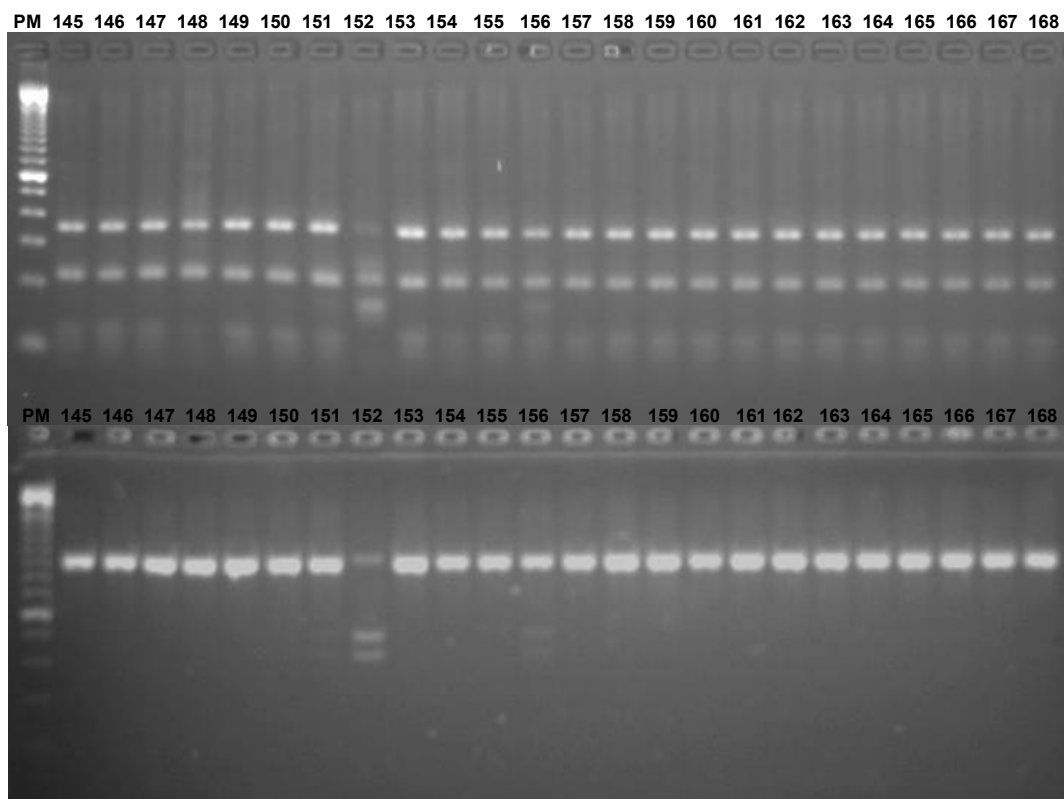


Figura 23 - Digestão enzimática da região 16S rDNA dos clones do cultivo VZ3 (145-168), com as endonucleases *HaeIII* (foto superior) e *HindIII* (foto inferior)

PM – marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). Os números acima dos perfis correspondem à identificação dos clones.

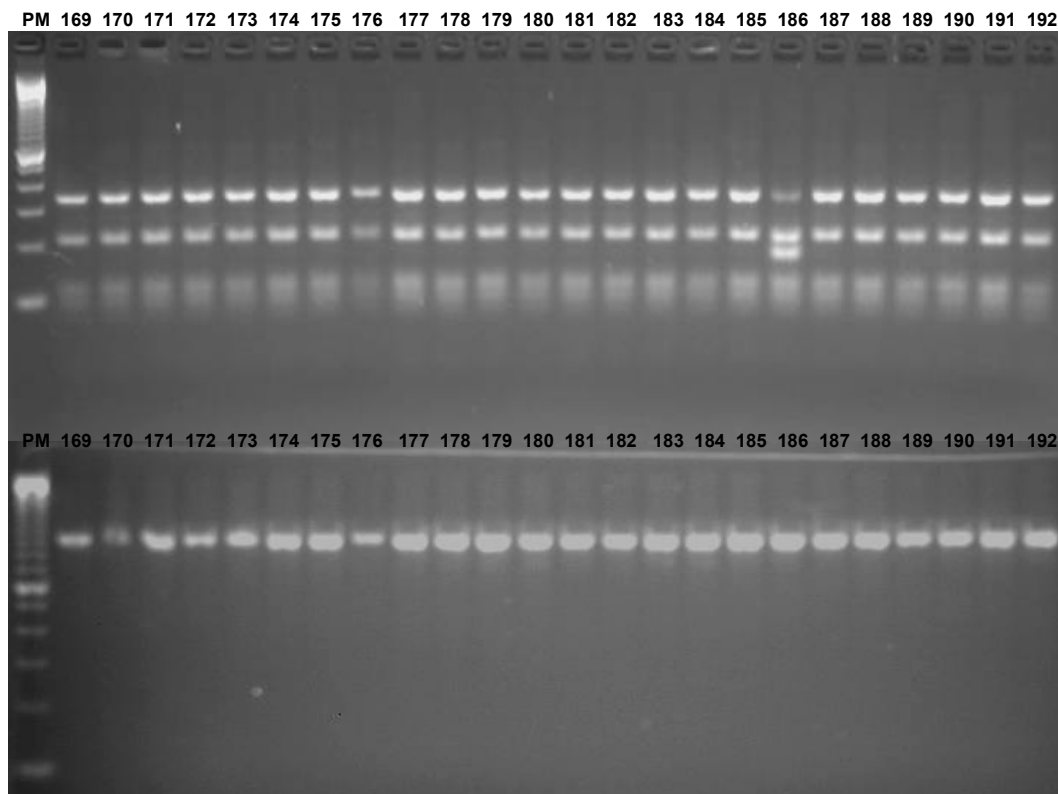


Figura 24 - Digestão enzimática da região 16S rDNA dos clones do cultivo VZ3 (169-192), com as endonucleases *Hae*III (foto superior) e *Hind*III (foto inferior)

PM – marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). Os números acima dos perfis correspondem à identificação dos clones.

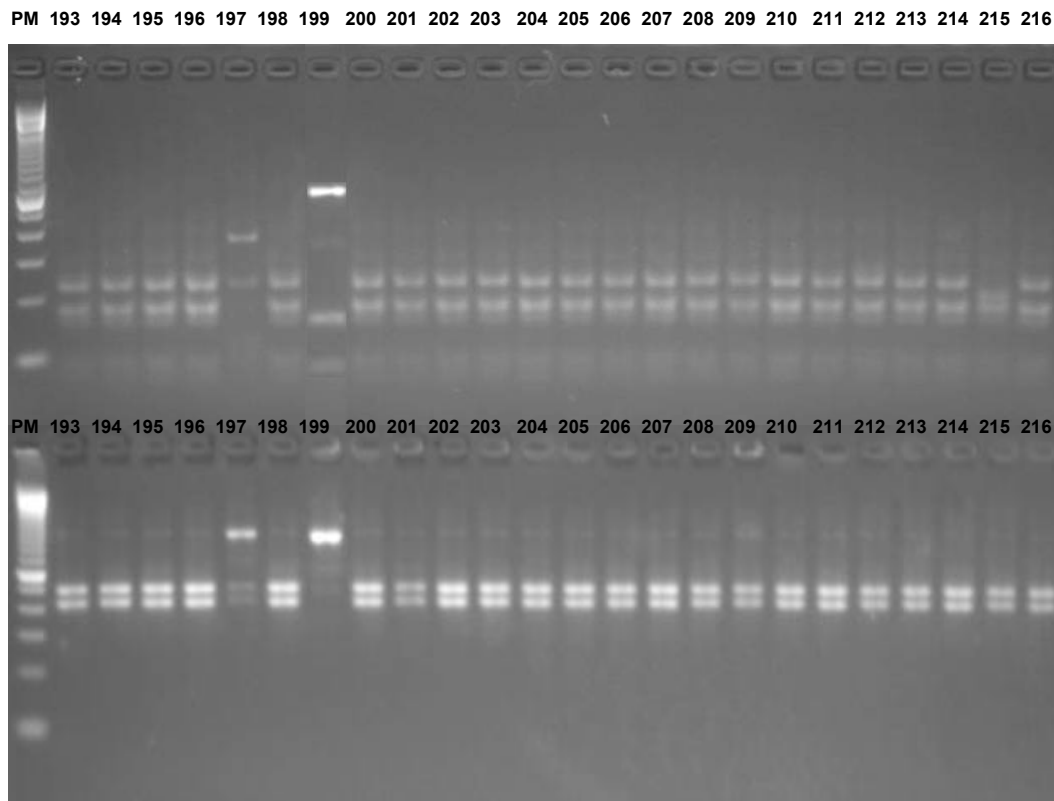


Figura 25 - Digestão enzimática da região 16S rDNA dos clones do cultivo TP1 (193-216), com as endonucleases *HaeIII* (foto superior) e *HindIII* (foto inferior)

PM – marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). Os números acima dos perfis correspondem à identificação dos clones.

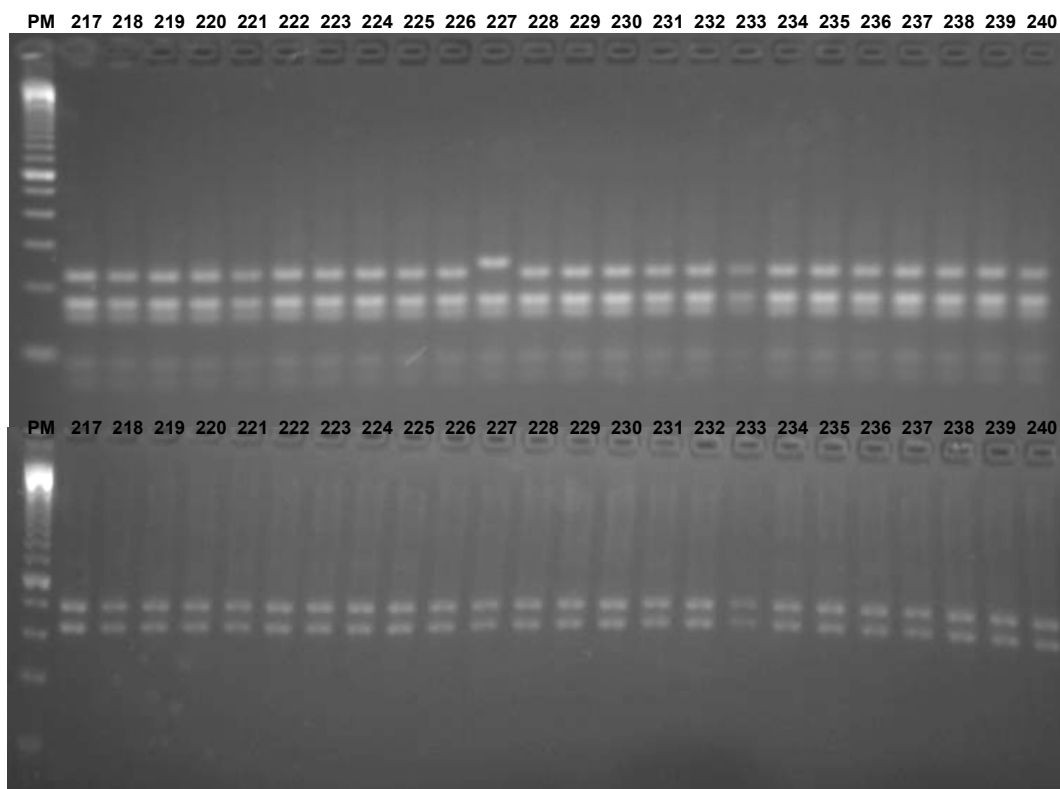


Figura 26 - Digestão enzimática da região 16S rDNA dos clones do cultivo TP2 (217-240) com as endonucleases *HaeIII* (foto superior) e *HindIII* (foto inferior)

PM – marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). Os números acima dos perfis correspondem à identificação dos clones.

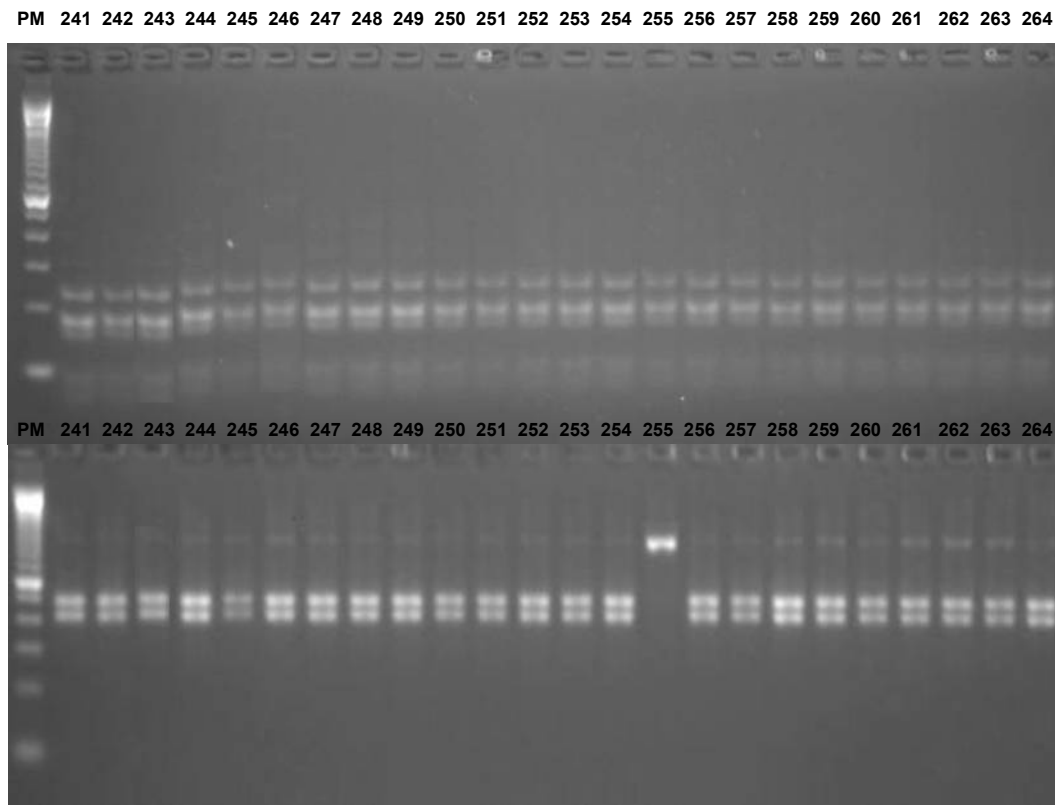


Figura 27 - Digestão enzimática da região 16S rDNA dos clones do cultivo TM (241-264), com as endonucleases *Hae*III (foto superior) e *Hind*III (foto inferior)

PM – marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). Os números acima dos perfis correspondem à identificação dos clones.

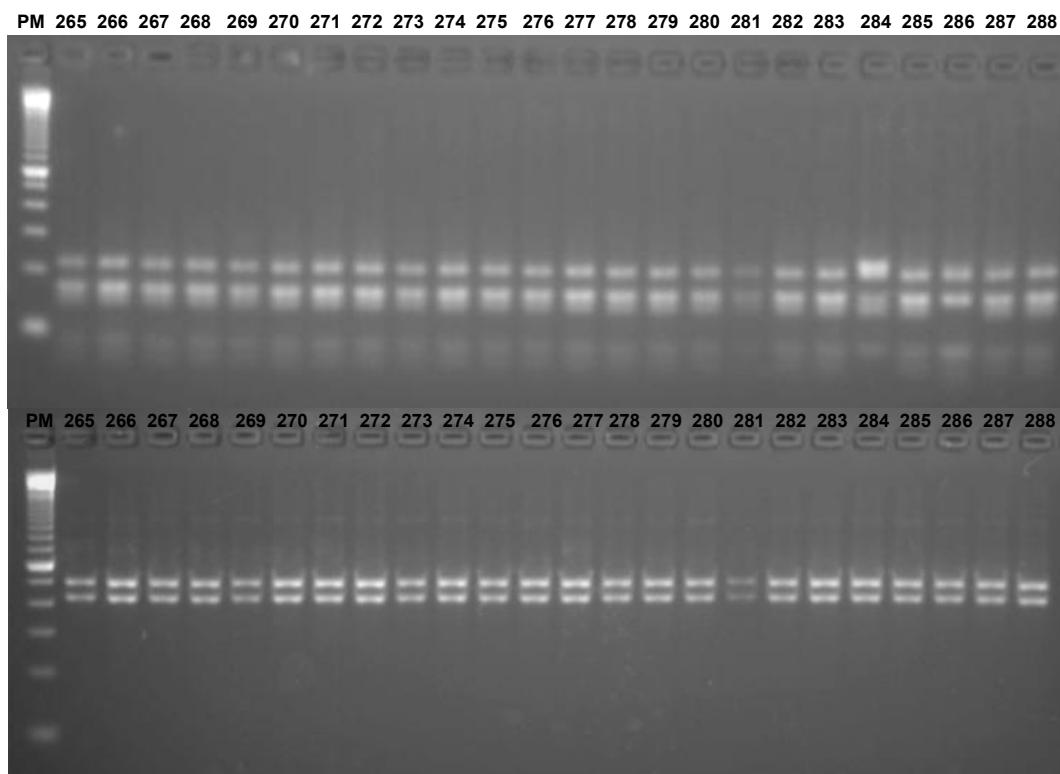


Figura 28 - Digestão enzimática da região 16S rDNA dos clones do cultivo Ad.TM (265-288), com as endonucleases *Hae*III (foto superior) e *Hind*III (foto inferior)

PM – marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). Os números acima dos perfis correspondem à identificação dos clones.

Tabela 17 - Fragmentos do gene 16S rRNA observados por meio da técnica ARDRA *in silico* pela ferramenta NEBcutter do site REBASE e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo Blast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de arqueias metanogênicas isoladas em solos da Amazônia Oriental (Santarém e Belterra - PA)

(continua)

Clone	Tamanho da seqüência (pb)	ARDRA <i>in silico</i>		Identidade (%)	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
		Tamanho dos fragmentos (pb)						
		<i>HaeIII</i>	<i>HindIII</i>					
VZ1-10	990 pb	199, 193, 173, 152, 90, 73, 67, 27, 14, 2.	586, 404.	97%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins
VZ1-11	919 pb	226, 189, 173, 152, 90, 73, 14, 2.	515, 404.	99%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins
VZ1-13	882 pb	226, 222, 172, 153, 73, 20, 14, 2.	479, 403.	97%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins
VZ1-15	883 pb	226, 173, 153, 152, 90, 73, 14, 2.	479, 404.	99%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins
VZ1-20	920 pb	226, 189, 173, 153, 90, 73, 14, 2.	516, 404.	99%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins
VZ1-22	921 pb	226, 189, 175, 152, 90, 73, 14, 2.	516, 405.	99%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins
VZ1-29	882 pb	199, 172, 153, 152, 90, 73, 27, 14, 2.	479, 403.	97%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins
VZ1-54	920 pb	199, 190, 173, 152, 90, 73, 27, 14, 2.	516, 404.	97%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins
VZ1-65	883 pb	199, 173, 153, 152, 90, 73, 27, 14, 2.	479, 404.	97%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins
VZ2-77	883 pb	199, 173, 153, 152, 90, 73, 27, 14, 2.	479, 404.	97%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins
VZ2-81	982 pb	199, 193, 173, 152, 90, 73, 59, 27, 14, 2.	578, 404.	97%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins
VZ2-90	883 pb	199, 173, 153, 152, 90, 73, 27, 14, 2.	479, 404.	98%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins

Tabela 17 - Fragmentos do gene 16S rRNA observados por meio da técnica ARDRA *in silico* pela ferramenta NEBcutter do site REBASE e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo Blast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de arqueias metanogênicas isoladas em solos da Amazônia Oriental (Santarém e Belterra - PA)

(Continuação)

Clone	Tamanho da seqüência (pb)	ARDRA <i>in silico</i>		Identidade (%)	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
		Tamanho dos fragmentos (pb)						
		<i>Hae</i> III	<i>Hind</i> III					
VZ2-99	884 pb	200, 173, 153, 152, 90, 73, 27, 14, 2.	479, 405.	96%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins
VZ2-102	883 pb	226, 173, 153, 152, 90, 73, 14, 2.	479, 404.	99%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins
VZ2-104	919 pb	226, 189, 173, 152, 90, 73, 14, 2.	515, 405.	99%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins
VZ2-128	885 pb	228, 173, 153, 152, 90, 73, 14, 2.	479, 406.	100%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins
VZ2-131	883 pb	199, 173, 153, 152, 90, 73, 27, 14, 2.	479, 403.	97%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins
VZ3-145	975 pb	358, 197, 120, 103, 100, 56, 41.	-	98%	0	AY260432.1	SIMANKOVA et al., 2003.	<i>Methanosarcina mazei</i> - Solos alagados de Tundra
VZ3-152	883 pb	226, 173, 153, 152, 90, 73, 14, 2.	479, 404.	99%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins
VZ3-169	883 pb	358, 201, 120, 100, 63, 41.	-	98%	0	AY260431.1	SIMANKOVA et al., 2003.	<i>Methanosarcina lacustris</i> - Sedimento de lago
VZ3-186	918 pb	200, 184, 174, 120, 100, 99, 41.	-	98%	0	AY260431.1	SIMANKOVA et al., 2003.	<i>Methanosarcina lacustris</i> - Sedimento de lago

Tabela 17 - Fragmentos do gene 16S rRNA observados por meio da técnica ARDRA *in silico* pela ferramenta NEBcutter do site REBASE e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo Blast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de arqueias metanogênicas isoladas em solos da Amazônia Oriental (Santarém e Belterra - PA)

(Conclusão)

Clone	Tamanho da seqüência (pb)	ARDRA <i>in silico</i>		Identidade (%)	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
		Tamanho dos fragmentos (pb)						
		<i>HaeIII</i>	<i>HindIII</i>					
TP1-197	854 pb	217, 173, 152, 135, 90, 73, 14.	461, 393.	99%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins
TP1-199	876 pb	581, 159, 87, 47, 2.	-	98%	0	AB288248.1	SHIMIZU et al., 2007. np.	<i>Archaea</i> - Sedimento de aquífero
TP1-205	883 pb	226, 173, 153, 152, 90, 73, 14, 2.	479, 404.	99%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins
TP1-215	897 pb	199, 172, 168, 152, 104, 73, 27, 2.	493, 404.	96%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins
TP2-224	883 pb	226, 173, 153, 152, 90, 73, 14, 2.	479, 404.	99%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins
TP2-227	883 pb	228, 173, 153, 152, 90, 73, 14.	479, 404.	96%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins
TM-242	919 pb	226, 189, 173, 152, 90, 73, 14, 2.	515, 404.	99%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins
TM-243	907 pb	193, 173, 152, 118, 90, 90, 73, 53, 21, 14, 12, 8.	572, 335.	99%	0	AB181819.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Tc3 - Trato digestivo de cupins
TM-255	918 pb	226, 172, 153, 152, 90, 73, 37, 15.	-	98%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins
Ad.TM-266	884 pb	226, 173, 153, 152, 90, 74, 14, 2.	479, 405.	99%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins
Ad.TM-281	866 pb	174, 153, 142, 92, 91, 24, 22, 14, 1.	481, 220, 165.	94%	0	AY196658.1	WRIGHT; PIMM, 2003.	<i>Methanobacterium bryanti</i> -
Ad.TM-284	881 pb	244, 226, 153, 152, 90, 14, 2.	478, 403.	98%	0	AB181818.1	DEEVONG et al., 2004.	<i>Methanobacterium</i> sp. Mg38 - Trato digestivo de cupins

VZ1: Várzea 1; VZ2: Várzea 2; VZ3: Várzea 3; TP1: Terra Preta 1; TP2: Terra Preta 2; TM: Terra Mulata; Ad.TM: Adjacente terra Mulata.

De forma geral, os produtos de restrição obtidos com o uso da endonuclease *HaeIII* apresentaram maior polimorfismo entre os clones do que aqueles obtidos com a *HindIII*, resultados estes que confirmam as observações de Wright e Pimm (2003), quando estudaram os padrões de restrição de 55 endonucleases em 82 espécies metanogênicas, e observaram melhores resultados com a endonuclease *HaeIII*. Os autores detectaram sítios de reconhecimento da enzima *HaeIII* para 26 espécies de metanogênicas e observaram a geração de 4-9 fragmentos por espécie, sendo a maioria dos fragmentos acima de 100 pb, separados por 20 a 150 pb.

Da mesma forma, McHugh et al. (2003) analisando o padrão de restrição de 200 clones de metanogênicas de um biorreator anaeróbio com apenas com a enzima *HaeIII*, conseguiram identificar 18 diferentes UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais), e consideraram suficiente para detectar diferenças entre as espécies metanogênicas.

Neste estudo, com a enzima *HindIII* foi possível obter duas bandas de clivagem nos clones associados ao gênero *Methanobacterium*, entretanto, esta enzima não clivou os clones associados ao gênero *Methanosarcina*, pela ausência de sítios de restrição para este gênero. Desta forma, a distinção entre os gêneros se deu devido à ausência de clivagem, e não devido a padrões de restrição distintas. Whitby et al. (2004) analisaram o padrão de restrição de 230 endonucleases, e selecionaram 12 delas para a clivagem de 71 seqüências de 16S rDNA de arqueias metanogênicas. Dentre estas enzimas, os autores obtiveram os melhores resultados com *HindIII*, *XhoI* e *HinfI*, com base no número de sítios de clivagem de cada espécie metanogênica e no número de metanogênicas que pôde ser diferenciado. Contudo, os autores também verificaram a ausência de sítios de clivagem para a enzima *HindIII* nas espécies *Methanosarcina acetovorans*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei*, *Methanosarcina semesiase*, *Methanosarcina siciliae*, *Methanosarcina thermophila*, e *Methanosarcina vacuolata*.

Portanto, entre as duas enzimas utilizadas, a *HaeIII* foi a mais eficiente para mostrar diferentes ribotipos, e seria suficiente neste trabalho para detectar polimorfismo entre os clones. Embora a enzima *HindIII* tenha sido recomendada para o estudo de polimorfismo em metanogênicas (WHITBY et al., 2004; LOMANS et al., 2001), é uma enzima de corte raro, e por isso a detecção de polimorfismo em fragmentos pequenos de DNA, como o gene 16S rDNA, avaliado neste estudo, é menos mais facilmente detectado com enzimas de corte freqüente, como a *HaeIII*.

A análises virtuais das seqüências pelo NEBcutter mostraram congruência com os resultados obtidos pela técnica de ARDRA. Os tamanhos dos fragmentos obtidos pelo ARDRA estão bem próximos dos encontrados na análise *in silico* (Tabela 17). Contudo, observou-se um número maior de fragmentos na análise *in silico*. Isto pode ser explicado pelo fato de alguns destes fragmentos apresentarem tamanhos pequenos e não poderem ser visualizados no gel, pelo fato de possuírem tamanhos bem próximos e serem visualizados com uma banda única, ou pelo fato da digestão ser incompleta e com isso a enzima não cortar em todas as posições.

Neste trabalho, a técnica de ARDRA mostrou-se eficiente para a detecção de pequenas diferenças nas seqüências de espécies metanogênicas estreitamente relacionadas, como também foi verificado por McHugh et al. (2003).

A estratégia utilizada neste estudo de análise de restrição de seqüências de 16S rDNA de clones obtidos de isolamento anaeróbio foi a mesma utilizada por Sizova et al. (2003). A partir de meios de enriquecimento de amostras de turfeira os autores construíram mini-bibliotecas de clones de 16S rDNA (20 clones para cada mini-biblioteca), que foram digeridos com as enzimas de restrição *MspI* e *HhaI*. Os perfis de ARDRA resultantes demonstraram 3 grupos distintos de arqueias metanogênicas relacionados ao gênero *Methanobacterium*, a ordem *Methanomicrobiales* e à arqueias não cultivadas de ambientes ricos em metano. Os autores encontraram grande quantidade de não metanogênicas crescendo em conjunto nos consórcios microbianos, uma indicação de que não haviam atingido a purificação completa do material estudado.

No presente estudo, de um total de 288 clones analisados, não foi possível amplificar apenas um clone e conseqüentemente, este clone não apresentou um perfil de restrição. Os resultados obtidos com os 288 clones provenientes dos 12 cultivos demonstraram certa diversidade de seqüências de 16S rDNA nas amostras analisadas, visto que foram observados 8 padrões de digestão distintos com a enzima *HaeIII* e 2 diferentes padrões com a enzima *HindIII* (considerando a ausência de clivagem como padrão de digestão), formando dois grandes grupos, os quais apresentaram similaridade nos padrões de restrição.

O maior grupo foi formado por *Methanobacterium*, predominando em 10 dos 12 cultivos analisados. Destes, aparentemente 9 estão puros, e são compostos somente pelo gênero

Methanobacterium, sendo que apenas no cultivo TP1(193-216) foi verificada a ocorrência de um clone de *Archaea* não cultivada.

O grupo menor, composto pelos cultivos VZ3(145-168) e VZ3(169-192), possui predominantemente representantes do gênero *Methanosarcina*, exceção feita ao clone VZ3-152, do cultivo VZ3(145-168), que teve similaridade ao gênero *Methanobacterium*. Já o cultivo VZ3(169-192) aparentemente está puro, e é formado apenas por *Methanosarcina*. A predominância de *Methanosarcina* nas amostras VZ3 pode ser observada pela biblioteca metagenômica realizada na várzea 3, que será abordado no item 2.3.5.

A afiliação filogenética das seqüências de 16S rDNA dos clones analisados foi realizada pelo RDP Classifier e confirmada pelo Blast. Os resultados obtidos pelo RDP Classifier e pelo BLAST mostraram que todos os clones pertencem ao filo *Euryarchaeota*, e que apenas um clone não era relacionado às arqueias metanogênicas. A classificação taxômica das seqüências de 16S rDNA dos clones analisados pelo RDP Classifier mostrou que 87% pertencem ao gênero *Methanobacterium*, 10% ao gênero *Methanosarcina*, e 1% não pode ser classificado com o nível máximo de restrição de 95% (*Confidence threshold*). Com a finalidade de identificar este clone, foi feita nova classificação taxônômica pelo RDP Classifier, utilizando o nível de restrição de 80% , e o clone foi classificado como um *Thermoplasmata*, pertencente ao gênero *Picrophilus*, um anaeróbio obrigatório.

Os resultados das análises do BLAST mostram que a maioria dos clones seqüenciados possui similaridade com *Methanobacterium* sp. Mg38, isolada de trato digestivo de cupim (Tabela 17) (DEEVONG et al., 2004). Os cupins abrigam arqueias metanogênicas em seu trato digestivo e são dos poucos artrópodes terrestres que emitem metano. A emissão de metano pelos cupins é uma fonte significativa do metano atmosférico global, desde que os cupins são abundantes em ecossistemas terrestres, particularmente em regiões tropicais. Os cupins existem em grande densidade da biomassa em regiões tropicais. Apesar de sua considerável variação no comportamento alimentar, todos os cupins conhecidos possuem uma densa e diversa comunidade microbiana em seu sistema digestivo (DEEVONG et al., 2004). Como neste trabalho o isolamento foi feito de solos tropicais, é possível que exista relação entre as metanogênicas isoladas e cupins presentes no solo. Além disso, a estratégia utilizada pelos autores para o isolamento de metanogênicas foi a mesma utilizada neste trabalho, ou seja, enriquecimento,

diluições seriadas, e sucessivos *roll-tubes*, utilizando como fontes de carbono acetato, H₂:CO₂ e formiato (ver item 2.2.6 de Material e Métodos).

Por sua vez, as representantes do gênero *Methanosarcina* encontradas neste trabalho tiveram similaridade com metanogênicas isoladas de ambientes terrestres frios (Tabela 17) (SIMANKOVA et al., 2003). A *Methanosarcina mazei* foi isolada de solos alagados de tundras, na profundidade 30-40 cm, com temperatura de 5-6°C. A *Methanosarcina lacustris* foi isolada de sedimento anóxico de lago, na profundidade de 5-10 cm, com temperatura de 4-6°C. O grupo metanogênico do gênero *Methanosarcina* obtido neste trabalho foi isolado de solo de várzea nas profundidades 20-40 cm e 40-70 cm (respectivamente VZ3(145-168) e VZ3(169-192)). Muito embora as seqüências com similaridade no Blast sejam isoladas de ambientes frios, ao contrário das isoladas neste estudo, ambas possuem em comum serem de ambientes terrestres periodicamente ou permanentemente inundados.

O gênero *Methanosarcina* compreende nove espécies: *Methanosarcina acetovorans*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei*, *Methanosarcina semesiase*, *Methanosarcina siciliae*, *Methanosarcina thermophila*, *Methanosarcina vacuolata*, *Methanosarcina baltica* e *Methanosarcina lacustris*. Todas as espécies são sésseis e capazes de catabolizar acetato, metanol, metilaminas e CO. Algumas espécies são capazes de obter energia pela redução do CO₂ com H₂ (GARRITY; HOLT, 2001).

A maior parte dos estudos de metanogênicas em solos refere-se a várzeas de arroz, e poucos dados são disponíveis sobre outros tipos de solo. Os solos estudados são geralmente alagados e sedimentos aquáticos. Vários gêneros de metanogênicas já foram descritos de isolamento em solos de várzeas de arroz: *Methanobacterium*, *Methanosarcina*, *Methanobrevibacter*, *Methanoculleus*, *Methanogenium*, *Methanosaeta* e *Methanospirillum* (LEMER; ROGER, 2001). Entretanto, as populações de arqueia são compostas essencialmente por microrganismos utilizadores de hidrogênio pertencentes ao gênero *Methanobacterium*, e utilizadores de acetato, dos gêneros *Methanosaeta* e *Methanosarcina* (ADACHI, 1999; CONRAD, 1999).

Os gêneros encontrados neste trabalho, *Methanobacterium* e *Methanosarcina*, foram considerados dominantes em arrozais estudados por Joulain et al. (1998). Os autores avaliaram 13 várzeas de arroz pelo método de NMP (número mais provável). Em 8 deles, as

metanogênicas hidrogenotróficas foram dominantes. Porém, quando a fonte de carbono utilizada era acetato ou metanol, prevalecia a população de *Methanosarcina*. Com base nos resultados, os autores concluíram que em várzeas de arroz as metanogênicas do gênero *Methanobacterium* eram as maiores responsáveis pela produção de metano de $H_2:CO_2$, e as metanogênicas do gênero *Methanosarcina* pela produção de metano a partir do acetato, e ambos os gêneros eram ubíquos neste ambiente.

2.3.3.4 Análise filogenética das seqüências

Para construção da árvore filogenética as seqüências de 16S rDNA (Tabela 17) foram unidades taxonômicas operacionais (UTO) pelo programa DOTUR (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005), conforme descrito no item 2.2.10.8 de Material e Métodos. Pelo cálculo para a distância filogenética de 0,03, os 33 clones seqüenciados foram agrupados em 7 UTOs. A Figura 29 mostra as distâncias genéticas entre seqüências representativas de cada UTO obtidos neste estudo e outras seqüências de arquéias metanogênicas disponíveis no GenBank. A árvore filogenética foi construída pelo método de distância “Neighbor Joining”, com o programa Mega 3.1 (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004) utilizando o 16S rRNA dos isolados seqüenciados. A árvore filogenética foi enraizada utilizando uma seqüência de *Korarchaeota* SRI-306 (AF255604) retirada do GenBank como grupo externo.

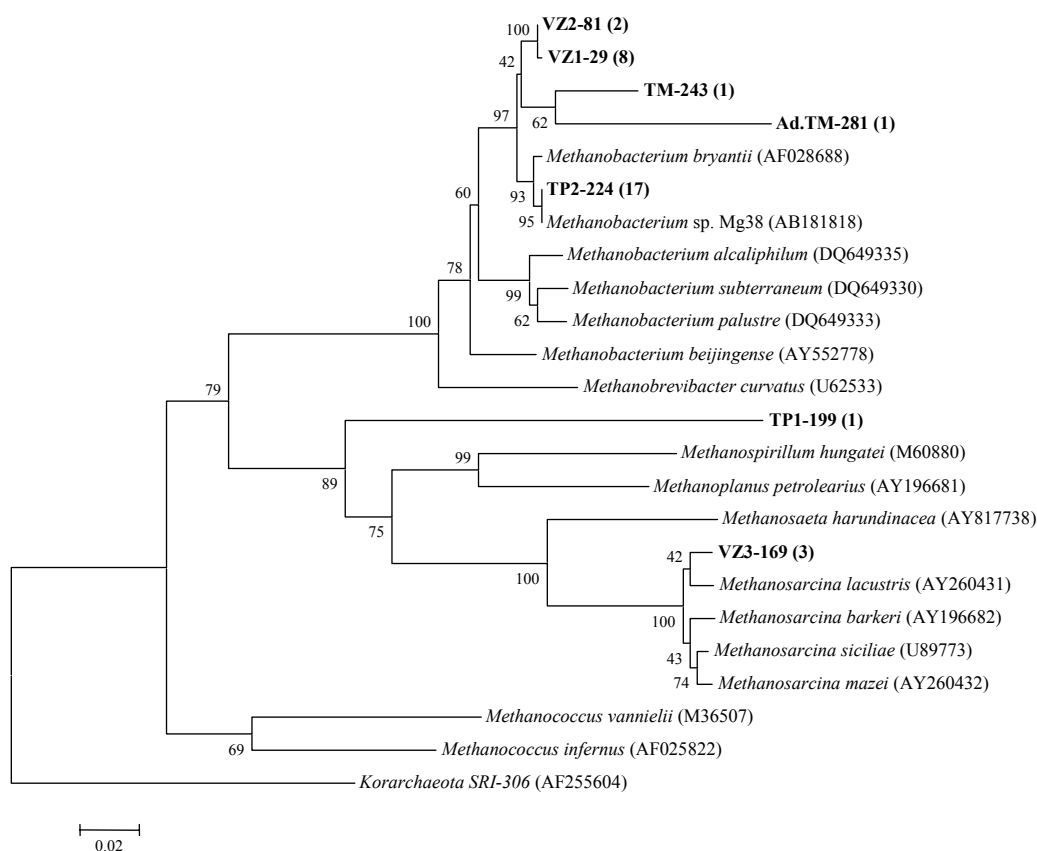


Figura 29 - Árvore filogenética baseada na seqüência do gene 16S rRNA dos clones de *Archaea*, construída pelo método de “Neighbor Joining”(modelo Kimura 2). A árvore foi enraizada utilizando o gene 16S rRNA de *Korarchaeota SRI-306* como grupo externo. Os números acima das linhas são valores de reamostragem obtidos com 1000 replicações (seed=64238). Os clones obtidos neste estudo encontram-se destacados em negrito. O número entre parêntese representa o número de seqüências representadas pelo clone

Pelo agrupamento montado pelo programa DOTUR, juntamente com a seqüência VZ2-81 agrupou-se a seqüência VZ1-10. Por sua vez, a seqüência VZ1-29 foi considerada a mesma unidade taxonômica operacional que as seqüências VZ1-54, VZ1-65, VZ2-77, VZ2-90, VZ2-99, VZ2-131 e TP1-215. As seqüências TM-243 e Ad.TM-281 foram consideradas, cada uma como uma UTO. A UTO representada pela seqüência TP2-224 foi formada pelo maior número de seqüências, são elas: VZ1-11, VZ1-13, VZ1-15, VZ1-20, VZ1-22, VZ2-102, VZ2-104, VZ2-128, VZ3-152, TP1-197, TP1-205, TP2-227, TM-242, TM-255, Ad.TM-266, e Ad.TM-284. A seqüência TP1-199 formou sozinha uma UTO. Por sua vez, juntamente com a seqüência VZ3-169 foram agrupadas também as seqüências VZ3-186 e VZ3-145.

Numa análise de reamostragem para 1000 replicações observou-se a formação de 2 agrupamentos principais, o maior deles formado por seqüências de *Methanobacterium* sp., um segundo grupo formado por *Methanosarcina* sp., além do clone TP1-199, que não agrupou com nenhuma das seqüências escolhidas para a construção da árvore filogenética.

A maior UTO formada, com 17 seqüências agrupou-se com a seqüência de *Methanobacterium* sp.Mg 38, conforme pode ser observado tbm pelo resultado de identidade obtido pelo BLAST (Tabela 17). Entretanto, parte das seqüências que também apresentaram similaridade com a seqüência de *Methanobacterium* sp.Mg 38 pelo BLAST agruparam-se separadamente, mostrando que são mais similares entre si, podendo indicar que estas possam pertencer a uma outra espécie de *Methanobacterium*, já que também a faixa de amplitude da identidade das seqüências pelo BLAST foi bastante variável (94-100%).

2.3.4 Caracterização morfológica das culturas metanogênicas

Dos 12 cultivos escolhidos para os estudos em biologia molecular, a imagem microscópica colhida na maioria das amostras assemelha-se ao apresentado na Figura 30. As fotografias dos isolados a partir das amostras VZ1(1-24), VZ1(49-72), VZ2(73-96) e VZ2(73-96), no caso da Figura 30a, b, c e d, nitidamente destacam, sob microscopia de contraste de fase, células no formato de bacilos livres, formando pares ou pequenas cadeias característicos do gênero *Methanobacterium* sp., cuja presença foi constatada pelas análises moleculares. Muito embora não confirmada a pureza das culturas, foi evidente (Figura 30d) a fluorescência da maioria das células do cultivo. As fotografias dos isolados a partir das amostras VZ3(145-168), VZ3(145-168), TP1(193-216) e TP1(193-216), Figura 30 e, f, g e h, também revelam a presença de bacilos livres ou formando pares característicos do gênero hidrogenotrófico *Methanobacterium* sp., embora as amostras examinadas sob microscopia revelem mais de um morfotipo. A Figura 30h confirma a fluorescência dos bacilos comentados e indicados com setas. Não foi possível confirmar a pureza dos isolados, mas é fato que os cultivos metanogênicos estão selecionados e puderam ser classificados. Para depósito em coleções de culturas, as mesmas serão submetidas a cultivos com o antibiótico vancomicina e monitoradas para purificação.

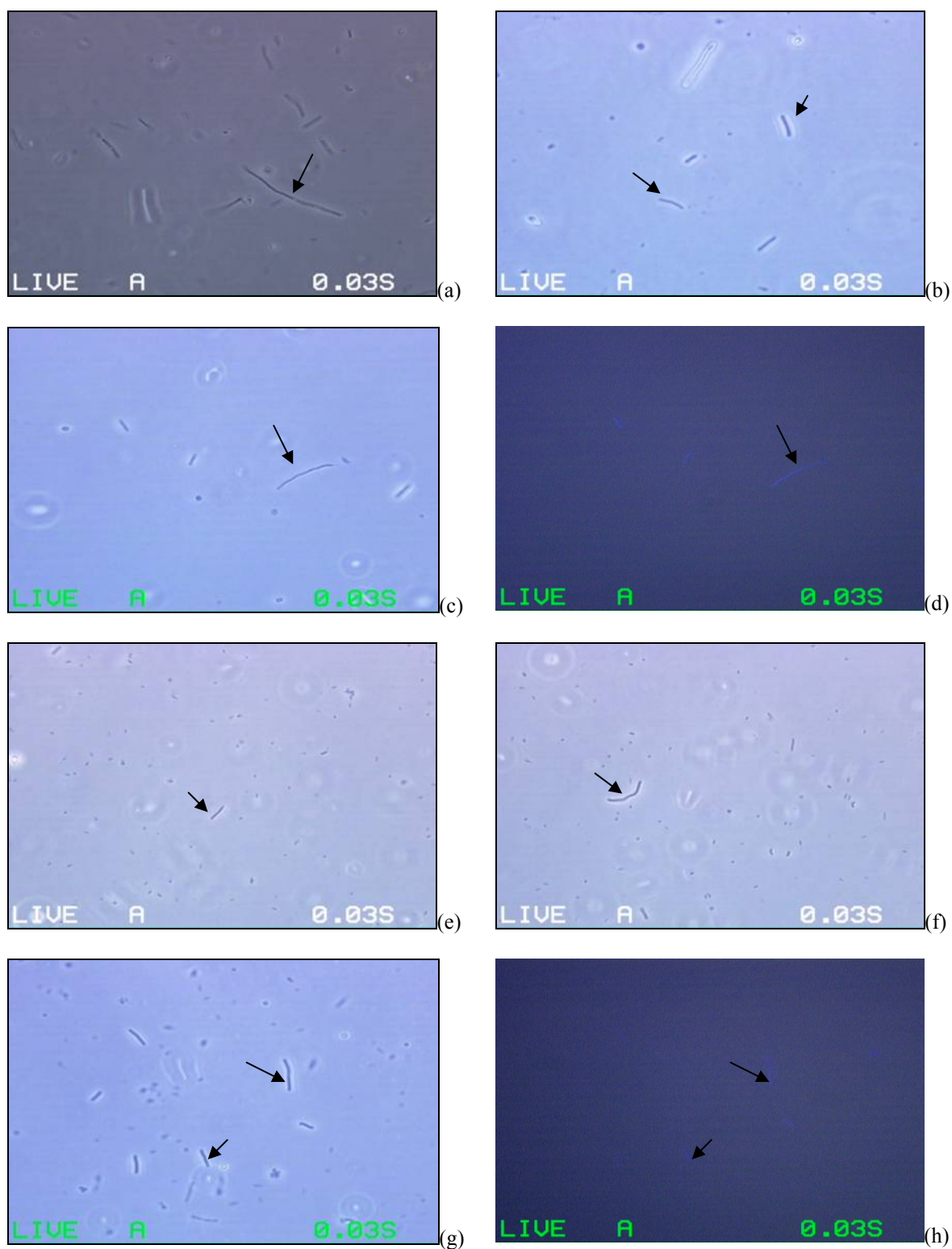


Figura 30 - Fotomicrografias das culturas metanogênicas purificadas, a saber: a) VZ1(1-24), cadeia de bacilos; b) VZ1(49-72) células em forma de bacilos; c) VZ2(73-96), células em forma de bacilos; d) VZ2(73-96), bacilos exibindo fluorescência; e) VZ3(145-168), bacilos livres; f) VZ3(145-168), bacilos livres; g) TP1(193-216), predominância de bacilos; h) TP1(193-216), bacilos exibindo fluorescência. Microscopia de contraste de fase (aumento 1250 vezes)

A Figura 31 mostra imagem de microscopia eletrônica de varredura dos cultivos VZ2 (73-96) e VZ3 (145-168). Pode-se observar na imagem do cultivo VZ2 (73-96) (Figura 31a) células em formato de bacilos, aparentando que o cultivo esteja puro; e pela fotografia do cultivo VZ3(145-168) (Figura 31b), grande número de bacilos, e também alguns cocos. Ambas as imagens foram feitas em aumento de 4.000 x.

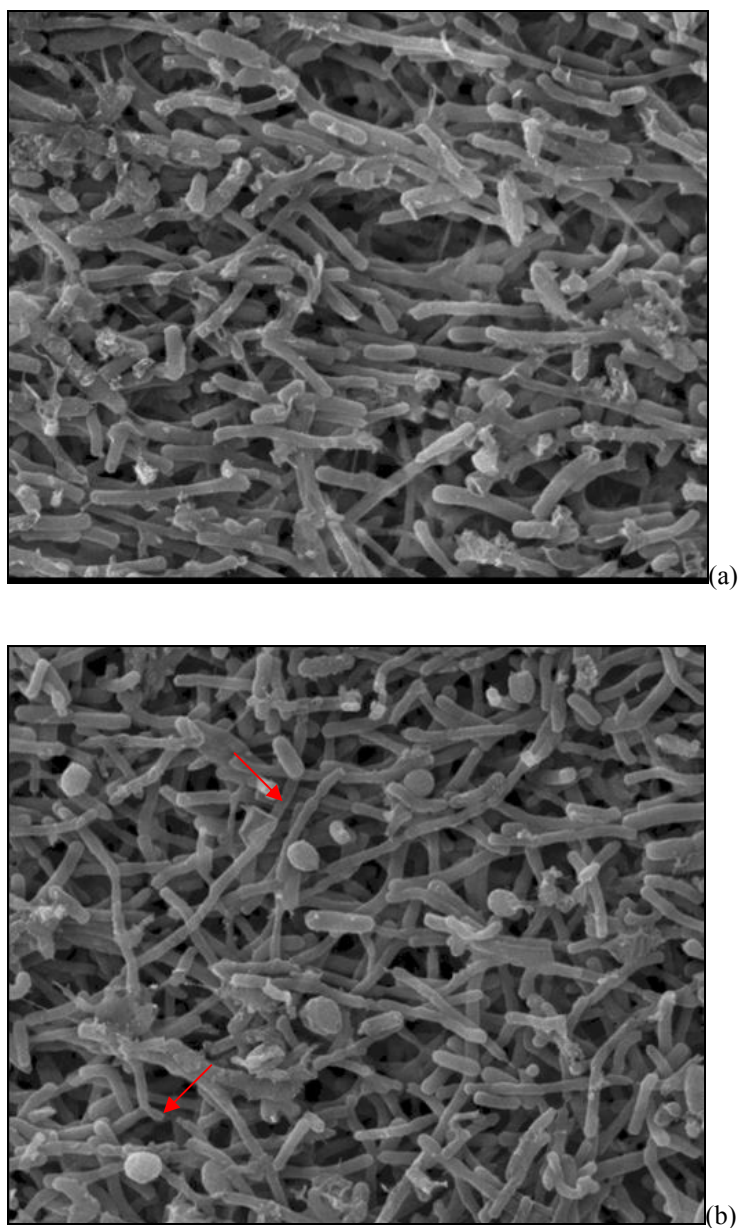


Figura 31 - Fotomicrografias das culturas metanogênicas purificadas, a saber: a) VZ2 (73-96), células em formato de bacilos; b) VZ3(145-168), bacilos, e alguns cocos. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) (aumento de 4.000 x)

Com o advento de técnicas de biologia molecular “independentes de cultivo” gerou-se um grande e importante número de informações sobre a estrutura e diversidade de microrganismos nos mais diversos ambientes. Entretanto, estes métodos isoladamente não fornecem dados funcionais da comunidade. Ainda hoje, um dos maiores desafios que prevalecem é o cultivo de microrganismos recalcitrantes ou considerados não cultiváveis, ou mesmo microrganismos de difícil cultivo, como as arqueias metanogênicas.

Dessa forma, o isolamento de metanogênicas de solos amazônicos é de grande importância ecológica. Como é de conhecimento, as áreas alagáveis são uma das maiores fontes geradoras do metano encontrado na atmosfera terrestre, contribuindo com cerca de 70% do total emitido (BARTLETT; HARRIS, 1993). Devido à sua grande extensão, de mais de um milhão de quilômetros quadrados, a Bacia Amazônica assume um papel fundamental no que tange à emissão de metano para a atmosfera e sua relevância para o aquecimento global (JUNK, 1997). Apesar da existência de vários estudos sobre a emissão de metano na Amazônia, este trabalho é o primeiro de isolamento de arqueias metanogênicas em solos amazônicos.

2.3.5 Diversidade de *Archaea* em solo de várzea

Para verificar a presença e a diversidade de *Archaea* realizou-se a extração do DNA metagenômico do solo e o seqüenciamento do gene 16S rDNA por PCR, seguido pela clonagem e seqüenciamento. Para este estudo, escolheu-se a várzea 3 (VZ3), com base na análise físico-química do solo (Tabelas 3 e 4) e o desempenho no ensaio de potencial de produção de metano (Figura 11). Foram construídas quatro bibliotecas de 16S rDNA: VZP1, profundidade 00-20 cm; VZP2, profundidade 20-40 cm; VZP3, profundidade 40-70 cm, e VZP4, profundidade 70-100 cm.

O DNA genômico do solo foi extraído em triplicatas, e após a junção das tréplicas, a qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose 1% (Figura 32).

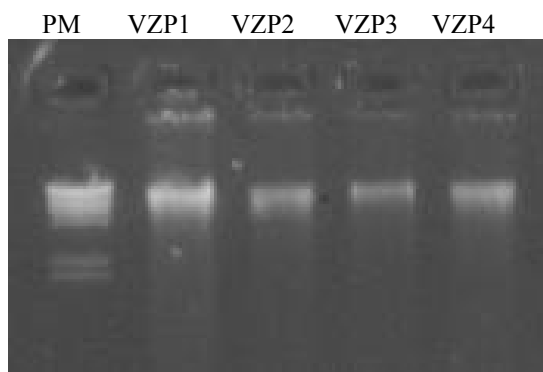


Figura 32 - Fotografia DNA metagenômico extraído das amostras de solo de várzea da Amazônia Oriental (Santarém - PA). VZP1: várzea, 00-20 cm; VZP2: várzea, 20-40 cm; VZP3: várzea, 40-70 cm; VZP4: várzea, 70-100 cm. PM: Padrão Molecular - λ Hind

Um total de 669 clones foram seqüenciados e analisados, sendo 129 pertencentes a biblioteca VZP1, 201 a biblioteca VZP2, 169 a biblioteca VZP3, e 170 a biblioteca VZP4.

Os resultados da afiliação filogenética das seqüências parciais de 16S rDNA feita pelo programa RDP Classifier (Confidence threshold: 95%) e a seqüência de maior similaridade encontrada no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) estão descritos na Tabela 18.

Na camada mais superficial (VZP1) aproximadamente 17% das seqüências classificadas como *Archaea* foram classificadas também no filo *Crenarchaeota* (Figura 33 a), e todas elas foram classificadas na classe *Thermoprotei*. Entretanto, se desconsiderarmos o limite de

confiança, o número de seqüências classificadas como *Crenarchaeota* aumenta para mais de 70% (Figura 33 b).

Cerca de 23% das seqüências foram classificadas no filo *Euryarchaeota*. Destas, 11 pertencem à classe *Methanomicrobia*, sendo que 8 delas foram classificadas até o nível de gênero, *Methanosarcina* (VZP1-AB07, VZP1-AB12, VZP1-AE05, VZP1-AE06, VZP1-AF04, VZP1-AF05, VZP1-AG02 e VZP1-BC06) (Tabela 18). Na profundidade de 20-40 cm (VZP2) a maior parte das seqüências foi classificada no filo *Euryarchaeota* (Figura 33 a). Destas, 5 foram classificadas na classe *Methanomicrobia* e 23 na ordem *Methanosarcinales* (Tabela 18). Desconsiderando o limite de confiança, a porcentagem de seqüências classificadas como *Euryarchaeota* aumenta para cerca de 60%. O filo *Crenarchaeota* representa 9% do total de seqüências classificadas como *Archaea*, com 17 seqüências, e 16 delas foram classificadas também na classe *Thermoprotei* (Tabela 18). Aproximadamente 3,5% das seqüências não foram classificadas com o RDP Classifier, embora apresentem similaridade a seqüências de *Archaea* no banco de dados do NCBI (Tabela 18). Na camada 40-70 cm (VZP3) 24% das seqüências pertencem ao filo *Euryarchaeota* e 9% ao filo *Crenarchaeota* (Figura 33 a). Foram classificadas na classe *Thermoprotei* 13 seqüências, 1 na classe *Methanomicrobia* (VZP3-AF05), e 5 na ordem *Methanomicrobiales* (VZP3-AC01, VZP3-AE01, VZP3-BA07, VZP3-BB04, VZP3-BC11) (Tabela 18). Cerca de 70% das seqüências foram classificadas somente ao nível de Domínio (Figura 33 a), e 4 seqüências não foram classificadas pelo RDP Classifier com 95% de limite de confiança. Na maior profundidade, 70-100 cm (VZP4), 38% das seqüências foram classificadas como *Euryarchaeota* e 8% como *Crenarchaeota* (Figura 33 a). Foram classificadas 7 seqüências na ordem *Methanosarcinales*, e cinco delas foram classificadas também na família *Methanosarcinaceae*. Dez seqüências foram classificadas como *Thermoprotei* (Tabela 18). Aproximadamente de 55% das seqüências não puderam ser classificadas em filo.

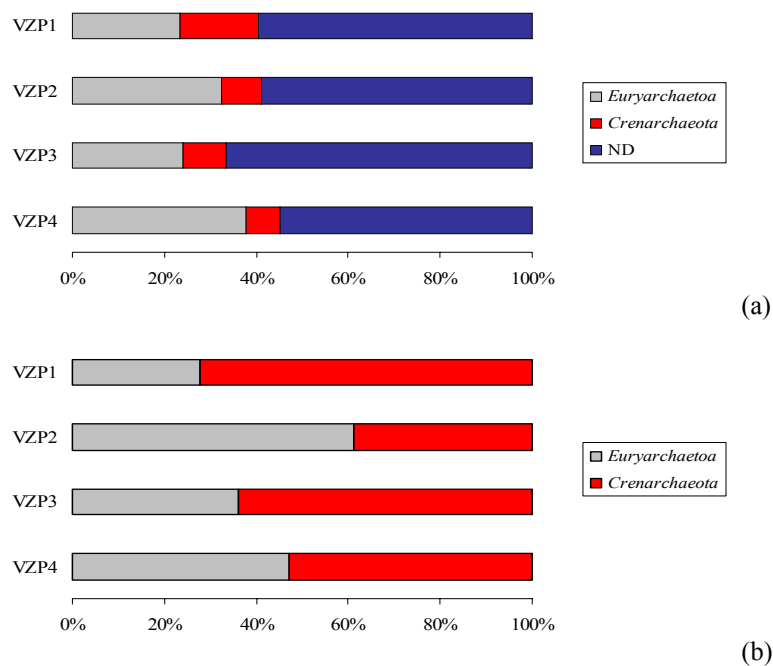


Figura 33 - Frequência relativa de seqüências de 16S rDNA encontradas de filões nas camadas 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4) em solo de várzea da Amazônia Oriental (Santarém - PA), classificadas com o RDP Classifier com limite de confiança de 95% (a), e desconsiderando-se valor de limite de confiança (b)

As análises filogenéticas mostraram que todos os clones pertencem aos filões *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota*. Nenhuma seqüência de *Korarchaeota* ou *Nanoarchaeota* foi encontrada. Do total de seqüências avaliadas, grande parte foi classificada apenas ao nível de domínio (60%) (Figura 34 a). Apenas 1,6% das seqüências não foram classificadas com o RDP Classifier (Figura 34 b), mas apresentaram similaridade com seqüências de *Archaea* depositadas no NCBI, com faixa de identidade obtida de 84 - 100%. Pode-se observar que as seqüências analisadas possuem relação com seqüências obtidas com ambientes correlatos ao avaliado neste estudo, sendo que cerca de 23% foram encontradas em solo, e 44% em sedimentos de água doce.

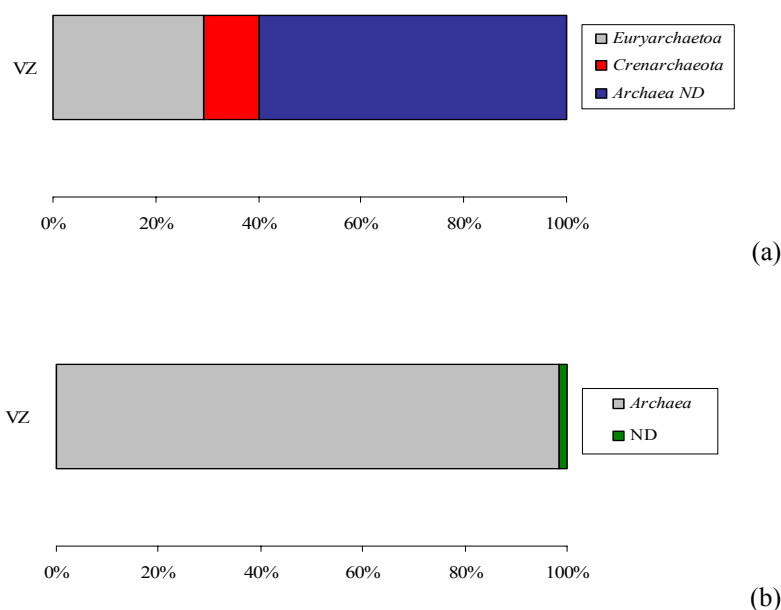


Figura 34 - Frequência relativa de seqüências de 16S rDNA encontradas de *Archaea* (a) e de filós (b) em todas as seqüências analisadas do solo de várzea da Amazônia Oriental (Santarém - PA). As seqüências foram classificadas com o RDP Classifier com limite de confiança de 95%. VZ: Todas as seqüências do solo de várzea

A maior parte das seqüências classificadas como *Crenarchaeota* (209) foram similares a *Crenarchaeota* relacionadas à oxidação da amônia em fontes termais (47°C) (AM039531.1, AM039532.1, AM039533.1, AM039534.1) (WEIDLER et al., 2007). Parte destas seqüências foi classificada pelo RDP Classifier na classe *Thermoprotei*, o que era esperado para microrganismos encontrados em ambientes de alta temperatura, como as fontes termais. Outras 86 seqüências apresentaram similaridade a *Crenarchaeota* encontradas em minas de urânio (AJ535119.1, AJ535120.1) (SELENSKA-POBELL et al., 2003 - não publicado).

Vários trabalhos têm demonstrado a ampla distribuição de *Crenarchaeota* no solo (BINTRIM et al., 1997; BUCKLEY; GRABER; SCHMIDT, 1998.). Neste trabalho, 38 seqüências foram similares a *Crenarchaeota* do solo, 5 descritas por Ochsenreiter et al. (2003 - não publicado) (AY278090.1), 1 por Nicol et al (2005) (AY601306.1), e 32 descritas por Bintrim et al. (1997) (U62815.1, U62818.1). Estas seqüências descritas por Bintrim et al. (1997) apresentaram similaridade também com 2 seqüências de *Crenarchaeota* encontradas por Borneman e Triplett (1997) em dois solos amazônicos, sob floresta e pastagem. Embora seja um

número limitado de seqüências para comparação, estas são as duas únicas seqüências de *Archaea* descritas em solos amazônicos. Ainda, são similares às seqüências descritas em solos tropicais agrícolas (CLEMENTINO et al., 2006).

Setenta e sete seqüências foram similares a *Euryarchaeota* encontradas em sedimento calcáreo de uma caverna formada pela dissolução de rochas calcáreas, “Wind Cave National Park” (AY217535.1), de onde apenas 1 seqüência foi relacionada à *Crenarchaeota* (AY217522.1).

Entre as seqüências que foram classificadas pelo RDP Classifier relativas à classe *Methanosarcinales* 16 delas apresentaram similaridade pelo Blast com seqüências encontradas em sedimentos de água doce, a saber: AY652476.1 (CHAUHAN; REDDY; OGRAM, 2006), AF293016.1 e AF293017.1 (STEIN et al., 2001), AB288247.1 (SHIMIZU et al., 2007 - não publicado), DQ354743.1 e DQ337108.1 (GIHRING; MOSER; ONSTOTT, 2006 - não publicado). Entretanto, a maioria delas foi similar a seqüências de solo, entre eles os clones AM114193.2 e AB196288.1, AF225644.1, de rizosfera e solo de arroz, respectivamente (ERKEL et al., 2006; SAKAI et al., 2004. - não publicado; LUEDERS; FRIEDRICH, 2000); clone AF226268.1, de rizosfera do milho (CHELIUS; TRIPLET, 2001); clone AY175383.1, de solo turfoso (BASILIKO et al. - não publicado); clone EF125517.1, de solo de mangue (YAN; HONG, 2007 - não publicado); clones AB161329.1 e AB161346.1, de solos contaminados por petróleo (KASAI et al., 2005); AY457661.1, encontrado na região de Pântano – alagados (CASTRO; OGRAM; REDDY, 2004); clone AY652476.1, de pântano (CHAUHAN; REDDY; OGRAM, 2006), entre outros. Também foi observada similaridade com seqüências encontradas em mina de ouro, clone EF446793.1 (ONSTOTT, 2007 - não publicado).

A alta freqüência de seqüências classificadas como *Methanomicrobia*, *Methanosarcinales* ou mesmo como *Methanosarcina* indicam que este grupo de microrganismos seja dominante neste ambiente. Os microrganismos pertencentes à família *Methanosarcinales* pertencem a um grupo especializado de arqueias anaeróbias que produzem metano a partir de um limitado grupo de substratos. Em ecossistemas de água doce, o $H_2:CO_2$, o formiato e o acetato são os principais precursores metanogênicos (CASTRO; OGRAM; REDDY, 2004). Nestes ecossistemas, como várzeas, sedimentos de lagos e arrozais inundados, o acetato é o precursor preliminar do metano, sendo que aproximadamente 60 a 80% do metano são produzidos do acetato (CONRAD, 1999).

A utilização do acetato é restrita a dois gêneros na ordem *Methanosarcinales*, *Methanosaeta* e *Methanosarcina* (GARRITY; HOLT, 2001).

Embora a fisiologia não possa necessariamente ser suposta pela filogenia, em muitos casos a fisiologia de um organismo pode ser cautelosamente inferida pela filogenia. Se uma seqüência for similar a um grupo do organismo cultivado com propriedades comuns, pode-se esperar que o organismo amostrado somente pela seqüência de DNA do ambiente possa também exibir aquelas propriedades (KIM et al., 2005). Desta forma, pode-se considerar que as seqüências relativas à *Methanosarcinales* representem metanogênicas envolvidas na produção do metano a partir do acetato no solo analisado. Estes dados corroboram com os resultados obtidos no cultivo de arqueias metanogênicas deste trabalho, onde foram obtidos isolados de *Methanosarcina* nesta mesma várzea, em duas profundidades, 20-40 cm (VZ3(145-168)), e 40-70 cm (VZ3(169-192)). A composição isotópica do metano reflete a combinação do fracionamento de diferentes substratos. Dependendo da via de produção do metano (acetoclástica ou hidrogenotrófica) o metano terá um valor diferente de $\delta^{13}\text{C}$ (MARICK et al., 2002). Valores maiores de $\delta^{13}\text{C}$ estão relacionados à produção do metano via fermentação do acetato, enquanto os valores menores se relacionam a redução do CO_2 . Moura (2005) estudando a composição isotópica do metano em várzeas do município de Santarém - PA (mesmo local deste estudo) observou que na várzea os altos valores de $\delta^{13}\text{C}$ encontrados indicavam a maior contribuição da via acetoclástica para a formação do metano.

Foram observadas também similaridades com seqüências obtidas de ambientes inóspitos, como depósito de betume (EF420187.1) (PENNER; FOGHT; MACKINNON, 2007 - não publicado), sedimento vulcânico (EF032793.1, AY917222.1) (BROWN et al., 2006 - não publicado; GOMEZ-ALVAREZ; NUSSLEIN, 2005 - não publicado), e água contaminada por metais pesados (EF464061.1) (ALMEIDA et al., 2007 - não publicado). Coincidentemente, Clementino et al. (2006), em solos agrícolas tropicais também encontraram seqüências similares àquelas encontradas em sedimentos vulcânicos.

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(continua)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
VZP1-AA01	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003.np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-AA02	<i>Archaea</i>	98%	0	AB161343.1	KASAI et al., 2005.	<i>Archaea</i> - Solo contaminado por petróleo
VZP1-AA05	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-AA06	<i>Archaea</i>	99%	0	AB126372.1	NUNOURA et al., 2005. np.	<i>Archaea</i> - Reservatório de petróleo
VZP1-AA07	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ831158.1	LALOUI-CARPENTIER et al., 2006.	<i>Archaea</i> metanogênica - chorume aterro sanitário
VZP1-AA08	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL, et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-AA09	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AM039531.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP1-AA10	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP1-AA12	<i>Archaea</i>	99%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> – Solo
VZP1-AB01	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003.np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-AB02	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-AB03	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039533.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP1-AB04	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> – Aquífero
VZP1-AB06	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-AB09	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039531.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP1-AB10	<i>Archaea</i>	96%	0	DQ365103.1	LEE et al., 2006. np.	<i>Archaea</i> – Compostagem
VZP1-AC01	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> – Aquífero
VZP1-AC02	<i>Archaea</i>	99%	0	U62818.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> – Solo
VZP1-AC03	<i>Archaea</i>	95%	0	DQ399812.1	ENRIGHT; COLLINS; O'FLAHERTY, 2006. np.	<i>Archaea</i> - Água residual contaminada por tolueno
VZP1-AC05	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-AC06	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-AC07	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039531.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP1-AC08	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-AC11	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-AC12	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(Continuação)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
VZP1-AD02	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-AD04	<i>Archaea</i>	99%	0	AB126372.1	NUNOURA et al., 2005. np.	<i>Archaea</i> - Reservatório de petróleo
VZP1-AD08	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP1-AD09	<i>Archaea</i>	99%	0	EF032793.1	BROWN et al., 2006. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Sedimento vulcânico
VZP1-AD10	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-AD11	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP1-AD12	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-AE02	<i>Archaea</i>	95%	0	AJ831142.1	LALOU-CARPENTIER et al., 2006.	<i>Archaea</i> metanogênica - chorume aterro sanitário
VZP1-AE04	<i>Archaea</i>	97%	0	AY820221.1	ZHANG, et al., 2005.	<i>Archaea</i> - Rocha em subsuperfície
VZP1-AE07	<i>Archaea</i>	95%	0	EF420187.1	PENNER; FOGHT; MACKINNON, 2007. np.	<i>Archaea</i> - Depósito de Betume
VZP1-AE08	<i>Archaea</i>	99%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP1-AE09	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP1-AE11	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP1-AF01	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-AF03	<i>Archaea</i>	98%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP1-AF06	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP1-AF07	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP1-AF09	<i>Archaea</i>	96%	0	AY278090.1	OCHSENREITER, et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP1-AF10	<i>Archaea</i>	99%	0	U59986.1	HERSHBERGER et al., 1996.	<i>Crenarchaeota</i> - Ambiente Terrestre
VZP1-AF11	<i>Thermoprotei</i>	98%	0	U62818.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP1-AF12	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP1-AG01	<i>Archaea</i>	99%	0	EF464061.1	ALMEIDA et al., 2007. np.	<i>Archaea</i> - Água contaminada por metais pesados
VZP1-AG03	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP1-AG04	<i>Archaea</i>	99%	0	AB126372.1	NUNOURA et al., 2005. np.	<i>Archaea</i> - Reservatório de petróleo
VZP1-AG05	<i>Archaea</i>	98%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(Continuação)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
VZP1-AG06	<i>Archaea</i>	96%	0	AY278090.1	OCHSENREITER, et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP1-AG08	<i>Thermoprotei</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP1-AG10	<i>Archaea</i>	98%	0	AB161337.1	KASAI et al., 2005.	<i>Archaea</i> - Solo contaminado por petróleo
VZP1-AG12	<i>Archaea</i>	99%	0	AY217522.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Crenarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP1-AH01	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-AH03	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-AH04	<i>Archaea</i>	96%	0	AY278090.1	OCHSENREITER, et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP1-AH05	<i>Archaea</i>	96%	0	AB161343.1	KASAI et al., 2005.	<i>Archaea</i> - Solo contaminado por petróleo
VZP1-AH06	<i>Archaea</i>	96%	0	AY278090.1	OCHSENREITER, et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP1-AH07	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	EF032793.1	BROWN et al., 2006. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Sedimento vulcânico
VZP1-AH10	<i>Archaea</i>	99%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP1-AH11	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquifero
VZP1-BA01	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535119.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-BA02	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535119.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-BA04	<i>Archaea</i>	98%	0	AY917222.1	GOMEZ-ALVAREZ; NUSSLEIN, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Sedimento vulcânico
VZP1-BA05	<i>Archaea</i>	97%	0	AY601306.1	NICOL et al., 2005.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP1-BA08	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP1-BA09	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-BA10	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP1-BA11	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AM039532.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP1-BA12	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP1-BB02	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AJ535119.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-BB03	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AJ535119.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-BB04	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535119.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-BB05	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AJ535119.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(Continuação)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo – Ambiente
VZP1-BB07	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-BB09	<i>Archaea</i>	96%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> – Solo
VZP1-BB10	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535119.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-BB11	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP1-BB12	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP1-BC01	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535119.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-BC03	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AB126372.1	NUNOURA et al., 2005. np.	<i>Archaea</i> - Reservatório de petróleo
VZP1-BC08	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP1-BC11	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> – Aquífero
VZP1-BC12	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP1-BD01	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	EF032793.1	BROWN et al., 2006. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Sedimento vulcânico
VZP1-BD03	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	U81774.2	GODON et al., 1997.	<i>Archaea</i> - Biodigestor anaeróbio
VZP1-BD04	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535119.1	SELENSKA-POBELL, et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-BD05	<i>Archaea</i>	99%	0	AB126372.1	NUNOURA et al., 2005. np.	<i>Archaea</i> - Reservatório de petróleo
VZP1-BD06	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AJ535119.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-BD09	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP1-BD10	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP1-BD12	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP1-AA03	<i>Euryarchaeota</i>	95%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> – Solo
VZP1-AA04	<i>Euryarchaeota</i>	85%	1,00E-159	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP1-AA11	<i>Euryarchaeota</i>	87%	6,00E-158	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP1-AB05	<i>Euryarchaeota</i>	95%	0	DQ004704.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> – Solo
VZP1-AB07	<i>Methanosarcina</i>	99%	0	AB288247.1	SHIMIZU et al., 2007. np.	<i>Archaea</i> metanogênica - Sedimento de aquífero
VZP1-AB08	<i>Euryarchaeota</i>	86%	6,00E-143	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP1-AB11	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(Continuação)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
VZP1-AB12	<i>Methanosarcina</i>	98%	0	AB288247.1	SHIMIZU et al., 2007. np.	<i>Archaea</i> metanogênica - Sedimento de aquífero
VZP1-AC09	<i>Euryarchaeota</i>	87%	3,00E-161	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP1-AD01	<i>Archaea</i>	94%	5,00E-164	DQ004704.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP1-AD07	<i>Euryarchaeota</i>	93%	4,00E-165	AF226268.1	CHELIUS; TRIPLETT, 2001.	<i>Archaea</i> - Rizosfera de milho
VZP1-AE01	<i>Euryarchaeota</i>	95%	0	DQ004704.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP1-AE03	<i>Euryarchaeota</i>	94%	5,00E-174	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP1-AE05	<i>Methanosarcina</i>	100%	2,00E-142	AF225644.1	LUEDERS; FRIEDRICH, 2000.	<i>Archaea</i> - Solo de arroz
VZP1-AE06	<i>Methanosarcina</i>	100%	0	AY175383.1	BASILIKO et al., 2003. np.	<i>Archaea</i> metanogênica - Solos turfosos
VZP1-AE12	<i>Euryarchaeota</i>	87%	2,00E-153	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP1-AF02	<i>Euryarchaeota</i>	87%	5,00E-159	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP1-AF04	<i>Methanosarcina</i>	98%	0	AF418929.1	STEIN et al., 2002.	<i>Archaea</i> - Reservatório de água doce
VZP1-AF05	<i>Methanosarcina</i>	99%	0	EF125517.1	YAN; HONG, 2007. np.	<i>Archaea</i> - Solo de manguê
VZP1-AG02	<i>Methanosarcina</i>	100%	0	AY175383.1	BASILIKO et al., 2003. np.	<i>Archaea</i> metanogênica - Solos turfosos
VZP1-AG09	<i>Euryarchaeota</i>	95%	5,00E-169	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP1-AG11	<i>Euryarchaeota</i>	86%	2,00E-112	DQ228623.1	SCHRENK et al., 2005. np.	<i>Archaea</i> - Superfície mineral
VZP1-BA07	<i>Euryarchaeota</i>	85%	0	AY835423.2	DHILLON et al., 2005.	<i>Archaea</i> metanogênica - Sedimento hidrotermal
VZP1-BB01	<i>Methanomicrobia</i>	99%	0	AB196288.1	SAKAI et al., 2004. np.	<i>Archaea</i> metanogênica - Solo de arroz
VZP1-BB06	<i>Euryarchaeota</i>	95%	0	DQ004704.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP1-BB08	<i>Euryarchaeota</i>	96%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP1-BC02	<i>Euryarchaeota</i>	95%	0	DQ004704.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP1-BC04	<i>Euryarchaeota</i>	95%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP1-BC06	<i>Methanosarcina</i>	97%	0	AE010299.1	GALAGAN et al., 2002.	<i>Methanosarcina acetivorans</i> - Genoma
VZP1-BC07	<i>Euryarchaeota</i>	85%	0	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP1-BC09	<i>Euryarchaeota</i>	96%	0	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP1-BC10	<i>Euryarchaeota</i>	85%	8,00E-172	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(Continuação)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
VZP1-BD02	<i>Archaea</i>	95%	0	DQ004704.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP1-BD07	<i>Methanosarcinaceae</i>	92%	0	AB161329.1	KASAI et al., 2005.	<i>Archaea</i> - Solo contaminado por petróleo
VZP1-BD08	<i>Methanosarcinaceae</i>	92%	0	AB161329.1	KASAI et al., 2005.	<i>Archaea</i> - Solo contaminado por petróleo
VZP1-BD11	<i>Euryarchaeota</i>	95%	0	DQ004704.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP2-AA01	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AA02	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AA03	<i>Methanomicrobia</i>	97%	0	DQ337108.1	GIHRING; MOSER; ONSTOTT, 2006. np.	<i>Archaea</i> - Água de subsuperfície
VZP2-AA05	<i>Archaea</i>	97%	2,00E-159	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AA07	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AA08	<i>Archaea</i>	87%	6,00E-150	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP2-AA09	<i>Euryarchaeota</i>	86%	1,00E-117	AY835423.2	DHILLON et al., 2005.	<i>Archaea</i> metanogênica - Sedimento hidrotermal
VZP2-AA10	<i>Methanosarcinales</i>	97%	0	AB161329.1	KASAI et al., 2005.	<i>Archaea</i> - Solo contaminado por petróleo
VZP2-AA11	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AA12	<i>Archaea</i>	95%	0	DQ004704.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP2-AB01	ND	97%	4,00E-167	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP2-AB02	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP2-AB03	ND	83%	1,00E-76	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP2-AB04	<i>Methanosarcinales</i>	98%	4,00E-172	AB161329.1	KASAI et al., 2005.	<i>Archaea</i> - Solo contaminado por petróleo
VZP2-AB05	<i>Methanosarcinales</i>	99%	6,00E-160	AB161329.1	KASAI et al., 2005.	<i>Archaea</i> - Solo contaminado por petróleo
VZP2-AB06	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AB07	<i>Archaea</i>	99%	2,00E-164	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AB08	ND	99%	1,00E-96	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP2-AB09	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP2-AB10	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP2-AB11	<i>Archaea</i>	85%	2,00E-115	DQ228623.1	SCHRENK et al., 2005. np.	<i>Archaea</i> - Superfície mineral

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(Continuação)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
VZP2-AB12	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AC01	<i>Archaea</i>	95%	0	AY917219.1	GOMEZ-ALVAREZ; NUSSLEIN, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Sedimento vulcânico
VZP2-AC02	<i>Methanosarcinales</i>	97%	0	DQ337108.1	GIHRING; MOSER; ONSTOTT, 2006. np.	<i>Archaea</i> - Água de subsuperfície
VZP2-AC03	ND	88%	9,00E-84	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP2-AC04	<i>Euryarchaeota</i>	85%	7,00E-110	DQ228623.1	SCHRENK et al., 2005. np.	<i>Archaea</i> - Superfície mineral
VZP2-AC05	<i>Archaea</i>	97%	2,00E-154	AY603059.1	WANG et al., 2005. np.	<i>Archaea</i> - Solos não perturbados
VZP2-AC06	<i>Archaea</i>	97%	0	AM039531.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AC07	ND	97%	2,00E-109	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP2-AC08	<i>Archaea</i>	99%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP2-AC09	<i>Archaea</i>	99%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP2-AC10	<i>Thermoprotei</i>	98%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP2-AC12	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AD02	<i>Archaea</i>	95%	0	AY917219.1	GOMEZ-ALVAREZ; NUSSLEIN, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Sedimento vulcânico
VZP2-AD03	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP2-AD04	<i>Euryarchaeota</i>	96%	0	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP2-AD05	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AD06	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP2-AD07	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AD08	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AD09	<i>Archaea</i>	94%	1,00E-151	DQ004704.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP2-AD10	<i>Methanomicrobia</i>	98%	0	EF446793.1	ONSTOTT, 2007.	<i>Archaea</i> - Mina de ouro
VZP2-AD11	<i>Methanomicrobia</i>	98%	0	AY652476.1	CHAUHAN; REDDY; OGRAM, 2006.	<i>Archaea</i> metanogênica - Pântano de água doce
VZP2-AD12	<i>Euryarchaeota</i>	87%	2,00E-139	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP2-AE01	<i>Methanosarcinales</i>	95%	0	AF293017.1	STEIN et al., 2001.	<i>Archaea</i> - Sedimento
VZP2-AE02	ND	79%	4,00E-87	AB239075.1	ARAKAWA et al., 2006.	<i>Crenarchaeota</i> - Sedimento marinho

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(Continuação)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
VZP2-AE03	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP2-AE04	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AE05	<i>Methanosarcinales</i>	95%	6,00E-175	AF293017.1	STEIN et al., 2001.	<i>Archaea</i> - Sedimento
VZP2-AE06	<i>Euryarchaeota</i>	86%	1,00E-117	AY835423.2	DHILLON et al., 2005.	<i>Archaea</i> metanogênica - Sedimento hidrotermal
VZP2-AE07	<i>Euryarchaeota</i>	86%	1,00E-111	DQ228623.1	SCHRENK et al., 2005. np.	<i>Archaea</i> - Superfície mineral
VZP2-AE08	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AE09	<i>Methanosarcinales</i>	98%	0	AY457661.1	CASTRO; OGRAM; REDDY, 2004.	<i>Archaea</i> - Pântano
VZP2-AE10	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AE11	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AE12	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AF01	<i>Archaea</i>	99%	3,00E-168	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AF02	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AF03	<i>Archaea</i>	99%	5,00E-166	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP2-AF04	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AF06	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP2-AF07	<i>Euryarchaeota</i>	86%	5,00E-111	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP2-AF08	<i>Methanosarcinales</i>	98%	0	AY457661.1	CASTRO; OGRAM; REDDY, 2004.	<i>Archaea</i> - Pântano
VZP2-AF09	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP2-AF10	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AF11	<i>Methanosarcinales</i>	98%	0	AB161329.1	KASAI et al., 2005.	<i>Archaea</i> - Solo contaminado por petróleo
VZP2-AF12	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AG01	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AG02	<i>Archaea</i>	99%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP2-AG03	<i>Euryarchaeota</i>	92%	8,00E-134	AB161329.1	KASAI et al., 2005.	<i>Archaea</i> - Solo contaminado por petróleo
VZP2-AG04	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(Continuação)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
VZP2-AG05	<i>Methanosarcinales</i>	97%	2,00E-149	AB161329.1	KASAI et al., 2005.	<i>Archaea</i> - Solo contaminado por petróleo
VZP2-AG07	<i>Archaea</i>	99%	4,00E-162	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AG08	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP2-AG09	<i>Euryarchaeota</i>	86%	1,00E-111	AY835423.2	DHILLON et al., 2005.	<i>Archaea</i> metanogênica - Sedimento hidrotermal
VZP2-AG11	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP2-AG12	<i>Archaea</i>	86%	5,00E-116	AY835423.2	DHILLON et al., 2005.	<i>Archaea</i> metanogênica - Sedimento hidrotermal
VZP2-AH01	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP2-AH02	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AH04	<i>Thermoprotei</i>	99%	4,00E-162	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-AH05	<i>Euryarchaeota</i>	86%	1,00E-117	AY835423.2	DHILLON et al., 2005.	<i>Archaea</i> metanogênica - Sedimento hidrotermal
VZP2-AH06	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP2-AH07	ND	94%	2,00E-155	DQ004704.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP2-AH08	<i>Methanosarcinales</i>	97%	0	AF293017.1	STEIN et al., 2001.	<i>Archaea</i> - Sedimento
VZP2-AH09	<i>Methanosarcinales</i>	96%	0	DQ354743.1	GIHRING; MOSER; ONSTOTT, 2006. np.	<i>Archaea</i> - Água de subsuperfície
VZP2-AH10	<i>Methanosarcinales</i>	95%	0	AY457661.1	CASTRO; OGRAM; REDDY, 2004.	<i>Archaea</i> - Pântano
VZP2-AH12	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BA01	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP2-BA02	<i>Thermoprotei</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP2-BA03	<i>Archaea</i>	99%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP2-BA04	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BA06	<i>Euryarchaeota</i>	88%	2,00E-110	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP2-BA07	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP2-BA08	<i>Euryarchaeota</i>	88%	6,00E-165	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP2-BA09	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BA11	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(Continuação)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
VZP2-BA12	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP2-BB02	<i>Archaea</i>	98%	0	AY186066.1	NORTHUP et al., 2003.	<i>Archaea</i> - Depósito de ferro-manganês
VZP2-BB03	<i>Euryarchaeota</i>	94%	8,00E-149	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP2-BB04	<i>Methanosarcinales</i>	96%	0	DQ337108.1	GIHRING; MOSER; ONSTOTT, 2006. np.	<i>Archaea</i> - Água de subsuperfície
VZP2-BB05	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP2-BB06	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP2-BB07	<i>Archaea</i>	99%	1,00E-177	AY186062.1	NORTHUP et al., 2003.	<i>Archaea</i> - Depósito de ferro-manganês
VZP2-BB10	<i>Euryarchaeota</i>	85%	6,00E-120	DQ228623.1	SCHRENK et al., 2005. np.	<i>Archaea</i> - Superfície mineral
VZP2-BB11	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BB12	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BC01	<i>Archaea</i>	99%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP2-BC02	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BC03	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP2-BC04	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BC05	<i>Methanosarcinales</i>	97%	0	DQ354743.1	GIHRING; MOSER; ONSTOTT, 2006. np.	<i>Archaea</i> - Água de subsuperfície
VZP2-BC06	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP2-BC07	<i>Methanosarcinales</i>	95%	6,00E-180	AF293016.1	STEIN et al., 2001.	<i>Archaea</i> - Sedimento
VZP2-BC08	<i>Euryarchaeota</i>	85%	1,00E-111	DQ228623.1	SCHRENK et al., 2005. np.	<i>Archaea</i> - Superfície mineral
VZP2-BC10	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP2-BC11	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BC12	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039533.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BD01	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BD03	<i>Methanosarcinales</i>	95%	0	AF293016.1	STEIN et al., 2001.	<i>Archaea</i> - Sedimento
VZP2-BD04	<i>Archaea</i>	99%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP2-BD05	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(Continuação)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
VZP2-BD06	<i>Archaea</i>	97%	0	AM039533.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BD07	<i>Archaea</i>	97%	0	AM039533.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BD08	<i>Euryarchaeota</i>	99%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP2-BD09	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP2-BD10	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BD11	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039531.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BD12	<i>Euryarchaeota</i>	86%	1,00E-166	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP2-BE01	<i>Methanosarcinales</i>	98%	0	DQ354743.1	GIHRING; MOSER; ONSTOTT, 2006. np.	<i>Archaea</i> - Água de subsuperfície
VZP2-BE02	<i>Methanosarcinales</i>	98%	0	AY457661.1	CASTRO; OGRAM; REDDY, 2004.	<i>Archaea</i> - Pântano
VZP2-BE04	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BE05	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP2-BE06	<i>Methanosarcinaceae</i>	95%	0	AB161329.1	KASAI et al., 2005.	<i>Archaea</i> - Solo contaminado por petróleo
VZP2-BE07	<i>Archaea</i>	85%	5,00E-91	DQ522932.1	KENDALL et al., 2007.	<i>Archaea</i> metanogênica - Sedimento marinho
VZP2-BE08	<i>Euryarchaeota</i>	95%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP2-BE10	<i>Archaea</i>	94%	1,00E-176	DQ004704.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP2-BE11	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BE12	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BF01	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BF02	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BF03	<i>Archaea</i>	98%	2,00E-165	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BF04	<i>Euryarchaeota</i>	86%	8,00E-144	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP2-BF05	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BF06	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039531.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BF07	<i>Archaea</i>	98%	8,00E-144	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BF08	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(Continuação)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
VZP2-BF09	<i>Archaea</i>	97%	5,00E-176	AM039533.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BF10	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BF11	<i>Archaea</i>	99%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP2-BF12	<i>Archaea</i>	99%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP2-BG02	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BG03	<i>Methanomicrobia</i>	98%	2,00E-175	AM114193.2	ERKEL et al., 2006.	<i>Archaea</i> metanogênica - Rizosfera do arroz.
VZP2-BG04	<i>Euryarchaeota</i>	94%	8,00E-154	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP2-BG05	<i>Methanosarcinales</i>	96%	1,00E-141	DQ337108.1	GIHRING; MOSER; ONSTOTT, 2006. np.	<i>Archaea</i> - Água de subsuperfície
VZP2-BG06	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BG07	<i>Archaea</i>	87%	3,00E-98	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP2-BH08	<i>Methanomicrobia</i>	99%	0	AB161329.1	KASAI et al., 2005.	<i>Archaea</i> - Solo contaminado por petróleo
VZP2-BH09	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BH10	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BH11	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-BH12	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-CE01	<i>Euryarchaeota</i>	93%	0	DQ004704.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP2-CE02	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP2-CE05	<i>Archaea</i>	99%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP2-CE07	<i>Crenarchaeota</i>	98%	0	AM039531.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-CE08	<i>Euryarchaeota</i>	98%	0	EF446801.1	ONSTOTT, 2007.	<i>Archaea</i> - Mina de ouro
VZP2-CE10	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP2-CE11	<i>Methanosarcinales</i>	96%	0	DQ337108.1	GIHRING; MOSER; ONSTOTT, 2006. np.	<i>Archaea</i> - Água de subsuperfície
VZP2-CE12	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-CF01	<i>Euryarchaeota</i>	95%	0	DQ004704.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP2-CF02	<i>Thermoprotei</i>	98%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(Continuação)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
VZP2-CF03	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP2-CF04	<i>Euryarchaeota</i>	95%	0	DQ004704.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP2-CF05	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AM039531.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-CF06	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AJ535119.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP2-CF08	<i>Methanosarcinales</i>	96%	0	DQ337108.1	GIHRING; MOSER; ONSTOTT, 2006. np.	<i>Archaea</i> - Água de subsuperfície
VZP2-CF09	<i>Euryarchaeota</i>	87%	5,00E-166	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP2-CF10	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-CF11	<i>Euryarchaeota</i>	97%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP2-CF12	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-CG01	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AJ535119.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP2-CG02	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP2-CG03	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP2-CG04	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ535119.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP2-CG06	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AM039531.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-CG07	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AM039531.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-CG08	<i>Methanosarcinales</i>	98%	0	AB161329.1	KASAI et al., 2005.	<i>Archaea</i> - Solo contaminado por petróleo
VZP2-CG09	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535119.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP2-CG10	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535119.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP2-CG11	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP2-CG12	<i>Euryarchaeota</i>	87%	5,00E-166	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP2-CH01	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AB126372.1	NUNOURA et al., 2005. np.	<i>Archaea</i> - Reservatório de petróleo
VZP2-CH02	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP2-CH03	<i>Euryarchaeota</i>	93%	0	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP2-CH04	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-CH06	<i>Euryarchaeota</i>	96%	0	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(Continuação)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
VZP2-CH07	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535119.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP2-CH09	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535119.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP2-CH10	<i>Euryarchaeota</i>	84%	6,00E-175	AY835423.2	DHILLON et al., 2005.	<i>Archaea</i> metanogênica - Sedimento hidrotermal
VZP2-CH11	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP2-CH12	<i>Euryarchaeota</i>	84%	1,00E-177	AY835423.2	DHILLON et al., 2005.	<i>Archaea</i> metanogênica - Sedimento hidrotermal
VZP3-AA01	<i>Euryarchaeota</i>	87%	3,00E-109	AF226268.1	CHELIUS; TRIPLETT, 2001.	<i>Archaea</i> - Rizosfera de milho
VZP3-AA02	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP3-AA03	<i>Euryarchaeota</i>	95%	0	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP3-AA05	<i>Euryarchaeota</i>	87%	5,00E-146	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP3-AA06	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-AA08	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-AA09	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039533.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-AA10	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039533.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-AA11	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039533.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-AA12	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039533.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-AB01	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ583423.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Archaea</i> - Mina de urânio
VZP3-AB03	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ583423.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Archaea</i> - Mina de urânio
VZP3-AB05	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP3-AB06	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP3-AB07	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ583423.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Archaea</i> - Mina de urânio
VZP3-AB08	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP3-AB09	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP3-AB10	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-AB11	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-AB12	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(Continuação)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
VZP3-AC01	<i>Methanosarcinales</i>	98%	0	AY457661.1	CASTRO; OGRAM; REDDY, 2004.	<i>Archaea</i> - Pântano
VZP3-AC02	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP3-AC03	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039533.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-AC05	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP3-AC06	<i>Archaea</i>	86%	4,00E-122	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP3-AC07	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-AC08	<i>Euryarchaeota</i>	87%	6,00E-150	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP3-AC09	<i>Euryarchaeota</i>	86%	6,00E-165	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP3-AC10	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP3-AC11	<i>Crenarchaeota</i>	99%	0	AM039532.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-AC12	<i>Euryarchaeota</i>	99%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP3-AD01	<i>Euryarchaeota</i>	97%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP3-AD03	<i>Thermoprotei</i>	98%	0	U81774.2	GODON et al., 1997.	<i>Archaea</i> - Biodigestor anaeróbio
VZP3-AD06	<i>Euryarchaeota</i>	95%	0	DQ004704.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP3-AD07	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AM039532.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-AD08	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-AD09	<i>Euryarchaeota</i>	99%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP3-AD10	<i>Euryarchaeota</i>	99%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP3-AD11	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP3-AD12	<i>Euryarchaeota</i>	97%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP3-AE01	<i>Methanosarcinales</i>	98%	0	AY457661.1	CASTRO; OGRAM; REDDY, 2004.	<i>Archaea</i> - Pântano
VZP3-AE02	<i>Euryarchaeota</i>	89%	7,00E-110	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP3-AE03	<i>Euryarchaeota</i>	86%	1,00E-151	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP3-AE06	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP3-AE07	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(Continuação)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
VZP3-AE08	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ336957.1	GIHRING; MOSER; ONSTOTT, 2006. np.	<i>Archaea</i> - Água de subsuperfície
VZP3-AE09	<i>Euryarchaeota</i>	88%	8,00E-164	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP3-AE10	<i>Euryarchaeota</i>	86%	5,00E-141	DQ522931.1	KENDALL et al., 2007.	<i>Archaea</i> metanogênica - Sedimento marinho
VZP3-AE11	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP3-AE12	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP3-AF01	<i>Euryarchaeota</i>	92%	4,00E-127	DQ301894.1	CADILLO-QUIROZ et al., 2006.	<i>Archaea</i> metanogênica - Solos turfosos
VZP3-AF02	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP3-AF03	<i>Euryarchaeota</i>	99%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP3-AF04	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-AF05	<i>Methanomicrobia</i>	98%	0	AB161329.1	KASAI et al., 2005.	<i>Archaea</i> - Solo contaminado por petróleo
VZP3-AF06	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-AF07	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP3-AF08	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ336957.1	GIHRING; MOSER; ONSTOTT, 2006. np.	<i>Archaea</i> - Água de subsuperfície
VZP3-AF09	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039532.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-AF10	<i>Euryarchaeota</i>	97%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP3-AF11	<i>Archaea</i>	88%	0	AY800214.1	LAUER; SOERENSEN; TESKE, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Sedimento Marinho
VZP3-AF12	<i>Archaea</i>	98%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP3-AG01	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AM039532.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-AG02	<i>Archaea</i>	96%	0	AY917219.1	GOMEZ-ALVAREZ; NUSSLEIN, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Sedimento vulcânico
VZP3-AG03	<i>Archaea</i>	97%	0	AY917219.1	GOMEZ-ALVAREZ; NUSSLEIN, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Sedimento vulcânico
VZP3-AG04	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ583423.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Archaea</i> - Mina de urânio
VZP3-AG05	<i>Euryarchaeota</i>	87%	2,00E-154	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP3-AG06	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP3-AG07	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-AG09	ND	98%	1,00E-122	DQ336962.1	GIHRING; MOSER; ONSTOTT, 2006. np.	<i>Archaea</i> - Água de subsuperfície

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(Continuação)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
VZP3-AG11	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP3-AG12	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039533.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-AH01	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-AH02	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-AH03	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP3-AH04	<i>Archaea</i>	97%	0	EF032792.1	BROWN et al., 2006. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Sedimento vulcânico
VZP3-AH05	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-AH06	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-AH07	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-AH08	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP3-AH09	<i>Euryarchaeota</i>	87%	6,00E-160	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP3-AH10	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039533.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-AH11	<i>Euryarchaeota</i>	86%	1,00E-146	DQ522931.1	KENDALL et al., 2007.	<i>Archaea</i> metanogênica - Sedimento marinho
VZP3-AH12	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BA01	<i>Euryarchaeota</i>	94%	0	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP3-BA02	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BA03	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039533.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BA04	<i>Euryarchaeota</i>	86%	1,00E-122	AY835423.2	DHILLON et al., 2005.	<i>Archaea</i> metanogênica - Sedimento hidrotermal
VZP3-BA05	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP3-BA06	<i>Archaea</i>	99%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP3-BA07	<i>Methanosarcinales</i>	98%	0	AY457661.1	CASTRO; OGRAM; REDDY, 2004.	<i>Archaea</i> - Pântano
VZP3-BA08	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP3-BA09	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BA10	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP3-BA11	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(Continuação)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
VZP3-BA12	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BB01	ND	86%	3,00E-123	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP3-BB02	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BB03	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP3-BB04	<i>Methanosarcinales</i>	98%	0	AY457661.1	CASTRO; OGRAM; REDDY, 2004.	<i>Archaea</i> - Pântano
VZP3-BB05	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP3-BB06	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BB07	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BB08	<i>Euryarchaeota</i>	87%	6,00E-150	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP3-BB09	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BB10	<i>Euryarchaeota</i>	99%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP3-BB11	<i>Euryarchaeota</i>	87%	4,00E-147	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP3-BC01	<i>Archaea</i>	98%	2e-143	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP3-BC02	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BC03	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BC05	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP3-BC06	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BC07	<i>Euryarchaeota</i>	87%	1,00E-146	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP3-BC08	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BC09	<i>Archaea</i>	99%	0	AB182723.1	LIU et al., 2005. np.	<i>Archaea</i> - Solo de arroz
VZP3-BC10	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BC11	<i>Methanosarcinales</i>	92%	2,00E-159	AB161329.1	KASAI et al., 2005.	<i>Archaea</i> - Solo contaminado por petróleo
VZP3-BC12	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BD01	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ583423.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Archaea</i> - Mina de urânio
VZP3-BD02	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(Continuação)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
VZP3-BD03	<i>Euryarchaeota</i>	87%	1,00E-137	DQ522931.1	KENDALL et al., 2007.	<i>Archaea</i> metanogênica - Sedimento marinho
VZP3-BD05	ND	92%	3,00E-158	DQ004704.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP3-BD06	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BD07	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ583423.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Archaea</i> - Mina de urânio
VZP3-BD08	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BD09	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BD10	<i>Archaea</i>	99%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP3-BD11	<i>Thermoprotei</i>	100%	0	AM039532.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BD12	<i>Archaea</i>	99%	7,00E-120	DQ190087.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP3-BE01	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BE02	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039531.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BE03	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BE05	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP3-BE07	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BE08	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BE09	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP3-BE11	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BE12	ND	98%	9,00E-104	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BF02	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP3-BF03	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BF04	<i>Archaea</i>	100%	0	AM039532.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BF05	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039533.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BF06	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP3-BF07	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BF08	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(Continuação)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
VZP3-BF10	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP3-BF11	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP3-BG01	<i>Euryarchaeota</i>	87%	3,00E-158	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP3-BG02	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BG03	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP3-BG04	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP3-BG05	<i>Euryarchaeota</i>	87%	8,00E-139	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP3-BG06	<i>Euryarchaeota</i>	95%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP3-BG07	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BG08	<i>Archaea</i>	86%	1,00E-107	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP3-BG09	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BG10	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BG11	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BG12	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BH02	<i>Crenarchaeota</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BH03	<i>Euryarchaeota</i>	93%	0	DQ004704.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP3-BH05	<i>Euryarchaeota</i>	86%	1,00E-147	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP3-BH06	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BH07	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BH08	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039531.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP3-BH09	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP3-BH10	<i>Euryarchaeota</i>	87%	3,00E-148	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP3-BH11	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP3-BH12	<i>Archaea</i>	98%	5,00E-96	EF032793.1	BROWN et al., 2006. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Sedimento vulcânico
VZP4-AA01	<i>Archaea</i>	99%	0	AY186066.1	NORTHUP et al., 2003.	<i>Archaea</i> - Depósito de ferro-manganês

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(Continuação)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
VZP4-AA02	<i>Methanosarcinaceae</i>	97%	0	AB161329.1	KASAI et al., 2005.	<i>Archaea</i> - Solo contaminado por petróleo
VZP4-AA03	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-AA04	<i>Euryarchaeota</i>	97%	0	DQ004729.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP4-AA07	<i>Euryarchaeota</i>	87%	2,00E-161	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-AA08	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP4-AA09	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-AA10	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AM039532.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-AA11	<i>Euryarchaeota</i>	99%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP4-AA12	<i>Euryarchaeota</i>	88%	2,00E-106	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-AB01	<i>Euryarchaeota</i>	85%	4,00E-124	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-AB02	<i>Euryarchaeota</i>	97%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP4-AB03	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039532.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-AB04	<i>Archaea</i>	97%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP4-AB07	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP4-AB08	<i>Euryarchaeota</i>	87%	2,00E-161	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-AB09	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-AB10	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-AB11	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-AB12	<i>Archaea</i>	99%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP4-AC01	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP4-AC02	<i>Euryarchaeota</i>	86%	2,00E-166	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-AC03	<i>Archaea</i>	98%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP4-AC04	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-AC07	<i>Euryarchaeota</i>	96%	0	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-AC08	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(Continuação)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
VZP4-AC09	<i>Euryarchaeota</i>	99%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP4-AC10	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-AC11	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP4-AC12	<i>Euryarchaeota</i>	94%	0	DQ004704.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP4-AD01	<i>Archaea</i>	96%	1,00E-144	EF430995.1	FIERER, 2007. np.	<i>Archaea</i> - Solo
VZP4-AD02	<i>Euryarchaeota</i>	99%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP4-AD03	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-AD07	<i>Archaea</i>	95%	0	AY917219.1	GOMEZ-ALVAREZ; NUSSLEIN, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Sedimento vulcânico
VZP4-AD08	<i>Euryarchaeota</i>	87%	2,00E-161	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-AD09	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP4-AD10	<i>Euryarchaeota</i>	87%	2,00E-161	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-AD12	<i>Euryarchaeota</i>	87%	2,00E-161	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-AE01	<i>Archaea</i>	97%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP4-AE02	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP4-AE03	<i>Euryarchaeota</i>	86%	3,00E-115	AY835423.2	DHILLON et al., 2005.	<i>Archaea</i> metanogênica - Sedimento hidrotermal
VZP4-AE04	<i>Archaea</i>	98%	3,00E-170	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-AE07	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP4-AE08	<i>Archaea</i>	92%	0	AJ428031.1	KATAINEN et al., 2004. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Húmos floresta de coníferas
VZP4-AE09	<i>Euryarchaeota</i>	84%	7,00E-120	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-AE10	<i>Archaea</i>	99%	0	AY186066.1	NORTHUP et al., 2003.	<i>Archaea</i> - Depósito de ferro-manganês
VZP4-AE11	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP4-AE12	<i>Euryarchaeota</i>	96%	0	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-AF01	<i>Thermoprotei</i>	88%	0	AY861950.1	SPEAR et al., 2005.	<i>Crenarchaeota</i> - Ecossistema Geotermal
VZP4-AF02	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-AF03	<i>Euryarchaeota</i>	87%	2,00E-161	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(Continuação)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
VZP4-AF04	<i>Euryarchaeota</i>	97%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP4-AF07	<i>Crenarchaeota</i>	99%	3,00E-170	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-AF08	<i>Euryarchaeota</i>	97%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP4-AF09	<i>Thermoprotei</i>	99%	3,00E-170	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-AF10	<i>Thermoprotei</i>	99%	3,00E-170	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-AF11	<i>Archaea</i>	97%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP4-AF12	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP4-AG01	<i>Euryarchaeota</i>	86%	9,00E-144	DQ522931.1	KENDALL et al., 2007.	<i>Archaea</i> metanogênica - Sedimento marinho
VZP4-AG02	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-AG03	<i>Archaea</i>	99%	3,00E-170	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-AG04	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-AG07	<i>Euryarchaeota</i>	86%	2,00E-131	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-AG08	<i>Archaea</i>	86%	5,00E-148	DQ522931.1	KENDALL et al., 2007.	<i>Archaea</i> metanogênica - Sedimento marinho
VZP4-AG09	<i>Euryarchaeota</i>	86%	8,00E-151	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-AG11	<i>Methanosarcinales</i>	99%	0	AY457661.1	CASTRO; OGRAM; REDDY, 2004.	<i>Archaea</i> - Pântano
VZP4-AG12	<i>Euryarchaeota</i>	86%	2,00E-167	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-AH01	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-AH02	<i>Archaea</i>	87%	1,00E-159	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-AH03	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP4-AH07	<i>Methanosarcinales</i>	99%	0	AB236115.1	SAKAI et al., 2005. np.	<i>Methanomicrobia</i> - Ambientes anaeróbios
VZP4-AH08	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP4-AH09	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP4-AH10	<i>Euryarchaeota</i>	87%	2,00E-161	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-AH11	<i>Crenarchaeota</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP4-AH12	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(Continuação)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
VZP4-BA01	<i>Archaea</i>	99%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP4-BA02	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BA03	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP4-BA04	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BA05	<i>Archaea</i>	97%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BA06	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP4-BA07	<i>Methanosarcinales</i>	98%	0	AB161346.1	KASAI et al., 2005.	<i>Archaea</i> - Solo contaminado por petróleo
VZP4-BA08	<i>Euryarchaeota</i>	94%	0	AF226268.1	CHELIUS; TRIPLETT, 2001.	<i>Archaea</i> - Rizosfera de milho
VZP4-BA09	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BA10	<i>Euryarchaeota</i>	88%	1,00E-164	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-BA11	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BA12	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BB01	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BB02	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP4-BB03	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BB04	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP4-BB05	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BB07	<i>Methanosarcinales</i>	98%	0	AY457661.1	CASTRO; OGRAM; REDDY, 2004.	<i>Archaea</i> - Pântano
VZP4-BB08	<i>Euryarchaeota</i>	97%	0	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-BB09	<i>Euryarchaeota</i>	97%	0	DQ004729.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP4-BB10	<i>Euryarchaeota</i>	87%	1,00E-159	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-BB11	<i>Archaea</i>	98%	0	EF446789.1	ONSTOTT, 2007.	<i>Archaea</i> - Mina de ouro
VZP4-BB12	<i>Euryarchaeota</i>	97%	0	DQ004729.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP4-BC01	<i>Archaea</i>	99%	0	AJ535119.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP4-BC02	<i>Euryarchaeota</i>	99%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(Continuação)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
VZP4-BC03	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BC04	<i>Euryarchaeota</i>	93%	0	DQ004704.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP4-BC05	<i>Euryarchaeota</i>	97%	3,00E-164	DQ004729.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP4-BC06	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BC07	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BC08	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP4-BC09	<i>Euryarchaeota</i>	97%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP4-BC10	<i>Euryarchaeota</i>	99%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP4-BC11	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AJ535119.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP4-BC12	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AM039532.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BD01	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP4-BD02	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BD03	<i>Euryarchaeota</i>	87%	1,00E-159	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-BD04	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BD05	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BD06	<i>Archaea</i>	99%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP4-BD07	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP4-BD08	<i>Euryarchaeota</i>	87%	1,00E-159	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-BD09	<i>Euryarchaeota</i>	95%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP4-BD10	<i>Euryarchaeota</i>	97%	0	DQ004729.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP4-BD11	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP4-BD12	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AJ535119.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP4-BE01	<i>Archaea</i>	99%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP4-BE02	<i>Euryarchaeota</i>	86%	2,00E-107	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-BE03	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(Continuação)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
VZP4-BE04	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP4-BE05	<i>Archaea</i>	99%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP4-BE06	<i>Archaea</i>	97%	1,00E-159	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-BE07	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BE08	<i>Methanosarcinaceae</i>	98%	0	EF446793.1	ONSTOTT, 2007.	<i>Archaea</i> - Mina de ouro
VZP4-BE09	<i>Euryarchaeota</i>	98%	0	DQ004722.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP4-BE10	<i>Archaea</i>	99%	3,00E-180	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP4-BE12	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BF01	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BF02	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039531.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BF03	<i>Archaea</i>	99%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP4-BF04	<i>Archaea</i>	99%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP4-BF05	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039531.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BF06	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039531.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BF07	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039531.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BF08	<i>Euryarchaeota</i>	99%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP4-BF09	<i>Euryarchaeota</i>	87%	1,00E-159	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-BF10	<i>Archaea</i>	94%	0	AY278090.1	OCHSENREITER, et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo
VZP4-BF11	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP4-BF12	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP4-BG01	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BG02	<i>Euryarchaeota</i>	87%	1,00E-159	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-BG03	<i>Euryarchaeota</i>	86%	2,00E-107	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-BG04	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP4-BG05	<i>Archaea</i>	99%	0	U62815.1	BINTRIM et al., 1997.	<i>Crenarchaeota</i> - Solo

Tabela 18 - Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de 16S rDNA de *Archaea* encontradas em solo de várzea amazônica (Santarém-PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

(Conclusão)

Seqüência	Classificação	ID%	e-value	Acesso	Autor	Organismo - Ambiente
VZP4-BG06	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BG07	<i>Euryarchaeota</i>	86%	6,00E-107	AY396007.1	ROLING et al., 2004.	<i>Archaea</i> - Sedimento marinho
VZP4-BG08	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP4-BG09	<i>Euryarchaeota</i>	87%	5,00E-138	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-BG10	<i>Euryarchaeota</i>	99%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP4-BG11	<i>Thermoprotei</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BG12	<i>Euryarchaeota</i>	87%	7,00E-166	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-BH01	<i>Euryarchaeota</i>	86%	1,00E-128	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-BH02	<i>Euryarchaeota</i>	97%	0	DQ004703.1	GATTINGER et al., 2007.	<i>Euryarchaeota</i> - Solo
VZP4-BH03	<i>Euryarchaeota</i>	87%	5,00E-148	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-BH04	<i>Euryarchaeota</i>	86%	8,00E-146	AY217535.1	CHELIUS; MOORE, 2004.	<i>Euryarchaeota</i> - Sedimento calcáreo
VZP4-BH05	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BH06	<i>Methanosarcinales</i>	98%	0	AY457661.1	CASTRO; OGRAM; REDDY, 2004.	<i>Archaea</i> - Pântano
VZP4-BH07	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP4-BH08	<i>Archaea</i>	98%	0	AJ535120.1	SELENSKA-POBELL et al., 2003. np.	<i>Crenarchaeota</i> - Mina de urânio
VZP4-BH09	<i>Archaea</i>	98%	0	DQ190069.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005. np.	<i>Archaea</i> - Aquífero
VZP4-BH10	<i>Archaea</i>	99%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BH11	<i>Archaea</i>	98%	0	AM039534.1	WEIDLER et al., 2007.	<i>Crenarchaeota</i> - Fonte termal
VZP4-BH12	<i>Archaea</i>	98%	0	AY820221.1	ZHANG, et al., 2005. np.	<i>Archaea</i> - Rocha em subsuperfície

Classificação: Menor táxon definido pelo RDP Classifier do RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) com nível máximo de restrição (Confidence threshold - 95%); ID%: Valor de identidade entre as seqüências estudadas e a de maior similaridade no banco de dados; e-value: e-value entre as seqüências estudadas e a de maior similaridade no banco de dados; Acesso: Número de acesso da seqüência de maior similaridade no banco de dados; Autor: Autor do trabalho do qual se originou a seqüência de maior similaridade no banco de dados; ND: Não determinado; VZP1: Várzea profundidade 1(00-20 cm); VZP2: Várzea profundidade 2 (20-40 cm); VZP3: Várzea profundidade 3 (40-70 cm); VZP4: Várzea profundidade 4 (70-100 cm).

Na tabela 19 são apresentadas as estimativas de riqueza de UTOs, os índices de diversidade e a estimativa de cobertura de amostragem. As distâncias evolutivas (D) escolhidas para a definição de UTOs (espécies) neste trabalho foi de 0,01 e 0,03. As estimativas de riqueza de UTOs pelos métodos não-paramétricos ACE e Chao1 mostram que não houve diferença significativa (intervalo de confiança de 95% de probabilidade) entre as profundidades amostradas: 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4), tanto para D= 0,01, quanto para D= 0,03 . Também os índices de Shannon indicam não haver diferença significativa entre as bibliotecas. Entretanto, observa-se que na camada VZP3 há uma diminuição do número de UTOs em relação as demais profundidades analisadas. O número estimado de espécies de *Archaea*, considerando-se D= 0,03 foi de 58,4, 62,6, 37,4, e 61,1, para VZP1, VZP2, VZP3 e VZP4, respectivamente. Ainda considerando a distância evolutiva de 0,03, o número total de espécies do solo de várzea foi de 141,3. Os baixos valores da recíproca do índice de Simpson observados para todas as profundidades indicam que não ocorrem UTOs dominantes dentro da comunidade microbiana. Os valores dos índices de cobertura de amostragem das bibliotecas de 16S rDNA VZP1, VZP2, VZP3 e VZP4 para uma distância evolutiva de 0,03 foram de 85%, 91%, 95% e 90%, respectivamente.

Tabela 19 - Índices de diversidade de *Archaea* e estimativas de número de UTOs e cobertura de amostragem para as amostras de solo de várzea amazônica (Santarém - PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4)

Comunidade	NS	NU	Estimativa de UTOs		Índices de Diversidade		ECA
			ACE	Chao1	Shannon	1/D	
D = 0,01							
VZP1	129	50	87,2 (66,0; 136,5)	128,4 (76,6; 281,1)	3,5 (3,3; 3,6)	22,1 (14,11; 67,1)	0,783
VZP2	201	55	100,0 (75,7; 152,9)	107,1 (73,8; 199,2)	3,4 (3,2; 3,5)	20,1 (13,9; 36,0)	0,866
VZP3	169	44	60,8 (50,5; 87,7)	84,5 (55,7; 184,6)	3,2 (3,2; 3,5)	20,9 (15,3; 33,1)	0,893
VZP4	170	47	100,3 (69,6; 172,7)	131,5 (73,6; 315,4)	3,3 (3,1; 3,4)	21,8 (16,7; 31,5)	0,847
VZ	669	149	292,9 (237,3; 383,6)	318,0 (238,1; 469,7)	4,2 (4,1; 4,3)	35,6 (24,6; 64,4)	0,883
D = 0,03							
VZP1	129	36	58,4 (44,3; 96,3)	81,1 (49,2; 190,4)	2,7 (2,5; 2,9)	7,6 (5,1; 15,1)	0,853
VZP2	201	40	62,6 (48,8; 97,7)	80,5 (51,7; 180,6)	2,7 (2,5; 2,9)	7,1 (4,62; 15,2)	0,910
VZP3	169	29	37,4 (31,5; 57,0)	37,1 (30,8; 64,6)	2,7 (2,6; 2,9)	10,1 (7,5; 15,5)	0,947
VZP4	170	37	61,1 (46,1; 100,9)	61,1 (44,3; 116,0)	2,9 (2,7; 3,0)	11,5 (7,8; 21,5)	0,900
VZ	669	93	141,3 (117,9; 186,5)	161,4 (121,4; 257,8)	3,6 (3,5; 3,7)	18,2 (12,8; 31,5)	0,945

VZP1: Várzea profundidade 1(00-20 cm); VZP2: Várzea profundidade 2 (20-40 cm); VZP3: Várzea profundidade 3 (40-70 cm); VZP4: Várzea profundidade 4 (70-100 cm); VZ: Todas as seqüências do solo de várzea. NS: Número de seqüências. NU: Número de Utos determinado pelo programa DOTUR. ACE: Estimador de riqueza (*Abundance-based Coverage Estimator*). Chao1: Estimador de riqueza. Shannon: Estimador de máxima semelhança. 1/D: Recíproco do índice de Simpson (estimador de máxima semelhança). ECA: Estimativa de cobertura de amostragem. Valores entre parênteses representam o intervalo com 95% de confiança.

As curvas de rarefação foram obtidas pela relação entre o número de filotipos (UTOs), agrupados a 97% de similaridade, e o número de clones analisados (Figura 35). As curvas ascendentes verificadas nas bibliotecas VZP1, VZP2 e VZP4 indicam que um maior número de clones deveria ser analisado para obter-se uma completa amostragem da diversidade de *Archaea* nestas camadas (Figuras 35a, 35b e 35d). O declínio na curva de rarefação para a biblioteca de 16S rDNA VZP3 (Figura 35c) indica que nesta profundidade a maior parte da diversidade foi detectada. Estes resultados confirmam os dados de estimativa de cobertura de amostragem (ECA) (Tabela 19), onde a camada VZP3 obteve cerca de 95% de cobertura de amostragem, enquanto os menores valores foram observados para VZP1 e VZP4, com 85% e 90%, respectivamente. Contudo, os índices de cobertura de amostragem foram considerados elevados para todas as bibliotecas analisadas, variando de 85% a 95% ($D=0,03$) (Tabela 19).

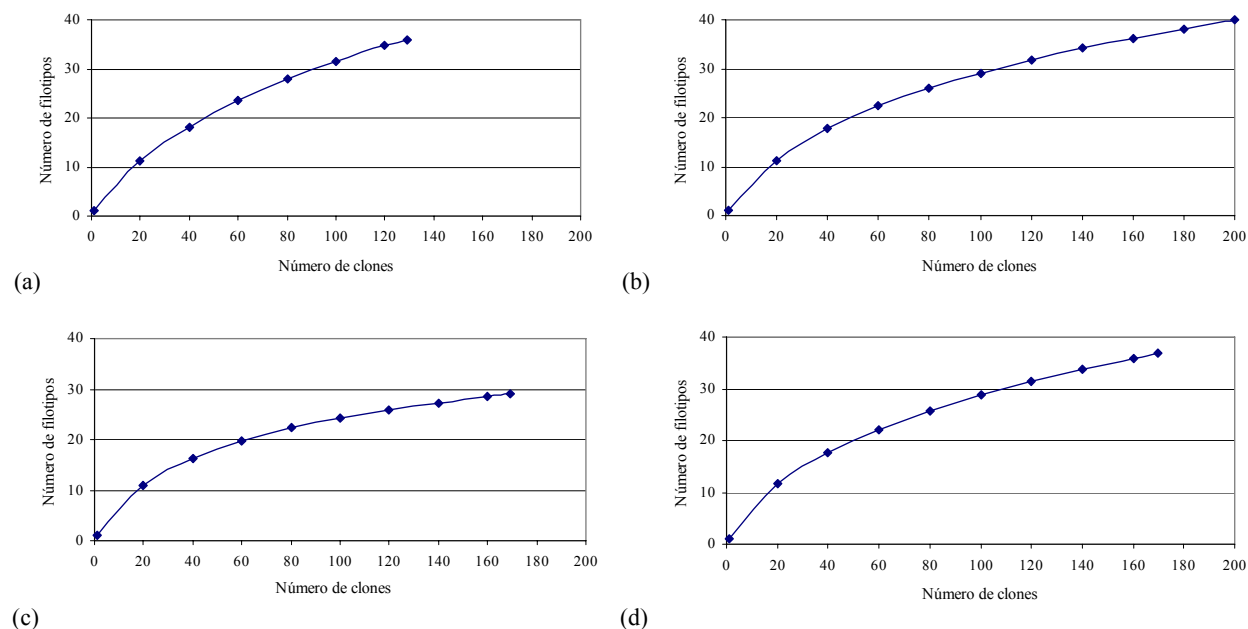


Figura 35 - Curva de rarefação gerada do gene 16S rRNA das bibliotecas de clones de solo de várzea amazônica (Santarém - PA), nas profundidades: a) 00-20 cm (VZP1); b) 20-40 cm (VZP2); c) 40-70 cm (VZP3); e d) 70-100 cm (VZP4)

Na figura 36 são mostrados os números de filotipos estimados para diferentes distâncias evolutivas das bibliotecas VZP1, VZP2, VZP3 e VZP4. Os dados indicam que a estimativa de riqueza de UTO das camadas VZP1, VZP2 e VZP4 não diferiram estatisticamente independente da distância evolutiva. Já para VZP3, a riqueza de UTOs foi significativamente menor que os demais para $D=0,05$.

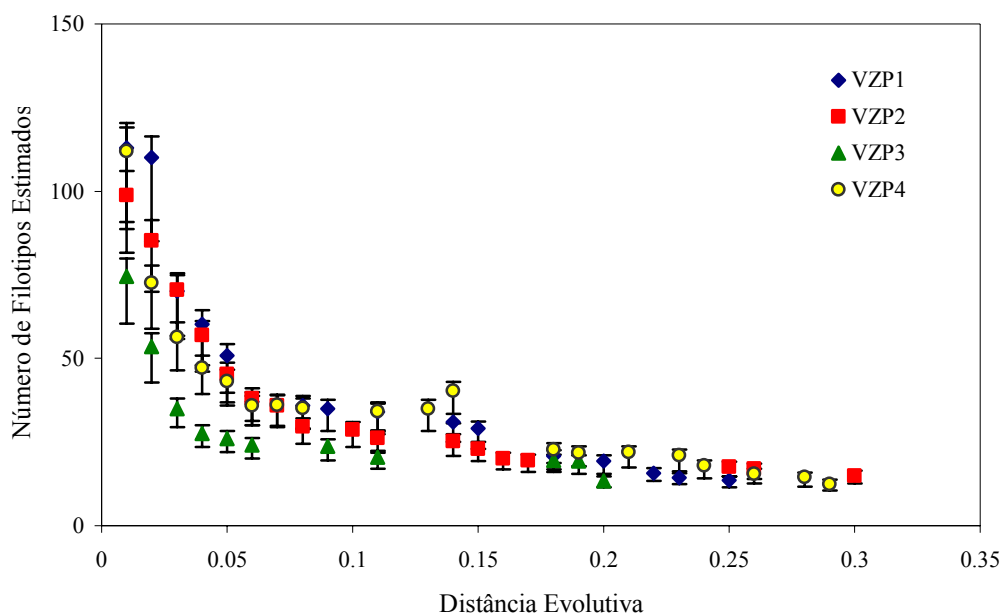


Figura 36 - Número de filotipos de *Archaea* estimado para diferentes distâncias evolutivas em solo de várzea amazônica (Santarém - PA), nas profundidades 00-20 cm (VZP1), 20-40 cm (VZP2), 40-70 cm (VZP3) e 70-100 cm (VZP4). Dados estimados com o estimador não-paramétrico Chao1. As barras representam os intervalos de confiança (95% de probabilidade)

As comparações múltiplas das bibliotecas de clones de 16S rDNA feitas pelo programa S-Libshuff são apresentadas na tabela C. Os resultados indicam que a comunidade de arqueias nas diferentes camadas estudadas são significativamente diferentes, já que os valores de 'p' calculados foram de 0,0000 para a comparação das curvas de cobertura homólogas de VZP1, VZP2, VZP3 e VZP4 (valores de 'p' mínimos de 0,0005 para 1% de probabilidade).

Tabela 20 - Valores de 'p' calculado nas comparações múltiplas entre bibliotecas de 16S rDNA das comunidades de *Archaea* usando o programa S-libshuff

X	Y			
	VZP1	VZP2	VZP3	VZP4
VZP1	-	0,0000	0,0000	0,0000
VZP2	0,0000	-	0,0000	0,0000
VZP3	0,0000	0,0000	-	0,0000
VZP4	0,0000	0,0000	0,0000	-

VZP1: Várzea profundidade 1 (00-20 cm); VZP2: Várzea profundidade 2 (20-40 cm); VZP3: Várzea profundidade 3 (40-70 cm); VZP4: Várzea profundidade 4 (70-100 cm). X: Comparação das curvas de cobertura X homóloga, na coluna. Y: Comparação das curvas de cobertura Y homóloga, na linha. Valores de 'p' para diferença significativa: 'p' ≤ 0,05.

Estudos sobre a diversidade de *Archaea* em ambientes tropicais ainda são escassos (DONOVAN et al., 2004; WINTER et al., 2004). No Brasil, até o momento são relatados dois recentes trabalhos sobre a diversidade de *Archaea*, um deles foi realizado em ambiente estuarino localizado no litoral sul do Estado de São Paulo, na Ilha do Cardoso, pela análise de 279 seqüências de 16S rDNA, por Cury (2006). O segundo trabalho analisou a diversidade de *Archaea* em quatro diferentes ambientes: água do mar, solo agrícola, sedimento marinho e estação de tratamento de esgoto, todos localizados no estado do Rio de Janeiro, em um total de 123 seqüências de 16S rDNA e análise da região inter-gênica 16S-23S (CLEMENTINO et al., 2006). Na região Amazônica dados de diversidade microbiana são ainda mais escassos. A Amazônia possui diversos tipos de solos, e poucos deles têm sido caracterizados quanto a sua microbiologia. Apenas dois trabalhos tratam da diversidade bacteriana em solos amazônicos (BORNEMAN; TRIPLETT, 1997; KIM et al., 2007). Este é o primeiro trabalho sobre a diversidade de *Archaea* na região amazônica, solo de várzea.

3 CONCLUSÕES

- ❖ Foi detectada atividade metanogênica em todos os nove solos estudados - várzea (3), Terra Preta (2), solo adjacente à Terra Preta (2), Terra Mulata (1) e adjacente À Terra Mulata (1); entretanto, esta foi significativamente superior nos solos de várzea;
- ❖ Dentre os doze cultivos de arqueias metanogênicas estudados, em dez foram identificadas predominantemente como pertencentes ao gênero *Methanobacterium* sp. e dois como *Methanosarcina* sp.:
 - O uso da técnica de ARDRA permitiu diferenciar culturas de arqueias metanogênicas ao nível de gênero, e foi eficiente para a verificação da pureza das culturas;
 - O seqüenciamento do gene 16S rRNA de *Archaea* dos clones das culturas metanogênicas revelou a existência de dois gêneros de arqueias metanogênicas, um deles classificado pelo RDP Classifier como *Methanobacterium*, e com similaridade pelo Blast a espécie de *Methanobacterium* sp. isolada do trato digestivo de cupins de ambientes tropicais; e o segundogênero classificado como *Methanosarcina*, a presentando similaridade a *Methanosarcina lacustris*, isolada de sedimento de lago;
- ❖ Quatro bibliotecas do gene 16S rRNA de *Archaea* geraram 669 clones de solo de várzea (Várzea 3), e revelaram a baixa diversidade de *Archaea* neste ambiente:
 - A maior parte das seqüências analisadas apresentou similaridade com sequencias encontradas em ambientes correlatos à várzea, como solos e sediemntos de água doce;
 - Grande parte das seqüências classificadas como *Crenarchaeota* apresentaram similaridade a seqüências detectadas em fontes termais;
 - Cerca de 75% das seqüências classificadas como *Euryarchaeota* pertencem À família *Methanosarcinales*, mostrando a dominância deste grupo de metanogênicas nesta várzea analisada (Várzea 3). Também na várzea 3 foram obtidos dois cultivos de *Methanosarcina* sp., conforme confirmado pelo seqüenciamento do gene 16S rRNA;
- ❖ As imagens de microscopia de contraste de fase e microscopia eletrônica de varredura mostraram que as culturas estão elevadamente purificadas, e apresentam predominantemente células em foram de bacilos, semelhantes ao gênero *Methanobacterium* sp..

REFERÊNCIAS

- ADASHI, K. Isolation of hydrogenotrophic methanogenic archaea from a subtropical paddy field. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 30, p. 77–85, 1999.
- ALLMANSBERGER, R., BOLLSCHWEILER, C., KONHEISER, U., MULLER, B., MUTH, E., PASTI, G.; KLEIN, A. Arrangement and expression of methyl CoM reductase genes in *Methanococcus voltae*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 7, p. 13-17, 1986.
- ALVALÁ, P. C.; KIRCHHOFF, W. V. J. H.; PAVÃO, H. G. Metano na Atmosfera. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Uberlândia, v. 7, p. 40-43, 1999.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W. Ribosomal RNA - Targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **Microbiology Reviews**, New York, v. 24, p. 555-565, 2000.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**, New York, v.59, p.143-169, 1995.
- ARAKAWA, S.; SATO, T.; SATO, R.; ZHANG, J.; GAMO, T.; TSUNOGAI, U.; HIROTA, A.; YOSHIDA, Y.; USAMI, R.; INAGAKI, F.; KATO, C. Molecular phylogenetic and chemical analyses of the microbial mats in deep-sea cold seep sediments at the northeastern Japan Sea. **Extremophiles**, Berlin, v.10, p. 311-319, 2006.
- BADRA, R.J. **Isolamento e caracterização de bactérias metanogênicas de um aterro sanitário experimental**. 1993. 174 p. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1993.
- BALCH, W.E.; WOLFE, R.S. New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanosulphonic acid (HS-CoM)-dependent growth of *Methanobacterium ruminatum* in a pressurized atmosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 32, p. 781-791, 1976.
- BALCH, W.E.; FOX, G.E.; MAGRUM, L.J.; WOESE, C.R.; WOLFE, R.S. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. **Microbiology Reviews**, Washington, 43: 260-296, 1979.
- BARBOSA, H.R.; TORRES, B.B. **Microbiologia básica**. São Paulo: Editora Atheneu, 1999. 196 p.
- BARNS, S. M., DELWICHE, C. F., PALMER, J. D., PACE, N. R. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. **Microbiology**, Reading, v. 93, p. 9188-9193, 1996.
- BARTLETT, K.B., HARRIS, R.C. Review and assessment of methane emission from wetlands. **Chemosphere**, Oxford, v. 26, p. 261-320, 1993.

- BERGMAN, I.; KLARQVIST, M.; NILSSON, M. Seasonal variation in rates of methane production from peat of various botanical origins: effects of temperature and substrate quality. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 33, p. 181–189, 2000.
- BINTRIM, S.B.; DONOHUE, T.J.; HANDELSMAN, J.; ROBERTS, G.P.; GOODMAN, R.M. Molecular phylogeny of *Archaea* from soil. **The Proceedings of the National Academic of Science of the U.S.A.**, Washington, v. 94, p. 277-282, 1997.
- BIRD, M.I., MOYO, C., VEENENDAAL, E.M., LLOYD, J., FROST, P. Stability of elemental carbon in a savanna soil. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, v. 13, p. 923-932, 1999.
- BLAUT, M. Metabolism of methanogens. **Antonie von Leeuwenhock**, Amsterdam, v. 66, p. 187-208, 1994.
- BOHANNAN, B.J.M.; HUGHES J. New approaches to analyzing microbial biodiversity data. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 6, p. 282–287, 2003.
- BOKRANZ, M., BAUMNER, G., ALLMANSBERGER, R., ANKEL-FUCHS, D. & KLEIN, A. Cloning and characterization of the methyl coenzyme M reductase genes from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. **Journal Bacteriology**, Baltimore, v. 170, p. 568-577, 1988.
- BORNERMAN, J.; TRIPLETT, E.W. Molecular diversity in soils from eastern amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 2647-2653, 1997.
- BREAS, O.; GUILLOU, C.; RENIERO, F.; WADA, E. The global methane cycle: Isotopes and mixing ratios, sources and sinks. **Isotopes in Environmental and Health Studies**, Oxon, v. 37, p. 257-379, 2002.
- BRYANT, M.P. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 25, p. 1324-1328, 1972.
- BRYANT, M.P. **Methane producing bacteria**. In: BERGEY'S Manual of determinative bacteriology. 8th ed. Ed. New York. BUCHANAN, R.E.; GIBBONS, N.E. p. 472-477, 1974.
- BUCKLEY, D. H., J. R. GRABER, T. M. SCHMIDT. Phylogenetic analysis of nonthermophilic members of the Kingdom *Crenarchaeota* and their diversity and abundance in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, p. 4333-4339, 1998.
- CADILLO-QUIROZ, H.; BRAUER, S.; YASHIRO, E.; SUN, C.; YAVITT, J.; ZINDER, S. Vertical profiles of methanogenesis and methanogens in two contrasting acidic peatlands in central New York State, USA. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, p. 1428-1440, 2006.
- CANHOS, V.P.; VAZOLLER, R.F. **Biodiversidade do Estado de São Paulo: Microorganismos & Vírus**. FAPESP, 1999, p.3-23.

- CASTRO, H.; OGRAM, A.; REDDY, K.R. Phylogenetic characterization of methanogenic assemblages in eutrophic and oligotrophic areas of the Florida Everglades. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 70, p. 6559-6568, 2004.
- CHELIUS, M.K.; MOORE, J.C. Molecular phylogenetic analysis of Archaea and Bacteria in Wind Cave, South Dakota. **Geomicrobiology Journal**, Oxford, v. 21, p. 123-134, 2004.
- CHAO, A.; LEE, S. M. Estimating the number of classes via sample coverage. **Journal of the American Statistical Association**, Alexandria, v. 87, p. 210–217. 1992.
- CHAO, A.; SHEN, T.J.; HWANG, W. Application of laplace's boundary-mode approximations to estimate species and shared species richness. **Australian & New Zealand Journal of Statistics**, Melbourne, v. 48, n. 2, p. 117–128, 2006.
- CHAUHAN, A.; REDDY, K.R.; OGRAM, A.V. Syntrophic-archaeal associations in a nutrient-impacted freshwater marsh. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, p. 73-84, 2006.
- CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. The Diversity of Archaea and Bacteria in Association with the Roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, p. 252-263, 2001.
- CLEMENTINO, M.M.; FERNANDES, C.C.; VIEIRA, R.P.; CARDOSO, A.M.; POLYCARPO, C.R.; MARTINS, O.B. Archaeal diversity in naturally occurring and impacted environments from a tropical region. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. in press, p. 1, 2006.
- COLE, J. R.; CHAI, B.; FARRIS, R. J.; WANG, Q.; KULAM, S. A.; MCGARRELL, D. M.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, p. 294–296, 2005.
- CONRAD, R. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 28, p. 193-202, 1999.
- CURY, J.C. **Diversidade de Bacteria e Archaea em solos de mangue e marisma**. 2006. 147 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- DAVIDSON, E. A.; ISHIDA, F.Y.; NEPSTAD, D.C. Effects of an experimental drought on soil emissions of carbon dioxide, methane, nitrous oxide, and nitric oxide in a moist tropical forest. **Global Change Biology**, Oxon, v. 10, p. 718-730, 2004.
- DEEVONG, P.; HATTORI, S.; YAMADA, A.; TRAKULNALEAMSAI, S.; OHKUMA, M.; NOPARATNARAPORN, N.; KUDO, T. Isolation and Detection of Methanogens from the Gut of Higher Termites. **Microbes and Environments**, Tokyo, v. 19, p. 221-226, 2004.
- DeLONG, E. F. Archaea in coastal marine environments. **The Proceedings of the National Academic of Science of the USA**, Washington, v. 89, p. 5685–5689, 1992.

- DENEVAN, W. The aboriginal population of Amazonia. In: Denevan, W (Ed.). *The native population of the Americas in 1492*. Madison: University of Wisconsin Press. 1976. p.205-234.
- DEVOL, A.H.; RICHEY, J.E.; FORSBERG, B.R.; MARTINELLI, L.A. Seasonal dynamics in methane emissions from the Amazon River floodplain to the troposphere. **Journal of Geophysical Research**, Washington, v. 95, p. 16417-16426, 1990.
- DHILLON, A.; LEVER, M.; LLOYD, K.G.; ALBERT, D.B.; SOGIN, M.L.; TESKE, A. Methanogen diversity evidenced by molecular characterization of methyl coenzyme M reductase A (mcrA) genes in hydrothermal sediments of the Guaymas Basin. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 71, p. 4592-4601, 2005.
- DODDEMA, H.J; VOGELS, G. Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopic. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 36, p. 752-754, 1978.
- DONOVAN, S.E., PURDY, K.J., KANE, M.D.; EGGLETON, P. Comparison of Euryarchaea strains in the guts and food-soil of the soil-feeding termite *Cubitermes fungifaber* across different soil types. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 70, p. 3884–3892, 2004.
- EDWARDS, T.; McBRIDE, B.C. New method for the isolation and identification of methanogenic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 29, p. 540-545, 1975.
- EMBLEY, T.M.; FINLAT, B.J.; THOMAS, R.H.; DYAL, P.L. The use of rRNA sequences and fluorescent probes to investigate the phylogenetic positions of the anaerobic ciliate *Metopus palaeformis* and its archaeabacterial endosymbiont. **Journal of general Microbiology**, Reading, v. 138, p. 1479-1487, 1992.
- EMBRAPA. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos (Rio de Janeiro, RJ). **Levantamento de reconhecimento de média intensidade dos solos e avaliação de aptidão agrícola das terras da área do Pólo Tapajós**. Rio de Janeiro, 1983. 284 p. (EMBRAPA-SNLCS. Boletim de Pesquisa, 20).
- ERKEL, C.; KUBE, M.; REINHARDT, R.; LIESACK, W. Genome of Rice Cluster I archaea--the key methane producers in the rice rhizosphere. **Science**, Washington, v. 313, p. 370-372, 2006.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 186-194, 1998.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 175-185, 1998.
- ERWIN, T.L. A copa da floresta tropical: o coração da biodiversidade biológica. In: WILSON, E. O. (Ed.). **Biodiversidade**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. p. 158-165.

EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE. Disponível em:
<<http://www.ebi.ac.uk/index.html>>. Acesso em: 12 abril. 2007.

FALESI, I. C. **O estado atual dos conhecimentos sobre os solos da Amazônia brasileira**. In: Instituto de Pesquisa Agropecuária do Norte (Belém, PA). Zoneamento agrícola da Amazônia: 1ª aproximação. Belém, PA, 1972, p. 17-67. (IPEAN. Boletim Técnico, 54).

FALESI, I.C. **Estado atual de conhecimento de solos da Amazônia**. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, 1., 1986, Belém. Anais... p.168-191. Belém, PA: Embrapa-CPATU. 1986. v. 1, p. 168-191. (Embrapa-CPATU. Documentos, 36).

FEARNSIDE, P. M. Agriculture in Amazonia. In: PRANCE, G.T.; LOVEJOY, T.E. **Key Environments: Amazonia**. Oxford: Pergam Press, 1985. 442 p.

FERNANDEZ, A. S.; HASHSHAM, S. A.; DOLLHOPF, S. L.; RASKIN, L.; GLAGOLEVA, O.; DAZZO, F.; HICKEY, R. F.; CRIDDLE, C. S.; TIEDJE, J. M. Flexible community structure correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, n. 9, p. 4058-4067, 2000.

FERRY, J.G. Enzymology of One-carbon Reactions in Methanogenic Pathways. **FEMS Microbiological Reviews**, Amsterdam, v. 23, p. 12-38, 1999.

GALAGAN, J.E.; NUSBAUM, C.; ROY, A.; ENDRIZZI, M.G.; MACDONALD, P.; FITZHUGH, W.; CALVO, S.; ENGELS, R.; SMIRNOV, S.; ATNOOR, D.; BROWN, A.; ALLEN, N.; NAYLOR, J.; STANGE-THOMANN, N.; DEARELLANO, K.; JOHNSON, R.; LINTON, L.; MCEWAN, P.; MCKERNAN, K.; TALAMAS, J.; TIRRELL, A.; YE, W.; ZIMMER, A.; BARBER, R.D.; CANN, I.; GRAHAM, D.E.; GRAHAME, D.A.; GUSS, A.; HEDDERICH, R.; INGRAM-SMITH, C.; KUETTNER, C.H.; KRZYCKI, J.A.; LEIGH, J.A.; LI, W.; LIU, J.; MUKHOPADHYAY, B.; REEVE, J.N.; SMITH, K.; SPRINGER, T.A.; UMayAM, L.A.; WHITE, O.; WHITE, R.H.; DE MACARIO, E.C.; FERRY, J.G.; JARRELL, K.F.; JING, H.; MACARIO, A.J.L.; PAULSEN, I.; PRITCHETT, M.; SOWERS, K.R.; SWANSON, R.V.; ZINDER, S.H.; LANDER, E.; METCALF, W.W.; BIRREN, B. The Genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. **Genome Research**, Stanford, v. 12, p. 532-542, 2002.

GALAND, P.E. **Methanogenic Archaea in boreal peatlands**. 2004. (Dissertation in General Microbiology). University of Helsinki, 2004. 35 p.

GALAND, P.E.; JUOTTONEM, H.; FRITZE, H.; YRJÄLÄ, K. Methanogen communities in a drained bog: effect of ash fertilization. **Microbiol Ecology**, New York, v. 49, p. 209-217, 2005.

GATTINGER, A.; HOEFLE, M.G.; SCHLOTTER, M.; EMBACHER, A.; BOHME, F.; MUNCH, J.C.; LABRENZ, M. Traditional cattle manure application determines abundance, diversity and activity of methanogenic Archaea in arable European soil. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 9, p. 612-624, 2007.

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

GARRITY, G.M.; HOLT, J.H. A road map to the manual. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, G.M.; GARRITY (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed., Berlin: Springer-Verlag, 2001. p. 119-166.

GASTON, K. J. Species richness: measure and measurement. In: GASTON, K. J. (Ed.), **Biodiversity: a biology of numbers and difference**. Cambridge: Blackwell, 1996. p. 77– 113.

GLASER, B.; BALASHOV, E.; HAUMAIER, L., GUGGENBERGER, G., ZECH, W. Black carbon in density fractions of anthropogenic soils of the Brazilian Amazon region. **Organic Geochemistry**, Amsterdam, v. 31, p. 669-678, 2000.

GLASER, B.; GUGGENBERGER, G.; HAUMAIER, L.; ZECH, W. Persistence of soil organic matter in *Archaeological* soils (terra preta) of the Brazilian Amazon region. In: REES, R.M.; BALL B.C.; CAMPBELL, C.D.; WATSON, C.A. (Ed.). **Sustainable management of soil organic matter**, Wallingford: CABI Publishing, 2001. p.190-194.

GLASER, B.; HAUMAIER, L.; GUGGENBERGER, G.; ZECH, W. Black carbon in soils: the use of benzenecarboxylic acids as specific markers. **Organic Geochemistry**, Amsterdam, v. 29, p. 811-819, 1998.

GODON, J.J.; ZUMSTEIN, E.; DABERT, P.; HABOUZIT, F.; MOLETTA, R. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 2802-2813, 1997.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a geographical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 195-202, 1998.

GORRIS, L.G.M.; VAN der DRIFT, C. Cofactor contents of methanogenic bacteria reviewed. **Biofactors**, Amsterdam, v. 4, p. 139-145, 1994.

HALES, B.A.; EDWARDS, C.; RITCHIE, D. A.; HALL, G.; PICKUP, R.W. & SAUNDERS, J.R. Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 62, p. 668-675, 1996.

HERSHBERGER, K.L.; BARNS, S.M.; REYSENBACH, A.L.; DAWSON, S.C.; PACE, N.R. Wide diversity of Crenarchaeota. **Nature**, London, v. 384, p. 420, 1996.

HINES, M.E.; DUDDLESTON, K.N. Carbon flow to acetate and C1 compounds in northern wetlands. **Geophysical Research Letters**, Washington, v. 28, p. 4251-4254, 2001.

HIRAISHI, A.; KAMAGATA, Y.; NAKAMURA, K. Polymerase chain reaction amplification and restriction length polymorphism analysis of 16S rRNA genes from methanogens. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Amsterdam, v. 79, p. 523-529, 1995.

HOLLAND, K. T.; KNAPP, J. S.; SHOESMITH, J. G. **Anaerobic bacteria**. Nova York: Chapman and Hall, 1987. 206 p.

HOUGHTON, J. The climate convention and the latest scientific understanding of climate change. **Renewable Energy**, Oxford, v. 5, p. 1-4, 1994.

<http://www.cria.org.br/cgee/documentos/microtax.doc>. Acesso em: 20 maio 2007.

<http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/archaea/archaea.html>. Acesso em: 10 maio 2007.

HUBER, H.; HOHN, M. J.; RACHEL, R.; FUCHS, T.; WIMMER, V. C.; STETTER, K. O. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. **Nature**, London, v. 417, p. 63–67, 2002.

HUNGATE, R. E. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. **Bacteriology Review**, Baltimore, v. 14, p. 1-63, 1950.

HUNGATE, R. E. A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. **Methods in Microbiology**, New York, v. 3, p. 117-132, 1969.

INTEGRATED GENOMICS. Disponível em: <<http://wit.integratedgenomics.com/GOLD>>. Acesso em: 17 abril 2007.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. (<http://www.ipcc.ch>). 2007.

JEANTHON, C.; L'HARIDON, S.; PRADEL, N.; PRIEUR, D. Rapid identification of hyperthermophilic methanococci isolated from deep-sea hydrothermal vents. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 49, p. 591-594, 1999.

JONES, W.J.; NAGLE, D.P. Jr.; WHITMAN, W.B. Methanogens and the diversity of Archaeobacteria. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 51, p. 137-177, 1987.

JOULIAN, C.; OLLIVIER, B.; PATEL, B.K.C.; ROGER, P.A. Phenotypic and phylogenetic characterization of dominant culturable methanogens isolated from ricefield soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 25, p. 135-145, 1998.

JOULIAN, C., PATEL, B.K.C.; OLLIVIER, B.; GARCIA, J.L.; ROGER, P.A. *Methanobacterium oryzae* sp. nov., a novel methanogenic rod isolated from a Philippines ricefield. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 50, p. 525–528, 2000.

JUNK, W.J. **The central Amazon floodplain**: Ecology of a pulsing system. Berlin: Springer. 1997. 520 p.

KASAI, Y.; TAKAHATA, Y.; HOAKI, T.; WATANABE, K. Physiological and molecular characterization of a microbial community established in unsaturated, petroleum-contaminated soil. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, p. 806-818, 2005.

KEMP, P.F.; ALLER, J.Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us, **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, Oxford v. 47, p. 161-177, 2004.

KENDALL, M.M.; WARDLAW, G.D.; TANG, C.F.; BONIN, A.S.; LIU, Y.; VALENTINE, D.L. Diversity of Archaea in marine sediments from Skan Bay, Alaska, including cultivated methanogens, and description of *Methanogenium boonei* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 73, p. 407-414, 2007.

KERN, D.C.; D'AQUINO, G.; RODRIGUES, T.E.; FRAZÃO, F.J.L.; SOMBROEK, W.; MYERS, T.P. E NEVES, E.G. Distribution of Amazonian Dark Earths in the Brazilian Amazon. In: LEHMAM, J.; KERN, D.C.; GLASER, B.; WOODS, W.I. (Ed.). **Amazonian Dark Earths: Origin, properties & management**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 51-75.

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

KERN, D.C. **Caracterização de solos com Terra Preta Arqueológica na região de Oriximiná, Pará**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1988. 232 p.

KLEIN, A.; ALLMANSBERGER, R.; BOKRANZ, M.; KANAUB, S.; MULLER, B. Comparative analysis of genes encoding methyl coenzyme M reductase in methanogenic bacteria. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 213, p. 409-420, 1988.

KIM, B. S.; H. M. OH; H. KANG; AND J. CHUN. Archaeal diversity in tidal flat sediment as revealed by 16S rDNA analysis. **Journal of Microbiology**, Reading, v. 43, p. 144-151, 2005.

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

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 16, p. 11-120, 1980.

KÖNNEKE, M.; BERNHARD, A.E.; TORRE, J. R. DE LA.; WALKER, C. B.; WATERBURY, J. B.; STAHL, D. A. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. **Nature**, London, v. 437, p. 543-546, 2005.

KOSCHORRECK, M. Methane turnover in exposed sediments of an Amazon floodplain lake. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 50, p. 195-206, 2000.

KOTSYURBENKO, O. R.; FRIEDRICH, M. W.; SIMANKOVA, M. V.; NOZHEVNIKOVA, A. N.; GOLYSHIN, P. N.; TIMMIS, K. N.; CONRAD, R. Shift from Acetoclastic to H₂-Dependent Methanogenesis in a West Siberian Peat Bog at Low pH Values and Isolation of an Acidophilic *Methanobacterium* Strain. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 73, p. 2344-2348, 2007.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA 3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. **Briefings in Bioinformatics**, Oxford, v. 5, p. 150-163, 2004.

LALOUI-CARPENTIER, W.; LI, T.; VIGNERON, V.; MAZEAS, L.; BOUCHEZ, T. Methanogenic diversity and activity in municipal solid waste landfill leachates. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 89, p. 423-434, 2006.

LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.; BULL, R.C. Diversidade Microbiana nos Solos: Definindo Novos Paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L. R. F.; COOPER, M.; SILVA, A. P.; CARDOSO, E. J.. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. v. 4, p. 43-84.

Le MER, J.; ROGER, P. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 37, p. 25-50, 2001.

LJUNGDAHL, L. G.; WIEGEL, J. Working with anaerobic bacteria. In: DEMAIN, A.L.; SOLOMAN, N.E. (ed.), **Manual of industrial microbiology and biotechnology**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology . 1986. p. 84–96.

LOMANS, B.P.; LUDERER, R.; STEENBAKKERS, P.; POL, A.; DRIFT, van der C.; HUUB, J.; CAMP, den O.P. Microbial populations involved in cycling of dimethyl sulfid and methanethiol in freshwater sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, p. 1044-1051, 2001.

LOUWS, F. J; RADEMAKER, J. L. W.; BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.15, p.155, 1994.

LUEDERS, T; FRIEDRICH, M.W. Archaeal Population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 2732-2742, 2000.

LUEDERS, T.; FRIEDRICH, M.W. Effects of amendment with ferrihydrite and gypsum on the structure and activity of methanogenic populations in rice field soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, p. 2484-2494, 2002.

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

MacGREGOR, B.J.; MOSER, D.P.; ALM, E.W.; NEALSON, K.H.; STHAL, D.A. Crenarchaeota in Lake Michigan sediment. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 1178-1181, 1997.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. São Paulo: Editora Pearson Education do Brasil, 2004. 208 p.

MARCHESI, J.; WEIGHTMAN, A.; CRAGG, B.; PARKES, R.; FRY, J. Methanogen and bacterial diversity and distribution in deep gas hydrate sediments from Cascadia Margin as revealed by 16S rRNA molecular analysis. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 34, p. 221-228, 2001.

MARICK, T.; FISCHER, H.; CONEN, F.; SMITH, K. Seasonal variations in stable carbon and hydrogen isotope ratio in methane from rice fields. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, v. 16, p. 41-52, 2002.

MARTENS, C. S.; BLAIR, N. E.; GREEN, C. D.; DES MARAIS, D. J. Seasonal variations in the stable carbon isotopic signature of biogenic methane in a coastal sediment. **Science**, Washington, v.233, n.4770, p.1300-1303, 1986.

MASSANA, R., MURRAY, A.E., PRESTON, C.M.; DeLONG, E.F. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara channel. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p.50–56, 1997.

McCAIG, A.E.; GLOVER, L.A.; PROSSER, J.I. Molecular analysis of eubacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 1721-1730, 1999.

McHUGH, S.; CARTON, M.; MAHONY, T.; O'FLAHERTY, V. Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 219, p. 297-304, 2003.

McCANN, J.M. Before 1492. The making of the pre-Columbian Landscape. **Ecological Restoration**, Madison, v. 17, p. 15-30, 1999.

MEGGERS, B. Amazonia – Man and culture in a counterfeit paradise. Chicago: Aldine. MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002. 262 p.

MELACK, J. M.; HESS, L. L.; GASTIL, M.; FORSBERF, B. R.; HAMILTON, S. K.; LIMA, I. B. T.; NOVO, E. M. L. M. Regionalization of methane emissions in the Amazon basin with microwave remote sensing. **Global Change Biology**, Oxon, v.10, p. 530-544, 2004.

- MELILLO, J.M.; STEUDLER, P. A.; ABEER, J.O.; BOWDEN, R.D. Atmospheric deposition and nutrient cycling. In: Andreae, M.O.; Schimel, D.S. (Ed.). **Exchange of trace gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere**. Chister: Wiley, J., 1989. p. 263-280.
- MEUER, J., KUETTNER, H. C., ZHANG, J. K., HEDDERICH, R., METCALF, W. W. Genetic analysis of the archaeon *Methanosarcina barkeri* Fusaro reveals a central role for Ech hydrogenase and ferredoxin in methanogenesis and carbon fixation. **The Proceedings of the National Academic of Science of the USA**, Washington, v. 99, p. 5632-5637, 2002.
- MILLER, T.L.; WOLIN, M.J. A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. **Applied Microbiology**, Baltimore, v. 27, p. 984-987, 1974.
- MILLER, T.L.; WOLIN, M.J. *Methanosphaera stadtmanii* gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen. **Archives Microbiology**, Heidelberg, v. 141, p. 116-122, 1985.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: UFLA, 2002. 626 p.
- MOURA, J.M.S. **Variação na composição isotópica do metano (CH₄) em sedimentos de igarapés na Amazônia Oriental**. 2005. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- MOYER, C.L.; TIEDJE, J.M.; DOBBS, F.C.; KARL, D.M. Diversity of deep-sea hydrothermal vent Archaea from Loihi Seamount, Hawaii. **Deep-sea Research**, Oxford, v.45, p. 303-317, 1998.
- MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI. Disponível em: <<http://www.museu-goeldi.br>>. Acesso em: 10 maio 2005.
- NAKAYAMA, C.R. **Degradação anaeróbia da pentaclorofenol (PCP), 2,3,4-triclorofenol (2,3,4-TCP) e 2,6-diclorofenol (2,6-DCP) por culturas enriquecidas a partir de sedimento contaminado do Sistema Estuarino Santos e São Vicente**. 2005. 187 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- NASCIMENTO, C. N. B. do; HOMMA, A. K. O. **Amazônia: meio ambiente e tecnologia agrícola**. Belém: Embrapa-CPATU, 1984. 282p.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>>. Acesso em: 13 abril 2007.
- NEBcutter V2.0. Disponível em: <<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>>. Acesso em: 12 maio 2007.
- NICOL, G.W.; TSCHERKO, D.; EMBLEY, T.M.; PROSSER, J.I. Primary succession of soil Crenarchaeota across a receding glacier foreland. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, p. 337-347, 2005.

NORTHUP, D.E.; BARNS, S.M.; YU, L.E.; SPILDE, M.N.; SCHELBLE, R.T.; DANO, K.E.; CROSSEY, L.J.; CONNOLLY, C.A.; BOSTON, P.J.; NATVIG, D.O.; DAHM, C.N. Diverse Microbial Communities Inhabiting Ferromanganese Deposits in Lechuguilla and Spider Caves. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 1071-1086, 2003.

NOVAES, R.F.V. Microbiology of anaerobic digestion. **Water Science and Technology**, London, v. 18, p. 1-14, 1986.

NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; KUHL, M.; MUYZER, G. Quantifying microbial diversity: morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, Washington, v. 65, p. 422-43, 1999.

OLIVEIRA JÚNIOR, R.C. de; CORRÊA, J.R.V. **Caracterização dos Solos do Município de Belterra, Estado do Pará**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2001. 39 p.

OREMLAND, R.S. **Biogeochemistry of methanogenic bacteria**. In: Biology of anaerobic microorganisms. ZEHNDER, A.J.B. (Ed.) Wageningen: John Wiley Sons, 1988. p. 641-706.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, Washington, v. 276, p.734-740, 1997.

PABST, E. **Crítérios de Distinção entre Terra Preta e Latossolo na Região de Belterra e os seus significados para a Discussão Pedogenética**. Boletim Museu Paraense Emílio Goeldi. Série Antropologia, Pará, v.7, p.5-19, 1991.

PEREIRA, A.R.; ANGELOCCI, L.R.; SENTELHAS, P.C. **Agrometeorologia - Fundamentos e aplicações práticas**. Guaíba: Editora Agropecuária, 2002. v. 1. 478 p.

PRESTON, C. M.; WU, K. Y.; MOLINSKI, T. F.; DeLONG, E. F. A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. **The Proceedings of the National Academic of Science of the USA**, Washington, v. 93, p. 6241-6246, 1996.

REEVE, J.N.; NÖLLING, J.; MORGAN, R.M.; SMITH, D.R. Methanogenesis: Genes, genomes, and who's on first? **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 179, p. 5975-5986, 1997.

RIBOSSOMAL DATABE PROJECT II. Disponível em:
<<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>>. Acesso em: 15 maio. 2007.

RODRIGUES, T.E.; SANTOS, P.L. DOS; OLIVEIRA JÚNIOR, R.C.; VALENTE, M.A.; SILVA, J.M.L. DA; CARDOSO JÚNIOR, E.Q. **Caracterização dos solos da área do Planalto de Belterra, município de Santarém, estado do Pará**. Pará. Embrapa Amazônia Oriental.. 2001. 55 p. (Pará: Documentos, 115)

ROLING, W.F.; COUTO DE BRITO, I.R.; SWANNELL, R.P.; HEAD, I.M. Response of Archaeal Communities in Beach Sediments to Spilled Oil and Bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 70, p. 2614-2620, 2004.

ROUVIÉRE, P.E.; WOLFE, R.S. Novel biogeochemistry of methanogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 263, p. 7913-7916, 1988.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 4, p. 406-425, 1987.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing to DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

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

SCHNEIDER, R. P.; FERREIRA, L. M.; BINDER, P.; BEJARANO, E. M.; GOES, K. P.; SLONGO, E.; MACHADO, C. R.; ROSA, G. M. Z. Dynamics of organic carbon and of bacterial populations in a conventional pretreatment train of a reverse osmosis unit experiencing severe biofouling. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 266, p. 18-29, 2005.

SHEN T.J.; CHAO, A.; LIN, C.F. Predicting the number of new species in further taxonomic sampling. **Ecology**, Ithaca, v. 84, n. 3, p. 798-804, 2003.

SHERIDAN, P.P.; MITEVA, V.I; BRENCHLEY, J.E. Phylogenetic analysis of anaerobic psychrophilic enrichment cultures obtained from a Greenland glacier ice core. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 2153-2160, 2003.

SHLIMON, A.G.; FRIEDRICH, M.W.; NIEMANN H.; RAMSING, N.B.; FINSTER, K. *Methanobacterium aarhusense* sp. nov., a novel methanogen isolated from a marine sediment (Aarhus Bay, Denmark). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 54, p. 759-763, 2004.

SILVER, W.L.; THOMPSON, A.W.; MCGRODDY, M.E.; VARNER, R.K.; DIAS, J.D.; SILVA, H.; CRILL, P.M.; KELLER, M. Fine root dynamics and trace gas fluxes in two lowland tropical forest soils. **Global Change Biology**, Washington, v. 11, p. 290-306, 2005.

SIMANKOVA, M.V.; KOTSYURBENKO, O.R.; LUEDERS, T.; NOZHEVNIKOVA, A.N.; WAGNER, B.; CONRAD, R.; FRIEDRICH, M.W. Isolation and characterization of new strains of methanogens from cold terrestrial habitats. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 26, p. 312-318, 2003.

SINGLETON, D.R.; FURLONG, M.A.; RATHBUN, S.L.; WHITMAN, W.B. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.67, p. 4374-4376, 2001.

SIZOVA, M.V.; PANIKOV, N.S.; TOUROVA, T.P.; FLANAGAN, P.W. Isolation and characterization of oligotrophic acido-tolerant methanogenic consortia from a Sphagnum peat bog. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 45, p. 301-315, 2003.

S-LIBSHUFF. Disponível em: <<http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/S-LibShuff.html>>. Acesso em: 13 maio 2007.

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

SKJEMSTAD, J.O.; CLARKE, P.; TAYLOR, J.A.; OADES, J.M.; MCCLURE, S.G. The chemistry and nature of protected carbon in soil. **Australian Journal of Soil Research**, v. 34, p. 251-271, 1996.

SOMBROEK, W. G. Amazon soils: **A Reconnaissance of the Soils of the Brazilian Amazon Region**. Wageningen, Center for Agricultural Publications and Documentation. 1966. 292 p.

SPEAR, J.R.; WALKER, J.J.; McCOLLOM, T.M.; PACE, N.R. Hydrogen and bioenergetics in the Yellowstone geothermal ecosystem. **The Proceedings of the National Academic of Science of the U.S.A.**, Washington, v. 102, p. 2555-2560, 2005.

SPRINGER, E.; SACHS, M.S.; WOESE, C.R.; BOONE, D.R. Partial gene sequences for the A subunit of methyl-coenzyme M reductase (mcrI) as a phylogenetic tool for the family *Methanosarcinaceae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.45, p. 554-559, 1995.

SOWERS, K.R.; SCHREIER, H.J. Media for methanogens. In: SOWERS, K.R., SCHREIER, H.J. (Ed.). **Archaea - A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1995. p. 459-489.

SOWERS, T.; BERNARD, S.; ABALLAIN, O.; CHAPPELLAZ, J.; BARNOLA, J.M.; MARIK, T. Records of the $\delta^{13}\text{C}$ of atmospheric CH_4 over the last 2 centuries as recorded in Antarctic snow and ice. **Global Geochemical Cycles**, Washington, v. 19, p. 1-12, 2005.

STACH, J.E.M.; MALDONADO, L.A.; MASSON, D.G.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M.; BULL, A.T. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, p. 6189-6200, 2003.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systemic Bacteriology**, Washington, v. 44, p. 846-849, 1987.

STEIN, L.Y.; JONES, G.; ALEXANDER, B.; ELMUND, K.; WRIGHT-JONES, C.; NEALSON, K.H. Intriguing microbial diversity associated with metal-rich particles from a freshwater reservoir. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 42, p. 431-440, 2002.

STEIN, L.Y.; LA DUC, M.T.; GRUNDL, T.J.; NEALSON, K.H. Bacterial and archaeal populations associated with freshwater ferromanganous micronodules and sediments. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 3, p. 10-18, 2001.

SWOFFORD, D.; OLSEN, G.; WADDEL, P.; HILLIS, M. Phylogenetic inference. In: HILLIS, D.M.; MORTIZ, C.; MABLE, B.K. (Ed.). **Molecular Systematics**. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Association, 1996. p. 407-514.

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

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J.; CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific-gap penalties and weigh matrix choice. **Nucleic Acids Research**, London, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

THÓRSSON, A. E.; SVERRISSON, H.; ANAMTHAWAT-JÓNSSON, K. Genotyping icelandic isolates of rhizobia based on rDNA-RFLP. **Icelandic Agricultural Science**, Búvísindi, v.13, p.17-25, 2000.

TORSVIK, V. L. Isolation of bacterial DNA from soil. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 12, p. 15-21, 1980.

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

TREUSCH, A., KLETZIN, A., RADDATZ, G., OCHSENREITER, T., QUAISER, A., SCHUSTER, C., AND SCHLEPER C. Characterization of large-insert DNA libraries from soil for environmental genomic studies of Archaea. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 970-980, 2004.

UEDA, T.; SUGA, Y.; MATSUGUCHI, T. Molecular phylogenetic analysis of a soil microbial community in a soyben field. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 46, p. 415-421, 1995.

VAZOLLER, R.F. **Estudos sobre isolamento, caracterização e crescimento de culturas puras de bactérias metanogênicas provenientes de biodigestores de lodo de esgoto**. 1989..
Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989. 145 p

VAZOLLER, R.F. **Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas**. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995. 295 p.

VOGELS, G.D.; KELTJENS, J.T.; DRIFT, C. van der. **Biochemistry of methane production**. IN: Biology of anaerobic microorganisms. ZEHNDER, A.J.B. (Ed.). Wageningen: John Wiley, 1988. p. 707-770.

ZHANG, G., DONG, H., XU, Z., ZHAO, D.; ZHANG, C. Microbial diversity in ultra-high-pressure rocks and fluids from the chinese continental scientific drilling project in china. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 71, p. 3213-3227, 2005.

ZHENDER, A.J.B.; INGVORSEN, K.; MARTI, T. Microbiology of methane bacteria. In: HUGHES et al. (Ed.). **Anaerobic Digestion**. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press B.V., 1982. p. 45-68.

ZINDER, S.H.; KOCH, M. Non-aceticlastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 138, p. 263-272, 1984.

ZINDER, S.H. **Physiological ecology of methanogens**. In: FERRY, J.G. (Ed). New York: Chapman & Hall, 1983. p. 128-206.

ZINDER, S.H. *Methanogens*. In: BURLAGE, R.S.; ATLAS, R.; STHAL, D.; GEESEY, G.; SAYLER, G. (Ed.). **Techniques in microbial ecology**. New York: Oxford, 1998. p. 113-136.

WEIDLER, G.W.; DORNMAYR-PFAFFENHUEMER, M.; GERBL, F.W.; HEINEN, W.; STAN-LOTTER, H. Communities of *Archaea* and *Bacteria* in a subsurface radioactive thermal spring in the Austrian Central Alps, and evidence of ammonia-oxidizing *Crenarchaeota*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 73, p. 259-270, 2007.

WEIL, C.F.; CRAM, D.S.; SHERF, B.A.; REEVE, J.N. Structure and comparative analysis of the genes encoding component C of methyl coenzyme M reductase in extremely thermophilic archaeobacterium *Methanothermus fervidus*. **Journal Bacteriology**, Baltimore, v. 170, p. 4718-4726, 1988.

WHITBY, C.; EARL, J.; LANYON, C.; GRAY, S.; ROBINSON, J.; MEADOWS, J.; EDWARDS, C. The molecular diversity of the methanogenic community in a hypereutrophic freshwater lake determined by PCR-RFLP. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, p. 973-984, 2004.

WHITICAR, M.J. Carbon and hydrogen isotope systematic of bacterial formation and oxidation of methane. **Chemical Geology**, Amsterdam, v. 161, p. 291-314, 1999.

WHITICAR, M.J.; FABER, E.; SCHOELL, M. Biogenic methane formation in marine and freshwater environments: CO₂ reduction versus acetate fermentation-isotope evidence. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, Oxford, v. 50, p. 693-709, 1986.

WHITTAKER, R.H. New concepts of kingdoms of organisms. **Science**, Washington, v.163, p. 150-160, 1969.

WILLIAMS, R.T; CRAWFORD, R.L. Methane production in Minnesota peatlands. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 47, p. 1266-1271, 1985.

WINTER, C., SMIT, A., HERNDL, G.J.; WEINBAUER, M.G. Impact of virioplankton on archaeal and bacterial community richness as assessed in seawater batch cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 70, p. 804–813, 2004.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **The Proceedings of the National Academic of Science of the USA**, Washington, v. 74, p. 5088-5090, 1977.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiology Reviews**, Washington, v.51, p.221-271, 1987.

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

WOLBACH, W.S.; ANDERS, E. Elemental carbon in sediments: determination and isotopic analysis in the presence of kerogen. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, Oxford, v. 53, p. 1637-1647, 1989.

WOODS, W.I.; McCANN, J.M. El origen y persistencia de las tierras negras de la Amazonía. In: HIRAOKA, M.; Mora, S (Ed.). **Desarrollo Sostenible en la Amazonía**. Quito, 2001. p. 23-30.

WRIGHT, A.D.G.; PIMM, C. Improved strategy for presumptive identification of methanogens using 16S riboprinting. **Journal of Microbiology Methods**, Amsterdam, v. 55, 2003. p. 337-349.

APÉNDICE

APÊNDICE A

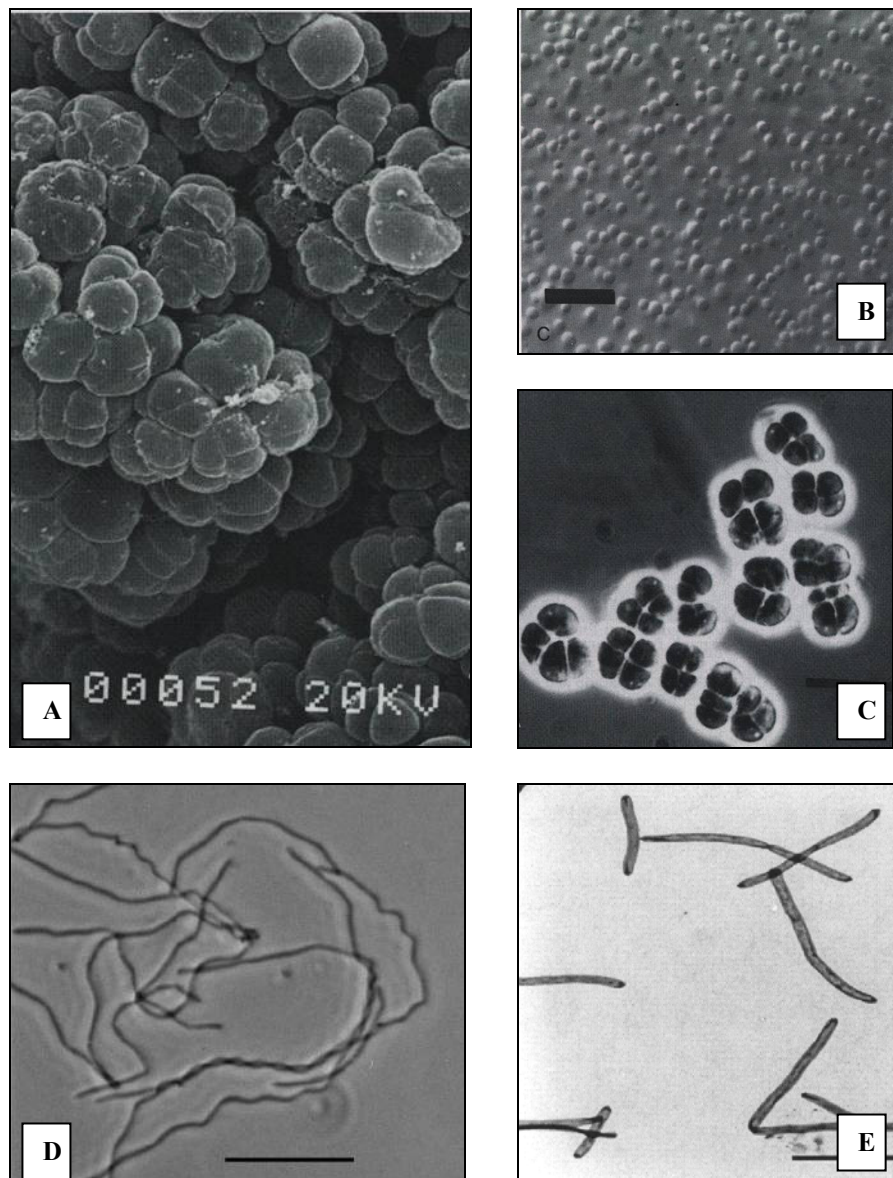


Imagem de morfologias de arqueias metanogênicas, a saber: A - *Methanosarcina mazei*, imagem de microscopia eletrônica de varredura; B - *Methanosarcina mazei*, células em formato de cocos; C - *Methanosarcina bakeri*, fotomicrografia de contraste fase, típico de pseudosarcina; D - *Methanobacterium oryzae*, micrografia de contraste de fase, mostrando cadeia de bacilos; E - *Methanobacterium aarhusense*, células em formato de bacilos livres, formando pares ou cadeias.

Fonte: GARRITY; HOLT, 2001; JOULIAN et al., 2000; SHLIMON et al., 2004.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)