



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE  
E BIOTECNOLOGIA DA REGIÃO AMAZÔNICA**



**METANO EM ÁREAS INUNDÁVEIS AMAZÔNICAS COM ÁGUAS  
NEGRA, CLARA E BRANCA: POTENCIAL DE PRODUÇÃO PELA  
MICROBIOTA E MODELAGEM MATEMÁTICA**

**DAYANE JULIATE BARROS**

**PALMAS – TO**

**2021**

**DAYANE JULIATE BARROS**

**METANO EM ÁREAS INUNDÁVEIS AMAZÔNICAS COM ÁGUAS  
NEGRA, CLARA E BRANCA: POTENCIAL DE PRODUÇÃO PELA  
MICROBIOTA E MODELAGEM MATEMÁTICA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Acacio Aparecido Navarrete

Coorientadora: Prof. Dra. Paula Benevides de Moraes

**PALMAS – TO**

**AGOSTO/2021**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

J94m Juliate Barros, Dayane.

Metano em áreas inundáveis amazônicas com águas negra, clara e branca: potencial de produção pela microbiota e modelagem matemática. / Dayane Juliate Barros. – Palmas, TO, 2021.

122 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em Biodiversidade e Biotecnologia, 2021.

Orientador: Acacio Aparecido Navarrete

Coorientadora : Paula Benevides de Moraes

1. Emissão de metano. 2. Solos amazônicos. 3. Metanogênese. 4. Modelagem matemática. . I. Título

**CDD 660.6**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

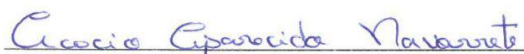
DAYANE JULIATE BARROS

**METANO EM ÁREAS INUNDÁVEIS AMAZÔNICAS COM ÁGUAS  
NEGRA, CLARA E BRANCA: POTENCIAL DE PRODUÇÃO PELA  
MICROBIOTA E MODELAGEM MATEMÁTICA**

Tese apresentada ao Curso de  
Doutorado do Programa de Pós-  
Graduação em Biodiversidade e  
Biotecnologia - Rede BIONORTE,  
na Universidade Federal do  
Tocantins, como requisito parcial  
para a obtenção do Título de Doutor  
em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em 30/08/2021

**Banca examinadora**



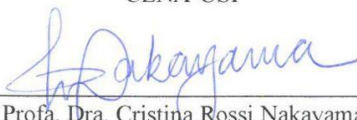
Prof. Dr. Acacio Aparecido Navarrete (Orientador)

UFMS



Profª. Dra. Siu Mui Tsai

CENA-USP



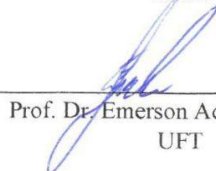
Profª. Dra. Cristina Rossi Nakayama

UNIFESP



Prof. Dr. Fabricio Motteran

UFPE



Prof. Dr. Emerson Adriano Guarda

UFT

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Acacio Aparecido Navarrete, por me proporcionar a oportunidade tão enriquecedora de ser sua aluna de doutorado. A vida me concedeu privilégios e ter você como orientador foi um deles. Sua inteligência, generosidade e qualificações como professor e pesquisador nato contribuíram para uma orientação excepcional durante este período. Da mesma forma, sempre incentivou e forneceu suporte quando precisei de orientação pessoal. Obrigada pela amizade, pela formação científica e por fornecer as melhores condições para que este trabalho fosse realizado.

À minha coorientadora Dra. Paula Benevides de Moraes por acreditar em mim desde a graduação, contribuindo para minha formação pessoal e profissional ao longo destes anos. Obrigada pelos desafios lançados, pela confiança e acima de tudo pelo exemplo de dedicação científica e competência.

À Dra. Siu Mui Tsai por toda motivação, sugestões científicas e suporte para que este trabalho fosse concluído da melhor forma possível. As atividades desenvolvidas no Laboratório de Biologia Celular e Molecular no CENA-USP trouxeram ensinamentos valiosos.

À Dra. Janaina Braga do Carmo, por fornecer condições para o desenvolvimento de parte deste trabalho no Laboratório BioClima na UFSCar - *Campus* Sorocaba.

À Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche do Laboratório de Processos Biológicos da USP - São Carlos, por todas as conversas científicas e por disponibilizar condições para que todo treinamento em enriquecimento metanogênico fosse realizado mediante os ensinamentos repassados pela Dra. Isabel Sakamoto.

Ao Dr. Fabrício Motteran por todo auxílio e paciência em sanar as minhas dúvidas em relação aos cálculos de produção metanogênica.

Ao imensurável suporte técnico prestado por Leonardo Machado, Lilian Assêncio, Fábio Duarte, Wagner Piccinini, Larissa Pereira, Isadora Lemos, Talita, Cristiane Coelho e Márcia Marson.

Ao Murilo de Souza Ferreira, da Escola de Engenharia Hidráulica e Saneamento (EESC/USP) pelo apoio na construção dos modelos de predição de fluxo de metano e por sempre se dispor a colaborar.

À Dra. Vania Neu, da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), pelo seu entusiasmo e contribuições científicas, além de todo apoio fornecido durante as amostragens de solo no Estado do Pará.

Ao Dr. Glauber Altrão Carvalho, por prontamente aceitar auxiliar nos trabalhos de campo. Obrigada por ser a pessoa ideal para dar suporte nos trabalhos de campo durante o período inundado na Amazônia.

Ao INPA, em especial ao Dr. Bruce Forsberg e ao senhor João Batista, pelo auxílio durante as amostragens de solo e gases conduzidas nas planícies aluviais dos rios Negro e Solimões.

À Dra. Joy D. Van Nostrand do Institute for Environmental Genomics (IEG), University of Oklahoma (EUA), pelo suporte técnico durante a análise de microarranjo de DNA (GeoChip).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, código 001) pela concessão da bolsa de doutorado (Número do processo: 88882.428488/2019-01).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro no âmbito do Auxílio à Pesquisa - Jovem Pesquisador (Processo FAPESP 2016/16687-3), sem os quais esta pesquisa não seria possível.

Minha eterna gratidão àqueles que contribuíram para a minha formação pessoal e profissional durante esses anos de doutoramento. A estadia em diferentes Instituições de Ensino e Pesquisa trouxe um aprendizado riquíssimo e permitiu conhecer pessoas incríveis.

Aos meus amigos, vocês fazem parte das memórias mais felizes da minha existência. Cada um me inspira de uma forma, e eu me sinto extremamente abençoada por tê-los ao meu lado. Aos mais antigos, obrigada por entenderem minhas ausências durante esta jornada acadêmica no doutoramento.

Aos meus pais, Idelaide e Raimundo, obrigada pelo amor incondicional depositado em mim, por todo apoio e compreensão que sempre tive durante os caminhos que percorri.

À minha irmã, Danyelle, por sempre acreditar nos meus sonhos, pela melhor amizade e por todo suporte emocional. Obrigada pelos ensinamentos, você é uma inspiração para mim.

A Deus por absolutamente tudo.

**“Durante toda a minha vida, as novas descobertas sobre a natureza me alegraram como uma criança.”**

**Marie Curie**

BARROS, D. J. **Metano em áreas inundáveis amazônicas com águas negra, clara e branca: potencial de produção pela microbiota e modelagem matemática.** 2021. 122 folhas. Tese (Doutorado) - Programa de Pós - Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Região Amazônica - Universidade Federal do Tocantins.

## RESUMO

Este trabalho de tese avaliou o efeito da inundação sobre a resposta metabólica na microbiota do solo em planícies aluviais amazônicas com águas negra, clara e branca, e assumiu o acréscimo de temperatura estimado pelo Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas para a região amazônica, em vista de avaliar o potencial metanogênico e compreender a resposta metabólica microbiana em condições de elevada produção de CH<sub>4</sub> nesses ambientes. Para tanto, três diferentes estudos foram desenvolvidos em sítios florestais e agrícolas de planícies aluviais com águas negra (rio Negro), clara (rio Tocantins) e branca (rio Solimões) na Amazônia brasileira, os quais são descritos após a parte introdutória, *Capítulo 1*. O *Capítulo 2* avaliou a capacidade metabólica de micro-organismos do solo com base nos padrões de consumo de carbono e índices derivados obtidos a partir da tecnologia BIOLOG™ EcoPlate. Os resultados desse estudo mostraram diferença na riqueza metabólica de comunidades microbianas presentes em solo de planície aluvial de rio de água branca em comparação com aquelas reveladas para solos de planícies aluviais de rios de águas negra e clara, cuja variação dos dados foi explicada principalmente pela coloração da água. Por sua vez, o *Capítulo 3* reportou o potencial de produção de CH<sub>4</sub> pela microbiota presente nos mesmos solos avaliados no primeiro estudo desta tese. Substratos metanogênicos precursores das vias acetoclástica, hidrogenotrófica e metilotrófica foram adicionados ao solo em reatores biológicos e incubados em laboratório utilizando a temperatura de coleta do solo em campo, acrescida de 2 °C previsto para a região Amazônica como efeito das mudanças climáticas. A técnica de microarranjo de DNA (GeoChip v. 5.0S) foi utilizada para avaliar genes funcionais microbianos associados com a degradação e fixação de carbono e metanogênese. As hibridizações foram feitas a partir de DNA genômico isolado dos solos com as maiores produções de CH<sub>4</sub> nas incubações, resultantes da conversão dos substratos metanogênicos (acetato de sódio, formiato de sódio, glicose e metanol) em CH<sub>4</sub>. Os resultados deste estudo revelaram que as maiores produções de CH<sub>4</sub> obtidas em reatores biológicos não estiveram associadas às maiores porcentagens de hibridizações de genes associados com a degradação e fixação de carbono e metanogênese. Por fim, o *Capítulo 4* foi desenvolvido utilizando conjunto de metadados composto por fatores físicos e químicos do solo, dados moleculares quantitativos de abundância de grupos taxonômicos metanogênicos e metanotróficos das planícies aluviais amazônicas e métricas da paisagem para obtenção de modelos de predição do fluxo de CH<sub>4</sub> em planícies aluviais de rios de águas negra, clara e branca. Este estudo representa o primeiro esforço em prol de realizar estimativas dos fluxos de CH<sub>4</sub> utilizando variáveis microbiológicas de solos de áreas inundáveis da Amazônia.

Palavras-chave: Emissão de metano; Solos amazônicos; Metanogênese; Modelagem matemática.



BARROS, D. J. **Methane in Amazonian floodplains with black, clear and white waters: potential for production by microbiota and mathematical modelling**. 2021. 122 folhas. Tese (Doutorado) - Programa de Pós - Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Região Amazônica - Universidade Federal do Tocantins.

## ABSTRACT

This thesis evaluated the effect of flooding on the metabolic response of soil microbiota in Amazonian floodplains with black, clear and white waters, and assumed the temperature increase estimated by the Intergovernmental Panel on Climate Change for the Amazon region, in order to evaluate the methanogenic potential and understand the microbial metabolic response under conditions of high CH<sub>4</sub> production in these environments. For this purpose, three different studies were designed and developed in forest and agricultural sites of floodplains with black (Negro River), clear (Tocantins River) and white (Solimões River) waters in the Brazilian Amazon, which are presented after the introductory part, *Chapter 1*. The *Chapter 2* evaluated the metabolic capacity of soil microorganisms based on carbon consumption patterns and derived indices obtained from the BIOLOG™ EcoPlate technology. The results of this study showed a difference in the metabolic richness of microbial communities present in white water river floodplain soils compared with those revealed for black and clear water river floodplain soils, whose data variation was explained mainly by water coloration. In turn, *Chapter 3* reported the potential for CH<sub>4</sub> production by the microbiota present in the same soils evaluated in the first study of the thesis. Methanogenic precursor substrates of the acetoclastic, hydrogenotrophic, and methylotrophic pathways were added to the soil in biological reactors and incubated in the laboratory using the field soil collection temperature plus 2 °C predicted for the Amazon region as an effect of climate change. DNA microarray technique (Geochip v. 5.0S) was used to evaluate microbial functional genes associated with carbon degradation and fixation and methanogenesis. Hybridizations were performed from genomic DNA isolated from the soils with the highest CH<sub>4</sub> productions in the incubations, resulting from the conversion of methanogenic substrates (sodium acetate, sodium formate, glucose and methanol) into CH<sub>4</sub>. The results of this study revealed that the higher CH<sub>4</sub> productions obtained in biological reactors were not associated with higher percentages of hybridizations of genes associated with carbon degradation and fixation and methanogenesis. Finally, *Chapter 4* was developed using metadata set composed of soil physical and chemical factors, quantitative molecular abundance data of methanogenic and methanotrophic taxonomic groups from Amazonian floodplains, and landscape metrics to obtain models for predicting CH<sub>4</sub> in floodplains of black, clear, and white water rivers. This study represents the first effort to estimate CH<sub>4</sub> fluxes using microbiological variables from Amazonian floodplain soils.

Keywords: Methane emission; Amazon Soils; Methanogenesis; Mathematical Modeling.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
1.1 Estrutura do documento.....	10
1.2 Hipóteses de trabalho e objetivos propostos.....	11
1.2.1 Hipótese básica e objetivo geral.....	11
1.2.1.1 Hipóteses secundárias e objetivos específicos.....	11
REFERÊNCIAS.....	13
2 Capítulo 1 - METANO, MICRÓBIOS E MODELOS EM PLANÍCIES ALUVIAIS AMAZÔNICAS: ESTADO-DA-ARTE E PERSPECTIVAS .....	15
2.1 Introdução.....	16
2.2 Ciclo biogeoquímico do CH <sub>4</sub> .....	17
2.3 Microbiota envolvida na ciclagem de CH <sub>4</sub> .....	19
2.4 Influência da hidrologia nas planícies aluviais tropicais.....	23
2.5 Sensibilidade das planícies aluviais às mudanças climáticas.....	24
2.6 Emissões de CH <sub>4</sub> em áreas inundáveis: biogeoquímica, assinatura isotópica e metagenômica.....	25
2.7 Modelagem matemática.....	27
2.8 Considerações finais.....	29
Referências.....	31
3 Capítulo 2 - TIPOS DE ÁGUA E PULSOS DE INUNDAÇÃO MOLDAM A ATIVIDADE METABÓLICA MICROBIANA EM SOLOS DE PLANÍCIES ALUVIAIS AMAZÔNICAS ..	38
.....	38
3.1 Introdução.....	39
3.2 Material e métodos.....	40
3.2.1 Sítios de amostragem.....	40
3.2.2 Amostragem de solo.....	41
3.2.3 Análise de perfil fisiológico ao nível da comunidade.....	42
3.2.4 Fatores físicos e químicos do solo.....	44
3.2.5 Análise estatística.....	44
3.3 Resultados.....	45
3.3.1 Análise do perfil fisiológico ao nível da comunidade.....	45
3.3.2 Contribuição de fatores físicos e químicos do solo para a variação das características metabólicas funcionais da comunidade bacteriana.....	51
3.3.3 Contribuição da sazonalidade, uso da terra e tipo de água para a variação das características metabólicas da comunidade microbiana.....	53
3.4 Discussão.....	54
Referências.....	59
4 Capítulo 3 - PRODUÇÃO POTENCIAL DE METANO EM SOLOS DE PLANÍCIES ALUVIAIS AMAZÔNICAS EM CENÁRIO PREVISTO DE MUDANÇA CLIMÁTICA ...	63
4.1 Introdução.....	64
4.2 Materiais e métodos.....	66
4.2.1 Sítios de amostragem.....	66

4.2.2 Amostragem de solo.....	67
4.2.3 Potencial de produção de CH <sub>4</sub> com substratos adicionais.....	67
4.2.4 Quantificação e cálculo de concentração de CH <sub>4</sub> no <i>headspace</i> .....	70
4.2.5 Produção cumulativa de CH <sub>4</sub> .....	70
4.2.6 Extração de DNA das amostras dos biorreatores.....	70
4.2.7 Análises utilizando GeoChip v. 5.0S e processamento de dados brutos.....	71
4.2.8 Análise estatística.....	71
4.3 Resultados.....	72
4.3.1 Produção de CH <sub>4</sub> em biorreatores.....	72
4.3.2 Maiores produções de CH <sub>4</sub> em biorreatores.....	75
4.3.3 Diversidade funcional das comunidades microbianas associadas a ciclagem de C.....	79
4.3.3.1 Degradação de C.....	80
4.3.3.2 Fixação de C.....	82
4.3.3.3 Metabolismo do CH <sub>4</sub> .....	84
4.3.3.4 Respostas dos genes funcionais ligados ao C.....	84
4.4 Discussão.....	85
4.5 Conclusões.....	88
Referências.....	89
5 Capítulo 4 - EMISSÕES DE CH <sub>4</sub> EM PLANÍCIES ALUVIAIS NA BACIA AMAZÔNICA: MODELO BASEADO EM PROCESSO MICROBIANO.....	93
5.1 Introdução.....	94
5.2 Materiais e métodos.....	95
5.2.1 Cenário dos modelos.....	95
5.2.2 Amostragem de solo.....	96
5.2.3 Fluxos de CH <sub>4</sub> a partir do solo e da lâmina da água das planícies aluviais.....	96
5.2.3.1 Fluxos de CH <sub>4</sub> na interface solo-atmosfera.....	96
5.2.3.2 Fluxos de CH <sub>4</sub> na interface água-atmosfera.....	97
5.2.3.3 Concentração de CH <sub>4</sub> dissolvido na água.....	98
5.2.4 Fatores físicos e químicos do solo.....	98
5.2.5 Extração do RNA Genômico do Solo e Síntese de cDNA.....	99
5.2.6 Sequenciamento de transcritos de amplicons 16S rRNA.....	99
5.2.7 Análise estatística.....	100
5.3 Resultados.....	100
5.4 Discussão.....	107
5.5 Conclusão.....	107
Referências.....	110
6 Conclusões.....	114

## 1 INTRODUÇÃO

A diversidade e biomassa das comunidades microbianas do solo são os principais reguladores dos processos fundamentais do ecossistema, como decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes e fluxos gasosos [1-3]. A abundância e a diversidade de micro-organismos fundamentam o seu papel na manutenção de um ecossistema global saudável, tornando as formas de vida microbiana um sistema de suporte da vida na biosfera [4]. Embora os micro-organismos sejam cruciais na regulação dos ciclos biogeoquímicos, eles raramente são o foco dos estudos sobre mudanças climáticas e não são considerados no desenvolvimento de políticas e tomadas de decisão [4].

A Amazônia, maior floresta tropical do mundo em extensão, tem se mostrado um importante sumidouro de carbono (C) nas últimas décadas [5,6] sendo uma das principais candidatas a influenciar o balanço e os fluxos de C terrestre de longo prazo, suas flutuações interanuais e qualquer tendência como sumidouro terrestre [6]. No entanto, estudo recente desenvolvido por Gatti *et al.*[7] mostra que a capacidade de absorção de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) está seriamente comprometida, especialmente na porção oriental da floresta. Estes autores relataram que a intensificação da estação seca e o aumento no desmatamento parecem promover estresse no ecossistema, aumentando as emissões de CO<sub>2</sub> no leste da Amazônia.

As zonas úmidas são responsáveis por grande parte da variabilidade nas concentrações atmosféricas globais de um importante gás de efeito estufa, o metano (CH<sub>4</sub>) [8], respondendo como a maior fonte natural [9] deste gás para atmosfera. Um sétimo da bacia amazônica é formado por ecossistemas sazonalmente inundados [10], tornando a Amazônia a maior fonte geográfica natural de emissão de CH<sub>4</sub> nos trópicos [11]. Dada a importância ecológica das planícies aluviais amazônicas, os processos vinculados à variação sazonal são um fator crítico para modelagem global mais fidedigna de CH<sub>4</sub>.

O CH<sub>4</sub> é um gás de efeito estufa de extrema relevância em virtude do seu potencial de aquecimento global, estimado em 25 vezes superior ao CO<sub>2</sub> ao longo de um horizonte de 100 anos [12,13]. Existe uma miríade de maneiras pelas quais os micro-organismos do solo e sua atividade metabólica podem influenciar as trocas de C na interface terra-atmosfera, podendo ser amplamente divididas em: aquelas que afetam a absorção de CH<sub>4</sub> e aquelas que controlam a produção de CH<sub>4</sub> [14]. O CH<sub>4</sub> é produzido em condições anaeróbicas por *Archaea* metanogênicas e pode ser oxidado por micro-organismos metanotróficos aeróbios ou anaeróbios [15]. Em solos com potencial para metanogênese, funções microbianas

importantes incluem hidrólise de matéria orgânica complexa, múltiplos processos de fermentação, processos envolvidos na redução sequencial de compostos inorgânicos e processos metanogênicos [16].

As águas amazônicas são classificadas em três categorias biogeoquímicas distintas, que envolvem atributos como nutrientes dissolvidos, tipo de sedimento, transparência e acidez [17], refletindo na coloração das mesmas (negra, clara e branca). As águas negras resultam do processo de lixiviação de matéria orgânica da floresta circundante; as águas claras se originam de regiões pobres em nutrientes, no escudo pré-cambriano; e a água branca é afetada pela erosão dos Andes [18]. Ji *et al.* [18] relataram o primeiro estudo em que houve a avaliação da estrutura das comunidades metanogênicas em 13 lagos de várzea abrangendo os tipos de água amazônica. Além da caracterização da estrutura da comunidade mediante determinação da abundância e composição taxonômica das *Archaea*, as taxas de produção de CH<sub>4</sub> e a função metanogênica foram determinadas com base em assinaturas isotópicas estáveis. Ji *et al.* [18] relataram em seus resultados que os sedimentos sob a influência desses tipos de águas podem ser diferenciados não apenas no que diz respeito às características físicas e químicas e taxas de produção de CH<sub>4</sub>, mas também na estrutura da comunidade de *Archaea*.

Hernandez *et al.* [19] compararam as comunidades de *Archaea* e o potencial metanogênico em amostras de solo coletadas em sítios amostrais amazônicos com diferentes históricos de inundação (áreas não inundáveis, ocasionalmente inundadas ao longo do ano e inundadas no momento da amostragem). Os autores mostraram que a composição da comunidade de *Archaea* mudou sistematicamente de solos secos para inundados. A avaliação do potencial de atividade metanogênica dos solos antes e depois do tratamento de dessecação em condições laboratoriais revelaram comportamento similar, apesar das diferenças nas comunidades microbianas.

O campo da ecologia do solo continua a descobrir mecanismos críticos que governam as emissões de CH<sub>4</sub> em planícies aluviais amazônicas. Contudo, colocar esse mecanismo em contexto de modelagem matemática exige que continuemos a expandir a nossa compreensão sobre o papel dos micro-organismos do solo nos processos em escalas regionais. À medida que avançamos neste entendimento, ganhamos um detalhamento mecanicista dos processos em detrimento da compreensão preditiva. Enquanto continuamos a refinar a nossa compreensão detalhada sobre taxa microbianos, também precisamos caminhar paralelamente na compreensão biogeoquímica atrelada. Tais percepções têm o potencial de melhorar as

previsões sobre o clima e, em última instância, essa abordagem emergente mais diversa fornecerá percepções fundamentais sobre a organização da vida na Terra [20].

Assim, baseados nas questões científicas que permeiam a compreensão da comunidade microbiana em planícies aluviais amazônicas, esta tese foi definida e composta por três diferentes estudos. O estudo reportado no *Capítulo 2* buscou compreender como as condições de seca e inundação afetam os perfis metabólicos da comunidade microbiana do solo em três planícies aluviais com diferentes tipos de água da Amazônia – negra (Rio Negro), clara (Rio Tocantins) e branca (Rio Solimões) – e uso da terra (floresta e agricultura). O *Capítulo 3* manteve foco na determinação do potencial metanogênico mediante o acréscimo de temperatura por meio de ensaios em biorreatores e na avaliação da resposta da abundância de genes funcionais microbianos em amostras com o maior potencial metanogênico. Por fim, o *Capítulo 4* propõe modelos matemáticos a partir de dados obtidos em campo (fluxo de CH<sub>4</sub>, fatores físicos e químicos do solo e abundância das comunidades metanogênicas e metanotróficas ativas presentes no solo), capaz de estimar as emissões de CH<sub>4</sub> em áreas inundáveis da Amazônia a partir deste conjunto de variáveis.

Este trabalho de tese está inserido no âmbito do Auxílio à Pesquisa Jovem Pesquisador – Programa FAPESP de Pesquisa sobre Mudanças Climáticas Globais – “Dinâmica da produção e consumo de metano pela microbiota ativa em áreas inundáveis da Amazônia” (Processo FAPESP 2016/16687-3).

## 1.1 Estrutura do documento

As informações introdutórias do documento abordam aspectos relacionados à contextualização do tema de pesquisa, incluindo a presente introdução, a definição das hipóteses de trabalho, os respectivos objetivos e a apresentação do referencial teórico (*Capítulo 1*). Nesta parte inicial, são introduzidos conceitos referentes à ciclagem do CH<sub>4</sub> em planícies aluviais amazônicas com ênfase na microbiota envolvida e a importância do uso de diferentes abordagens metodológicas para o entendimento do ciclo do CH<sub>4</sub>.

O *Capítulo 2* apresenta e discute os resultados de determinações com uso de perfis fisiológicos ao nível da comunidade microbiana (BIOLOG<sup>TM</sup> EcoPlate), com o objetivo de avaliar o potencial metabólico da comunidade em condições de seca e inundação em três planícies aluviais com diferentes tipos de água da Amazônia – negra (Rio Negro), clara (Rio Tocantins) e branca (Rio Solimões) – e uso da terra (floresta e agricultura).

No *Capítulo 3* é relatada a abordagem de avaliação sob condição controlada (*ex situ*) do efeito da adição de substratos sobre o potencial metanogênico em reatores biológicos contendo solo dos mesmos sítios florestais e agrícolas de planícies aluviais amazônicas contempladas no *Capítulo 2*, assumindo o efeito do aumento de temperatura, na atividade metabólica microbiana. Por fim, no *Capítulo 4* relata-se o uso de modelo matemático definido a partir de dados obtidos nas áreas de estudo consideradas nos capítulos anteriores, visando a simulação de cenários futuros para a emissão de CH<sub>4</sub> em áreas inundáveis da Amazônia. Nas informações finais disponíveis neste documento são apresentados os principais resultados obtidos no âmbito dos capítulos 2, 3 e 4.

## **1.2 Hipóteses de trabalho e objetivos propostos**

### **1.2.1 Hipótese básica e objetivo geral**

Com base em estudos prévios e no estado da arte, a condução do presente trabalho esteve pautada em uma hipótese central, na qual se afirma que áreas inundáveis florestais e sob sistemas agrícolas tradicionais nas planícies aluviais de águas negra (rio Negro), clara (rio Tocantins) e branca (rio Solimões) da Amazônia sofrerão alteração em sua atividade metabólica assumindo o acréscimo de temperatura previsto pelo IPCC. Neste contexto, o objetivo geral desta tese foi avaliar o potencial metabólico da comunidade microbiana, o potencial metanogênico e o potencial metabólico associados com as maiores produções de CH<sub>4</sub> pelas comunidades microbianas presentes no solo de áreas inundáveis florestais e agrícolas nas planícies aluviais de rios amazônicos de águas negra, clara e branca, bem como determinar o fluxo de CH<sub>4</sub> nessas áreas em períodos contrastantes da hidrógrafa (seca e inundação). Os resultados obtidos foram utilizados para a proposição de modelagem da emissão de CH<sub>4</sub> para a região da Amazônia.

#### **1.2.1.1 Hipóteses secundárias e objetivos específicos**

Assim, foram definidas três sub-hipóteses, relacionadas com os objetivos específicos desta tese:

Hipótese secundária 1: Áreas inundáveis em planícies aluviais de rios de água negra, clara e branca diferem quanto ao perfil fisiológico ao nível de comunidade microbiana. Esta hipótese é avaliada no *Capítulo 2*.

Objetivo: Determinar com uso de perfis fisiológicos ao nível da comunidade microbiana (BIOLOG™ EcoPlate), o potencial metabólico da comunidade microbiana do solo em condições de seca e inundação em três planícies aluviais com diferentes tipos de água da Amazônia – negra (Rio Negro), clara (Rio Tocantins) e branca (Rio Solimões) – e uso da terra (floresta e sistema agrícola tradicional).

Hipótese secundária 2: As máximas produções de CH<sub>4</sub> estão vinculadas a elevada atividade metabólica microbiana associada à degradação de C, fixação de C e metanogênese em solo utilizado como inóculo em biorreatores. Esta hipótese é avaliada no *Capítulo 3*.

Objetivos: Determinar o potencial metanogênico mediante aumento de temperatura por meio de ensaios em reatores biológicos contendo solo de áreas inundáveis florestais e agrícolas com diferentes tipos de águas amazônicas (negra, clara e branca) e meio de cultura enriquecido com diferentes fontes (acetato de sódio, formiato de sódio, glicose e metanol). Avaliar o efeito da elevada produção de CH<sub>4</sub> sobre o potencial metabólico relacionado com a produção de CH<sub>4</sub> utilizando microarranjo funcional de DNA (GeoChip v. 5.0S).

Hipótese secundária 3: Modelagem matemática baseada em dados obtidos em campo é capaz de simular emissões de CH<sub>4</sub> em áreas inundáveis da Amazônia. Esta hipótese será avaliada no *Capítulo 4*.

Objetivo: Propor modelo matemático a partir dos dados de campo (fluxo de CH<sub>4</sub>, fatores físicos e químicos do solo e métricas biológicas das comunidades metanogênicas e metanotróficas ativas presentes no solo).



## REFERÊNCIAS

- [1] BASTIDA, F., GARCÍA, C., FIERER, N., *et al.* Global ecological predictors of the soil priming effect. **Nature Communications**. v. 10, n. 1, p. 1–9, 2019.
- [2] CROWTHER, T. W.; VAN DEN HOOGEN, J.; WAN, J.; *et al.* The global soil community and its influence on biogeochemistry. **Science**, v. 365, n. 6455, 2019.
- [3] DELGADO-BAQUERIZO, M.; REICH, P. B.; TRIVEDI, C.; *et al.* Multiple elements of soil biodiversity drive ecosystem functions across biomes. **Nature Ecology and Evolution**, v. 4, n. 2, p. 210–220, 2020.
- [4] CAVICCHIOLI, R.; RIPPLE, W. J.; TIMMIS, K. N.; *et al.* Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 9, p. 569–586, 2019.
- [5] BRIENEN, R. J. W.; PHILLIPS, O. L.; FELDPAUSCH, T. R.; *et al.* Long-term decline of the Amazon carbon sink. **Nature**, v. 519, n. 7543, p. 344–348, 2015.
- [6] PHILLIPS, O. L.; BRIENEN, R. J. W.; GLOOR, E.; *et al.* Carbon uptake by mature Amazon forests has mitigated Amazon nations' carbon emissions. **Carbon Balance and Management**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2017.
- [7] GATTI, L.V.; BASSO, L.S.; MILLER, J.B. *et al.* Amazonia as a carbon source linked to deforestation and climate change. **Nature**, v. 595, p. 388–393, 2021.
- [8] BOUSQUET, P.; CIAIS, P.; MILLER, J. B.; *et al.* Contribution of anthropogenic and natural sources to atmospheric methane variability. **Nature**, v. 443, n. 7110, p. 439–443, 2006.
- [9] SAUNOIS, M.; STAVERT, A. R.; POULTER, B.; *et al.* The Global Methane Budget 2000 – 2017. **Earth System Science Data**, p. 1561–1623, 2020.
- [10] HESS, L. L.; MELACK, J. M.; AFFONSO, A. G.; *et al.* Wetlands of the Lowland Amazon Basin: Extent, Vegetative Cover, and Dual-season Inundated Area as Mapped with JERS-1 Synthetic Aperture Radar. **Wetlands**, v. 35, n. 4, p. 745–756, 2015.
- [11] PANGALA, S. R.; ENRICH-PRAST, A.; BASSO, L. S.; *et al.* Large emissions from floodplain trees close the Amazon methane budget. **Nature**, v. 552, n. 7684, p. 230–234, 2017.
- [12] CRUTZEN, P. J.; LELIEVELD, J. H. I. Human impacts on atmospheric chemistry. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**. v. 29, p. 17-45, 2001.
- [13] FORSTER P.; RAMASWAMY .; ARTAXO P, *et al.* Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing. In: Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, et al., editors. Climate change 2007: The physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge: Cambridge University Press; 2007

- [14] BARDGETT, R. D.; FREEMAN, C.; OSTLE, N. J. Microbial contributions to climate change through carbon cycle feedbacks. **ISME Journal**, v. 2, n. 8, p. 805–814, 2008.
- [15] SCHINDLER, T.; MANDER, Ü.; MACHACOVA, K.; *et al.* Short-term flooding increases CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions from trees in a riparian forest soil-stem continuum. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020.
- [16] CONRAD, R. Methane Production in Soil Environments—Anaerobic Biogeochemistry and Microbial Life between Flooding and Desiccation. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 881, 2020.
- [17] BOGOTÁ-GREGORY, J. D.; LIMA, F. C. T.; CORREA, S. B.; *et al.* Biogeochemical water type influences community composition, species richness, and biomass in megadiverse Amazonian fish assemblages. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2020.
- [18] JI, Y.; KLOSE, M.; CLAUS, P.; *et al.* Environmental factors determine the structure and function of methanogenic microbial communities in Amazonian lake sediments. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 12, p. 5082–5100, 2016.
- [19] HERNÁNDEZ, M.; KLOSE, M.; CLAUS, P.; BASTVIKEN, D.; MAROTTA, H. Structure, function and resilience to desiccation of methanogenic microbial communities in temporarily inundated soils of the Amazon rainforest (Cunia Reserve, Rondonia). **Environmental Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 1702–1717, 2019.
- [20] CROWTHER, T. W.; VAN DEN HOOGEN, J.; WAN, J.; *et al.* The global soil community and its influence on biogeochemistry. **Science**, v. 365, n. 6455, 2019.

## 2 Capítulo 1 - METANO, MICRÓBIOS E MODELOS EM PLANÍCIES ALUVIAIS AMAZÔNICAS: ESTADO-DA-ARTE E PERSPECTIVAS<sup>1</sup>

### RESUMO

Os ecossistemas das planícies aluviais amazônicas incluem áreas abertas e sistemas florestais e agrícolas intermitentes com diferentes tipos de água. Tais ecossistemas constituem uma fonte natural significativa de CH<sub>4</sub> nos trópicos. Quando os solos são inundados e se tornam anóxicos anaeróbios, o CH<sub>4</sub> é produzido por metanogênese, enquanto a oxidação aeróbica e anaeróbica do CH<sub>4</sub> mediada por micro-organismos serve como o principal sumidouro biológico deste gás causador de efeito estufa. As medições das taxas e controles da produção e emissão de CH<sub>4</sub> na bacia amazônica provêm principalmente de estudos feitos em zonas úmidas isoladas e lagos de planície de inundação. Do mesmo modo, comunidades microbianas nesses *habitats* de planícies aluviais amazônicas foram estudadas em lagos isolados com base em análises de sequências específicas de DNA. Os modelos existentes de emissão de CH<sub>4</sub> em planícies aluviais da Amazônia concentram-se nas propriedades do solo ou envolvem fatores tais como pH, potencial redox, ou substratos. Nenhum destes modelos incorpora a inundação sazonal de forma adequada, nem a microbiota o faz como um componente. Neste sentido, este capítulo destaca como os esforços já desenvolvidos contribuíram para compreender a emissão de CH<sub>4</sub> e as suas ligações com fatores abióticos e bióticos nas planícies aluviais da Amazônia, bem como enfatizará a necessidade de encorajar a cooperação e a troca de experiências entre equipes de investigação, utilizando diferentes abordagens e métodos científicos.

Palavras-chave: emissão de metano; metanogênese; metanotrofia; modelagem matemática.

Este capítulo foi publicado como parte do livro: *Changing Ecosystems and Their Services*

<sup>1</sup>Dayane Juliate Barros, Marília de Souza Bento, Murilo de Souza Ferreira, Janaina Braga do Carmo, Rogério Hartung Toppa, Vania Neu, Maria Bernadete Amâncio Varesche, Paula Benevides de Moraes and Acacio Aparecido Navarrete (December 11th 2019). Methane, Microbes and Models in Amazonian Floodplains: State of the Art and Perspectives, *Changing Ecosystems and Their Services*, Levente Hufnagel, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.90247.

## 2.1 Introdução

A floresta amazônica, notoriamente conhecida por sua vasta biodiversidade, é um ecossistema único e exerce papel irrefutável na manutenção dos serviços ecossistêmicos globais. O bioma amazônico é um dos principais contribuintes para o funcionamento biogeoquímico do sistema terrestre [1]. Contribuindo para esse funcionamento está o solo que é considerado um dos compartimentos ambientais mais complexos e variáveis. A compreensão de processos biogeoquímicos mediados por micro-organismos nesse compartimento é de particular interesse em áreas inundáveis continentais, onde a ciclagem de nutrientes é altamente responsiva à hidrologia flutuante, e os gases produzidos no solo podem contribuir para alterações climáticas globais [2].

O  $\text{CH}_4$  é um dos principais gases causadores de efeito estufa. As zonas úmidas amazônicas são consideradas fonte significativa de emissão de  $\text{CH}_4$ . Além das emissões de gases de efeito estufa como o  $\text{CH}_4$ , as áreas úmidas oferecem uma gama diversificada de vegetação que permite o sequestro de C orgânico.

Variações no nível e no fluxo da água, juntamente com variações na temperatura e na carga de sedimentos, por exemplo, são os fatores mais importantes na condução da estrutura e funcionamento dos sistemas de inundação [3,4]. O pulso de inundação responsável por alterar as condições de saturação do solo favorece as condições anóxicas dos sistemas de planícies aluviais, tornando-as predispostas à atividade da comunidade microbiana anaeróbia. O  $\text{CH}_4$  é o produto da decomposição anaeróbia de matéria orgânica. A oxidação anaeróbia de  $\text{CH}_4$  pode ocorrer na presença de alguns aceptores de elétrons (ferro, manganês e sulfato) e formas nitrogenadas (nitrito e nitrato).

Esta revisão aborda primeiro a microbiota do solo e os mecanismos relacionados com a mesma como parte da dinâmica do ciclo do  $\text{CH}_4$ . Os tópicos iniciais incluem características microbianas, principalmente de sistemas saturados (por exemplo, metabolismo anaeróbio e interações com metais). O capítulo sintetiza estudos que avaliaram possíveis consequências em relação às alterações na hidrologia causadas pelas alterações climáticas. Subsequentemente, é relatada uma síntese das diferentes abordagens integradas: biogeoquímica, isótopo e metagenômica do solo, revelando a importância de se fazer a interface entre diferentes metodologias para desenvolver uma representação mais fidedigna desse sistema. O capítulo termina com a identificação dos conhecimentos sobre os modelos de

emissões nas planícies aluviais amazônicas, bem como sugere a incorporação de novas variáveis nesses modelos.

## 2.2 Ciclo biogeoquímico do CH<sub>4</sub>

Os ciclos biogeoquímicos globais são impulsionados principalmente por micro-organismos que possuem como base alimentar compostos de um átomo de C, como o metano (CH<sub>4</sub>) ou dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) [5]. O CH<sub>4</sub> é o hidrocarboneto mais abundante na atmosfera [6]. Devido às suas características de absorção, o CH<sub>4</sub> manifesta forçamento radiativo positivo, sendo um gás causador de efeito estufa que contribui para a regulação da temperatura na superfície do planeta. Acredita-se que o CH<sub>4</sub> seja responsável por 17% do aquecimento global [7], levando em consideração as reações químicas indiretas deste gás com aerossóis. O Potencial de Aquecimento Global (do inglês *Global Warming Potential*, GWP) é estimado ser 25 vezes superior ao GWP do CO<sub>2</sub> [8,9] ao longo de um horizonte de 100 anos.

O interesse pelas estimativas das emissões de CH<sub>4</sub> em florestas tropicais tem crescido nos últimos anos, particularmente em áreas úmidas tais como as amazônicas [10-15] e o Pantanal [16-18]. Isto deve-se ao fato das maiores fontes naturais de CH<sub>4</sub> serem as zonas úmidas [19], contribuindo com 177 a 284 Tg CH<sub>4</sub> por ano [7]. As áreas úmidas são as maiores e mais incertas fontes de CH<sub>4</sub> para a atmosfera [20]. Técnicas de sensoriamento remoto empregando observações visíveis, infravermelho e de micro-ondas oferecem vários graus de sucesso no fornecimento de estimativas quantitativas de áreas úmidas, extensão de inundação e monitoramento de variações naturais e antropogênicas nesses ambientes [21]. Outro fator que pode contribuir para essa incerteza é a variabilidade interanual da coluna d' água atrelada a lagos, rios que influenciam diretamente nas áreas inundáveis vinculadas a eles.

As áreas úmidas possuem uma grande capacidade de sequestrar e armazenar C, o que justifica o crescente interesse por estudar a produção e consumo desse gás nesses ecossistemas. O sequestro de C refere-se à remoção de CO<sub>2</sub> da atmosfera, transferência e acúmulo no reservatório de terras úmidas como matéria orgânica do solo. Ou seja, o sequestro de C em áreas úmidas está relacionado à remoção fotossintética de CO<sub>2</sub> por organismos produtores e a sua conversão em celulose e outras formas de C, e posteriormente, a transformação de detritos em matéria orgânica do solo [22]. Essa capacidade de atuar na ciclagem do C, além de todos os outros serviços ecossistêmicos desempenhados por esses

ecossistemas, os tornam componentes críticos na compreensão de estoques locais, regionais e globais de C, capaz de influenciar no balanço do CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e outros gases causadores do efeito estufa.

As planícies aluviais são definidas como ambientes sazonalmente inundados ou saturados em virtude da elevação da água subterrânea ou superficial, permanecendo assim durante um período do ano ou ao longo de todo o ano [3]. De acordo com [Junk et al., 1989], a inundação de planícies ao longo dos rios tende a ocorrer como um único pulso de inundação anual que dura meses. Nessas planícies, a inundação também pode levar ao aumento de insumos alóctones de C, tornando-os essenciais à teia alimentar e alvo de interesse da comunidade científica.

O CH<sub>4</sub> é produzido por micro-organismos pertencentes ao Domínio *Archaea*, no estágio terminal de fermentação da matéria orgânica em ambientes anaeróbios [23], os quais desempenham papel fundamental na biodegradação da matéria orgânica [24]. No entanto, apenas uma fração do CH<sub>4</sub> produzido é emitido para a atmosfera, o restante é utilizado por micro-organismos oxidadores de CH<sub>4</sub>, denominados metanotróficos. Não existe um consenso na literatura sobre a porcentagem de CH<sub>4</sub> assimilada por esses micro-organismos. Existindo assim uma grande variabilidade nas estimativas da fração de CH<sub>4</sub> produzido (10 a 100%) por micro-organismos anaeróbios sendo oxidados em CO<sub>2</sub> antes de atingir a atmosfera [25].

Parte da compreensão atual da dinâmica do CH<sub>4</sub> em áreas inundáveis possui como embasamento a premissa de que a maior parte da oxidação do CH<sub>4</sub> ocorre em condições aeróbias. No entanto, estudos recentes indicam a atuação de vários outros aceptores de elétrons na oxidação anaeróbia do metano, incluindo nitrato, nitrito, ferro e manganês [5, 26-32]. Pesquisas apontam ainda substâncias húmicas atuando como acceptor terminal de elétrons em área inundável tropical [33]. Em estudos anteriores [32, 34], ao tentarem justificar a predominância de estudos que abordem a oxidação do CH<sub>4</sub> exclusivamente por via aeróbia, consideraram o fato do sulfato ter sido por muito tempo o único acceptor de elétrons envolvido com a oxidação do CH<sub>4</sub> em ambientes anóxicos, uma vez que a concentração de sulfato é geralmente muito baixa em ambientes de água doce para desempenhar um papel na oxidação anaeróbia do CH<sub>4</sub>. A contribuição da oxidação anaeróbia de CH<sub>4</sub> para o processo de metanotrofia não está completamente elucidado, mas o crescente aumento de publicações validando a informação mostra que esse mecanismo parece ser mais comum do que se pensava anteriormente.

Por sua vez, a metanogênese ocorre quando aceptores de elétrons energeticamente favoráveis como o oxigênio, nitrato, sulfato e ferro estão ausentes ou foram esgotados [35]. Na ausência de oxigênio, a decomposição completa de compostos orgânicos complexos requer interações sintróficas do sistema, em passos individuais no processo global [36]. Uma ação sequencial que envolve as etapas de hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese [37]. Portanto, as muitas guildas microbianas envolvidas nesses processos, incluem micro-organismos hidrolíticos, fermentativos sintróficos, acetogênicos e metanogênicos.

As bactérias e fungos são responsáveis por realizar a quebra de moléculas complexas durante a hidrólise, como polissacarídeos, proteínas e suas unidades formadoras (aminoácidos, ácidos graxos e álcoois) [38]. Na etapa de acidogênese, os micro-organismos fermentativos convertem os substratos simples em ácidos graxos voláteis (AGV) como acetato, propionato e butirato); álcoois (tais como etanol e butanol);  $H_2$  e  $CO_2$  [39]. Na acetogênese, os AGV e álcoois produzidos, como propionato, butirato e etanol, são convertidos em acetato,  $H_2$  e  $CO_2$  por bactérias acetogênicas [39]. E, por fim, os metanogênicos convertem acetato,  $H_2/CO_2$ , formiato e compostos metilados em  $CH_4$ .

### 2.3 Microbiota envolvida na ciclagem de $CH_4$

A quantidade de  $CH_4$  emitido a partir de um ecossistema é resultante do equilíbrio entre a produção de  $CH_4$  (metanogênese) e o consumo (oxidação) desse gás (metanotrofia). Por conseguinte, a emissão de  $CH_4$  para a atmosfera é determinada por atividades de micro-organismos metanogênicos e metanotróficos.

As *Archaea* metanogênicas têm sido detectadas em uma ampla gama de ambientes, incluindo sedimentos de água doce, lagos hipersalinos, arrozais, digestores anaeróbios, *permafrost*, aterros sanitários, entre outros. Elas possuem uma enzima única chamada metil-coenzima M redutase (*Mcr*) que as tornam especializadas em produzir  $CH_4$  [39]. Este grupo de micro-organismos apresenta elevada diversidade em morfologia e parâmetros fisiológicos [40].

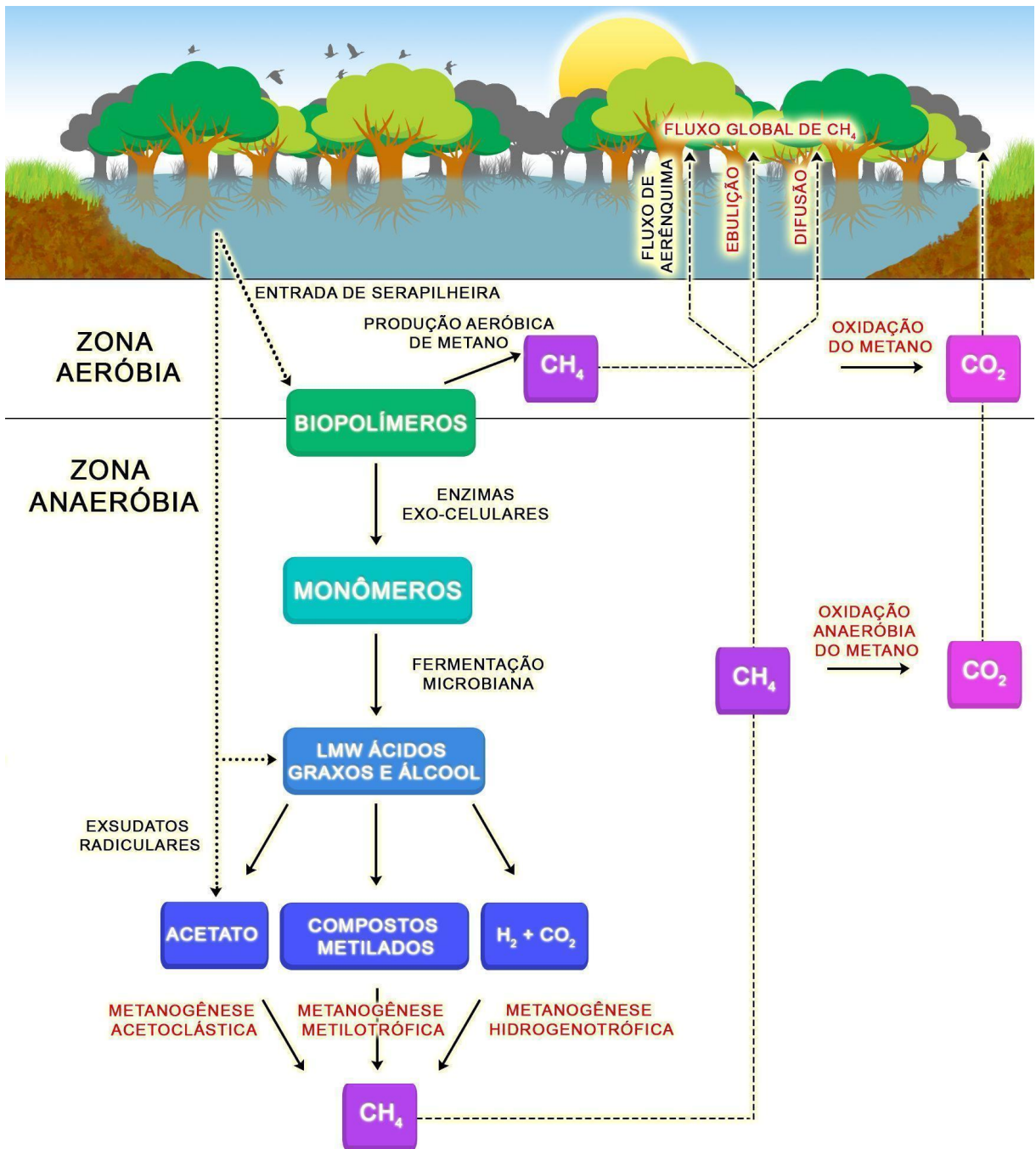
Os micro-organismos metanogênicos pertencem ao filo *Euryarchaeota* e até recentemente foram classificados em sete ordens (*Metanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanocellales*, *Methanopyrales* e *Methanomassiliicoccales*). A descoberta do agrupamento de genes da coenzima *Mcr* da

metanogênese na *Bathyarchaeota* e, posteriormente, *Verstraetearchaeota*, levou a uma mudança de paradigma, demonstrando que a origem evolutiva da metanogênese é anterior ao filo *Euryarchaeota* [41].

O metabolismo das *Archaea* metanogênicas ganha energia reduzindo compostos de C (como CO<sub>2</sub>, formiato, acetato, metanol, etanol, metilaminas e sulfuretos de metila) ao CH<sub>4</sub> [23]. Assim, as linhagens metanogênicas tradicionais são amplamente caracterizadas como hidrogenotrófica, acetoclástica e metilotrófica com base em uso de substrato. Na maioria dos casos, as vias produtoras de metano no ambiente são determinadas pelo sequenciamento de DNA dos micro-organismos metanogênicos correspondentes [23]. O passo final em todas essas vias é comum e envolve a conversão da metil-S-CoM em CH<sub>4</sub> pela metil-coenzima *Mcr* [42].

Levando em consideração a via de produção (Figura 1), os micro-organismos metanogênicos hidrogenotróficos são conhecidos por oxidar H<sub>2</sub>, formiato ou alguns álcoois simples e reduzem o CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub> [43]. A maioria dos micro-organismos metanogênicos descritos é hidrogenotrófica. Os metanogênicos acetoclásticos dividem o acetato para formar CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>. Eles são encontrados em *habitats* onde os micro-organismos metanogênicos hidrogenotróficos reduzem os níveis de H<sub>2</sub> o suficiente para criar as condições necessárias para altos níveis de formação de acetato. Os micro-organismos metanogênicos metilotróficos são comuns em sedimentos marinhos e hipersalinos ricos em sulfato, onde utilizam compostos metilados como trimetilamina, sulfato de dimetila e metanol [44]. Em contraste, em sedimentos de ambientes de água doce até o momento acredita-se que a metanogênese metilotrófica seja de pouca importância, embora não seja isso que resultados recentes, ainda não publicados, têm revelado para as áreas inundáveis da Amazônia. No entanto, o mesmo raciocínio utilizado para a metanotrofia anaeróbia pode estar ocorrendo nesse caso.





**Figura 1.** Ilustração conceitual da produção e consumo de  $\text{CH}_4$  antes da liberação atmosférica em ecossistemas de zonas úmidas. Os micro-organismos degradam o material orgânico complexo no sistema anóxico por um processo de várias etapas, resultando em  $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$  como produtos. Adaptado de [34].

Os compostos metílicos, especialmente o metanol, podem desempenhar um papel subestimado como contribuintes para a produção de  $\text{CH}_4$  em áreas úmidas [44]. Embora a utilização de metanol na presença de hidrogênio tenha sido observada entre *Archaea* metanogênicas, esse substrato raramente é testado durante a descrição de novas espécies. Essa

falta de informação representa um sério obstáculo à análise das habilidades metabólicas de *Archaea* metanogênicas [45].

Meyer *et al.* [46] utilizaram abordagem metagenômica para avaliar a abundância relativa de genes envolvidos na ciclagem de CH<sub>4</sub> em ambientes de floresta e pastagem na Amazônia Ocidental e mostraram a metanogênese de compostos metilados mais abundantemente em pastagens. Os metilotróficos do solo chamam a atenção para o papel central desses organismos nas conversões globais de metanol, que se origina principalmente de plantas [47], liberado tanto de material vivo como de material vegetal em decomposição [48]. A microbiota do solo é um componente essencial da decomposição vegetal e da formação de matéria orgânica. Assim, o conhecimento dessas comunidades assim como do material decomposto é essencial para a elucidação da dinâmica desses ambientes.

A literatura menciona que em planícies aluviais tropicais as vias microbianas predominantes na produção de CH<sub>4</sub> são acetoclástica e hidrogenotrófica [49,50]. No entanto, Alves [51] ao avaliar o enriquecimento de amostras de floresta primária e secundária e pastagens na Amazônia indicou uma maior produção de CH<sub>4</sub> pelas vias acetoclástica e metilotrófica.

Nas áreas inundáveis, conhecidas por apresentar altas taxas metanogênicas, as bactérias metanotróficas são responsáveis por catalisar a oxidação do CH<sub>4</sub> nas interfaces aeróbio-anaeróbio. As bactérias metanotróficas são capazes de utilizar o CH<sub>4</sub> como sua única fonte de C [52], e podem ser divididas em quatro grupos: *Gammaproteobacteria* (frequentemente referidos como Tipo I ou Tipo X), *Alphaproteobacteria* (anteriormente conhecido como Tipo II), *Verrucomicrobia* e membros do filo *NC10* [53].

A atividade metanotrófica só é viável em virtude de uma enzima conhecida como metano monooxigenase (MMO), que ocorre em duas formas distintas: particulada (pMMO) dentro de uma membrana intracelular ou solúvel (sMMO) no citoplasma. Ambas convertem CH<sub>4</sub> no produto prontamente assimilável, o metanol [54].

A oxidação do CH<sub>4</sub> tem se revelado um importante sumidouro desse gás produzido por sedimentos na Amazônia, reduzindo a quantidade de CH<sub>4</sub> que chega à atmosfera [8,55].

A diversidade dos micro-organismos pertencentes ao Domínio *Archaea*, capazes de metabolizar CH<sub>4</sub>, tende a aumentar em um futuro próximo devido a descobertas adicionais em levantamentos utilizando abordagem metagenômica e outras abordagens cada vez mais

robustas para o estudo da diversidade microbiana. Isso pode muito bem resolver a história evolutiva atualmente ambígua dessa importante função metabólica [23].

## **2.4 Influência da hidrologia nas planícies aluviais tropicais**

As planícies aluviais estão entre os ecossistemas mais dinâmicos, sendo constituído por um mosaico de *habitats* com altas taxas de rotatividade espaço-temporal [4,56]. A interação complexa entre a topografia da planície de inundação e a variação no fluxo do rio e no transporte de sedimentos mantém um gradiente distinto de conectividade hidrológica lateral, o que facilita a coexistência de numerosas espécies aquáticas e terrestres [4].

Esses locais apresentam estratigrafia altamente heterogênea produzida por meandros ativos de rios e deposição de sedimentos; materiais dominantes de granulometria grossa são intercalados com sedimentos mais finos e a matéria orgânica é depositada, levando a zonas distintas de condições óxicas ou anóxicas dentro da sub-superfície [57]. As variações regionais nas emissões de CH<sub>4</sub> de água doce são fatores importantes que devem ser considerados para garantir estimativas globais confiáveis. Os estoques de C assim como as diferentes classes de matéria orgânica ainda precisam ser elucidados para que diminuam as limitações na construção de modelos de ciclagem de C nesses ambientes. As variações hidrológicas são responsáveis por determinar a intensidade e duração das condições aeróbias. Alterações nessas condições podem aumentar ou diminuir as taxas de decomposição da matéria orgânica [58].

Áreas úmidas colombianas foram avaliadas e mostraram que os ecossistemas estudados são valiosos sumidouros de C, e a hidrogeomorfologia atua como um fator importante para o armazenamento de C nesses ecossistemas [59]. Dalmagro *et al.* [18], ao avaliarem a maior área inundável tropical do mundo, o Pantanal, revelaram que eles são potencialmente grandes sumidouros de C, e que o balanço de C foi impulsionado pela dinâmica sazonal de precipitação e inundação da superfície que afetaram as fases anaeróbia e aeróbia do solo. A avaliação do comportamento de uma área de inundação de água doce com período médio usual de inundação de 6 meses por ano, localizada em um parque nos EUA, mostrou que o meio ambiente tornou-se fonte de CO<sub>2</sub> ao passar por um período de inundação prolongado (17 meses). Além disso, as evidências sugerem que a magnitude dos ciclos

úmidos e secos pode ter efeitos significativos na emissão de gases causadores de efeito estufa [60].

Planícies aluviais são ambientes adaptados a variações do nível de água, ao que parece as comunidades microbianas podem ser adaptadas a essas flutuações e apresentam capacidade de permanecer em estado de latência até a próxima inundação. Hernandez *et al.* [61] demonstraram que em solos florestais amazônicos a propensão para a produção de CH<sub>4</sub> (em laboratório) foi melhor observada em relação à duração da fase de latência. Solos que nunca foram inundados (floresta seca) apresentaram essa fase mais longa do que locais que estavam permanentemente inundados. Em estudo de laboratório que avaliou diferentes níveis de frequências de inundação também observaram diferenças na composição, mas um aumento na diversidade sob condições de maior saturação hídrica foi relatado [62].

Planícies aluviais estão entre os ecossistemas mais ameaçados do mundo por causa de atividades antropogênicas, especialmente em países em desenvolvimento, onde a alta pressão por áreas agrícolas impulsiona o desmatamento. Uma ameaça adicional a esses ecossistemas está no aumento de temperaturas terrestres advindo do aquecimento global, gerando um ciclo de mudança no regime hídrico que conseqüentemente pode alterar a capacidade de armazenamento de C em ecossistemas de zonas húmidas [63].

## **2.5 Sensibilidade das planícies aluviais às mudanças climáticas**

Projeções atuais sugerem que as taxas de emissões de gases causadores de efeito estufa a partir de áreas inundáveis aumentarão à medida que a temperatura média global continuar a subir, e isso é de particular importância em sistemas temperados e tropicais. O metabolismo do CH<sub>4</sub> em áreas úmidas é fortemente influenciado por fatores ambientais que possuem uma variabilidade tanto espacial quanto temporal. A produção e o consumo de gases causadores de efeito estufa são parcialmente regulados por processos microbianos, que por sua vez são influenciados pela umidade e temperatura do solo [64]. Nos solos, a taxa de produção de CH<sub>4</sub> mediada por micro-organismos geralmente mostra uma relação exponencial com a temperatura do ar, com o pico da taxa correspondendo às temperaturas de 25 a 30°C [65].

As zonas úmidas provavelmente se tornarão as principais fontes líquidas de C sob efeito de aquecimento das condições climáticas em décadas [64]. Sanches *et al.* [66],

determinaram os fatores cruciais relacionados à emissão de CH<sub>4</sub> em águas de lagos em larga escala observando padrões de emissões em diferentes zonas climáticas. As zonas climáticas com temperaturas médias do ar mais elevadas apresentaram as taxas mais altas de emissão.

Espera-se que as mudanças climáticas nas áreas úmidas tropicais causem um aumento na temperatura e uma mudança nos padrões de precipitação, aumentando a duração da estação seca, mas também aumentando a intensidade dos eventos de precipitação. Dadas essas previsões, o balanço atual e futuro de áreas tropicais inundadas sazonalmente ainda é incerto. Em estudo realizado durante os anos de 2014 a 2016 na maior área úmida contínua do mundo, o Pantanal brasileiro, foi demonstrada a resposta do CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> à dinâmica hidrológica desse ecossistema [18]. As medições revelaram que as emissões de CH<sub>4</sub> aumentaram rapidamente logo que as condições anaeróbias foram estabelecidas, com os maiores fluxos de emissão de CH<sub>4</sub> tendo sido sempre observados quando os valores de potencial redox do solo foram menores que -100 mV. Em suma, os dados indicaram que as florestas tropicais do Pantanal inundadas sazonalmente são potencialmente grandes sumidouros de C, e fontes expressivas de CH<sub>4</sub> quando as condições anaeróbias dominam o solo (período inundado). É válido ressaltar que as medições realizadas contemplam emissões de troncos de árvores, fluxos do solo, ebulição e difusão a partir da superfície da água, uma vez que a metodologia utilizada foi uma torre de pesquisa de 20 m de altura, juntamente com sensores ambientais. Uma pesquisa recente sugere que as emissões de CH<sub>4</sub> de galhos de árvores é a fonte dominante de emissão regional de CH<sub>4</sub> para ambientes de florestas tropicais inundadas [11].

## **2.6 Emissões de CH<sub>4</sub> em áreas inundáveis: biogeoquímica, assinatura isotópica e metagenômica**

Compreender o nível de sensibilidade das áreas de inundação em resposta às mudanças climáticas requer esforços para que seja melhor elucidada. Para tanto, é necessário mais conhecimento em todos os níveis, desde a ecofisiologia unicelular até o funcionamento biogeoquímico *in situ* e *ex situ*. Assim, esforços em prol de cultivar em laboratório micro-organismosfastidiosos, avaliação da microbiota com métodos independentes de cultivo, além da combinação dessas abordagens com determinações isotópicas e caracterização físico e química do solo e da água são necessários para alcançar um entendimento dos processos mediados por micro-organismos nestes ambientes [67].

É um desafio para os pesquisadores projetar experimentos e adotar métodos que possam detectar a ciclagem de C em planícies aluviais. Uma das abordagens utilizadas é a caracterização das comunidades microbianas no espaço e tempo a partir do sequenciamento de DNA ou RNA e a construção de matrizes de correlação das abundâncias relativas de grupos taxonômicos e funcionais microbianos com variáveis ambientais [68]. Independentemente do método de estudo, a caracterização precisa refletir a escala correta para a pergunta que se pretende responder e deve conter quantidade de réplicas suficiente para fornecer dados significativos [69].

Estudos metagenômicos indicam alta redundância funcional em áreas inundáveis [70]. Embora saibamos que as comunidades microbianas são diversas, os métodos baseados em DNA podem inflacionar artificialmente estimativas de redundância funcional [69]. Esse fato se deve a abordagem baseada em DNA não conseguir distinguir entre células dormentes e ativas [70].

Diferentes respostas foram encontradas ao avaliar o efeito do aumento da salinidade na composição da comunidade microbiana total (DNA) e ativa (RNA) em um reator anaeróbio [71]. A concentração e o tempo de exposição afetaram fortemente a comunidade microbiana e, especialmente, os filotipos de *Archaea* ao nível do RNA, tanto em termos de diversidade global como de filotipos específicos.

A avaliação de condições de sobrevivência de *Archaea* metanogênicas sob condições aeradas em campos inundados cultivados com arroz, revelaram a composição da comunidade ativa indicando que mecanismos desconhecidos mantêm a estabilidade da comunidade nesses ambientes até um ano após o início da drenagem [72].

Os isótopos estáveis têm sido utilizados há muito tempo como ferramenta para investigar os processos ambientais e suas relações com micro-organismos, as quais podem ser estabelecidas por vias metabólicas [73]. O mérito dos isótopos de C reside na sua taxa de câmbio relativamente lenta para muitos minerais que contêm C e em fracionamentos relativamente grandes, mesmo a altas temperaturas. Estas duas propriedades tornam os isótopos de C um excelente gravador de processos geológicos e permitem uma melhor compreensão das fontes de C e fluxos voláteis relacionados em escalas de tempo geológicas [74]. Estamos passando por uma reformulação das abordagens isotópicas com base no aumento crescente de bancos de dados genômicas e transcriptômicas, e mais recentemente tecnologias com aquisição, processamento e avaliação de dados de

espectrometria de massa e instrumentais aprimorados [73]. Para [75], a incorporação de isótopos estáveis para dentro da biomassa microbiana permite a recuperação de ácidos nucleicos marcados a partir de micro-organismos ativos. A combinação de isótopos estáveis com metagenômica fornece acesso a genomas de micro-organismos envolvidos em processos metabólicos de interesse.

Os fluxos de  $\text{CH}_4$  em ambientes terrestres e aquáticos têm sido avaliados de diversas maneiras, mas em geral o monitoramento da acumulação de gás nas câmaras de fluxos têm sido a metodologia predominante até o momento. Esta metodologia é conceitualmente simples e não requer equipamentos de campo caros, mas é trabalhosa, baseando-se principalmente na amostragem manual [17].

## 2.7 Modelagem matemática

Para melhorar a previsão de modelos climáticos é importante entender os mecanismos pelos quais os micro-organismos regulam o fluxo de gases de efeito estufa terrestre. Isso envolve a consideração das interações complexas que ocorrem entre os micro-organismos e outros fatores bióticos e abióticos do ambiente. O potencial para mitigar a mudança climática reduzindo as emissões de gases de efeito estufa através do gerenciamento de processos microbianos terrestres é uma perspectiva de elevada importância para o futuro [18].

Apesar dessa importância, no entanto, as áreas inundáveis tropicais estão pouco representadas em modelos globais para prever as emissões globais de  $\text{CH}_4$ . Um primeiro passo no desenvolvimento de um modelo baseado em processo de emissão de  $\text{CH}_4$  em áreas de inundação tropical para aplicações globais foi documentado em 2014. Para isso, o Modelo de Vegetação Global Dinâmica da LPXBern (LPX) foi ligeiramente modificado para representar a hidrologia da planície de inundação, a vegetação e a emissão de  $\text{CH}_4$  associada. A extensão das áreas inundáveis tropicais foi prescrita usando a produção do modelo de hidrologia espacialmente explícito PCR-GLOBWB. Foram introduzidas diversas variáveis ao modelo, como vegetação, a cobertura do solo (com base em dados obtidos por sensoriamento remoto), as densidades de fluxo de  $\text{CH}_4$  simuladas foram avaliadas contra observações de campo e inventários de fluxo regional.

Contudo, a microbiota do solo não foi considerada como componente na modelagem. As emissões simuladas de  $\text{CH}_4$  na escala da Bacia Amazônica foram comparadas às simulações de modelos realizadas anteriormente. Assim, foi descoberto que este modelo LPX reproduz a magnitude média das densidades líquidas de fluxo de  $\text{CH}_4$  observadas para a Bacia Amazônica. No entanto, o modelo não reproduz a variabilidade entre sítios de amostragem ou entre anos dentro de um sítio, considerando-se que as informações do sítio são muito limitadas para atestar ou refutar alguns recursos do modelo. Na escala da Bacia Amazônica, os resultados obtidos com a promoção deste modelo sublinham a grande incerteza na magnitude das emissões de  $\text{CH}_4$  de áreas inundáveis.

As análises de sensibilidade forneceram esclarecimentos sobre os principais direcionadores da emissão de  $\text{CH}_4$  da planície de inundação e suas incertezas associadas. Devido a uma limitação intrínseca do LPX para considerar a sazonalidade na extensão da várzea, o modelo não conseguiu reproduzir a dinâmica total das emissões de  $\text{CH}_4$ , levantando diversas questões científicas. Embora este modelo inclua mais mecanismos específicos para as áreas inundáveis tropicais, não foi possível reduzir a incerteza na magnitude das emissões de  $\text{CH}_4$  da bacia amazônica. Assim, justificando a necessidade de mais pesquisas para restringir as emissões de  $\text{CH}_4$  e sua variabilidade temporal [15].

No mesmo ano, Potter e colaboradores [76] desenvolveram um novo modelo que buscava estimar sazonalmente a dinâmica de C e emissões de  $\text{CH}_4$  de ecossistemas inundáveis na Amazônia. O modelo de simulação de zonas úmidas amazônicas levou em consideração três componentes principais: a) detalhamento do tipo de vegetação nas zonas úmidas e mudanças no nível da água, temperatura e oxigênio dissolvido, (b) produção primária, acúmulo de massa e decaimento da serapilheira em solos e sedimentos, e (c) vias de produção e transporte de  $\text{CH}_4$  através da coluna d'água para a atmosfera.

O modelo apresentado baseia-se na entrada dos seguintes dados para simulações em um determinado ambiente inundado na Amazônia: latitude e longitude, tipos de vegetação como frações de cobertura das áreas, temperatura superficial diária, fluxo de irradiação solar, velocidade do vento, precipitação, profundidade diária da água, valores da produção de biomassa para macrófitas flutuantes e dados do índice de vegetação por satélite para ecossistemas de florestas inundadas. Para melhorar a generalidade e uso desse modelo, a incorporação de simulações de mistura vertical, trocas horizontais e vários processos



biogeoquímicos são necessários. Além disso, o componente microbiota não é diretamente relatado.

Em 2016, [77] ao avaliarem as concentrações atmosféricas de  $\text{CH}_4$  na Bacia Amazônica nos anos de 2010 e 2011 utilizaram além de um modelo de transporte químico atmosférico em 3D (TOMCAT), dois modelos de emissão em áreas úmidas [78,79] para reduzir a incerteza sobre as emissões de  $\text{CH}_4$ . O primeiro conjunto de emissões de terras úmidas e arrozais foi derivado do método descrito por [79]. O método utiliza satélite para avaliar a variação de C disponível para a metanogênese, o que leva a uma representação mais precisa do momento das emissões de  $\text{CH}_4$ . No entanto, os dados de satélite não podem distinguir entre as emissões microbianas de  $\text{CH}_4$  das áreas úmidas naturais e as emissões antropogênicas do cultivo de arroz. O segundo modelo (*Joint UK Land Environment Simulator – JULES*, versão 3.4.1) [78] simula a superfície terrestre em termos de variações de carbono, água e energia e inclui um fluxo de metano em áreas úmidas como componente, baseado em [80]. O fluxo de  $\text{CH}_4$  é dependente do substrato disponível de C, a temperatura, e a fração considerada úmida. As estimativas utilizadas através dos dois modelos de emissões de áreas úmidas são baseadas em processos e mostraram comportamentos semelhantes quando o modelo atmosférico é comparado às observações, independente de qual modelo foi utilizado [77].

No mesmo ano (2016), outro trabalho sobre modelagem de  $\text{CH}_4$  foi desenvolvido, trazendo à tona a discussão do quanto as melhorias nos modelos de  $\text{CH}_4$  seriam benéficas para os modelos do sistema terrestre e para a simulação adicional dos *feedbacks* do ciclo clima-C. Nas últimas quatro décadas, vários modelos numéricos foram desenvolvidos para quantificar a magnitude, investigar as variações espaciais e temporais e compreender os mecanismos subjacentes e os controles ambientais do  $\text{CH}_4$  (fluxos de  $\text{CH}_4$  em ecossistemas terrestres). Esses modelos de  $\text{CH}_4$  também são usados para a integração de dados  $\text{CH}_4$  em escala múltipla, como incubação e análise molecular baseadas em laboratório, experimentos observacionais de campo, sensoriamento remoto e medições baseadas em aeronaves em vários ecossistemas terrestres. Os autores observaram que existem grandes discrepâncias entre modelos em termos de representação dos processos de  $\text{CH}_4$  e seus controles ambientais; e, dados significativos, como as incompatibilidades de modelos, são parcialmente atribuídos a diferentes representações da caracterização da paisagem e da dinâmica de inundação.

Assim, os modelos de CH<sub>4</sub> devem representar mais explicitamente os mecanismos subjacentes à troca de CH<sub>4</sub> terra-atmosfera, com ênfase na melhoria e validação de processos individuais de CH<sub>4</sub> sobre profundidade e espaço horizontal. Assim, devem ser desenvolvidos modelos capazes de simular as emissões de CH<sub>4</sub> em escalas espaciais e temporais altamente heterogêneas, particularmente em *hotspots*; e, esforços devem ser investidos para desenvolver modelos de *benchmarking* (uma modelagem baseada em análises comparativas) que possam ser facilmente utilizados para melhoria, avaliação e integração com dados de escalas moleculares a globais [81].

Modelos de previsão amplamente aplicáveis e robustos devem ser desenvolvidos a partir de grandes conjuntos de dados gerados através da colaboração de cientistas em todo o mundo. Para atingir alta precisão de previsão, esses conjuntos de dados devem abranger uma ampla variedade de informações e variáveis nas mais diferentes escalas das planícies aluviais tropicais dentro das regiões e globalmente.

## 2.8 Considerações finais

Este capítulo sintetiza os principais progressos na investigação científica aplicada à compreensão da dinâmica do CH<sub>4</sub> nas planícies aluviais tropicais. Aqui, nos concentramos em uma abordagem integradora dos principais aspectos do ciclo C, descrevendo métodos baseados em observações sobre a superfície da Terra. Contudo, uma melhor compreensão da metanogênese metilotrófica e da oxidação anaeróbia do CH<sub>4</sub> ainda precisa de ser melhor esclarecida para estes ambientes. A próxima geração de modelos de emissão de CH<sub>4</sub> levará em conta a flutuação sazonal do nível de água e a atividade metanogênica e metanotrófica a ela associada. Este objetivo ousado só pode ser alcançado utilizando uma abordagem multi-analítica baseada numa sinergia de modelos, métodos estatísticos para a integração de dados e cooperação científica. Este esforço pode ajudar a criar um desenho único, no qual não só a biosfera e o *feedback* da modelação hidrológica, mas também a microbiota do solo será considerada no ciclo regional de C.

## Referências

- [1] Malhi Y, Roberts JT, Betts RA, Kileen TJ, Li W, Nobre CA. Climate change, deforestation, and the fate of the Amazon. **Science**. 2008;319(5860):169-172. DOI: 10.1126/Science.1146961
- [2] Kotsyurbenko OR, Glagolev MV, Merkel AY, Sabrekov AF, Terentieva IE. Methanogenesis in soils, wetlands, and peat. In: Stams AJM, Sousa D, editors. **Biogenesis of Hydrocarbons**, Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Switzerland: Springer Nature; 2019. p. 1-18. DOI: 10.1007/978-3-319-53114-4\_9-1
- [3] Junk W, Bayley PB, Sparks RE. **The flood pulse concept in river floodplain systems**. In: Dodge DP, editor. Proceedings of the International Large River Symposium (LARS). Ottawa, Canada: Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences; 1989. pp. 110-127
- [4] Tockner K, Pusch M, Borchardt D, Lorang MS. Multiple stressors in coupled river-floodplain ecosystems. **Freshwater Biology**. 2010;55(Suppl 1):135-151. DOI: 10.1111/j.1365-2427.2009.02371.x
- [5] Raghoebarsing AA, Pol A, Van De Pas-Schoonen KT, AJP S, Ettwig KF, WIC R, et al. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. **Nature**. 2006;440(7086):918-921. DOI: 10.1038/nature04617
- [6] Caldwell SL, Laidler JR, Brewer EA, Eberly JEDO, Sandborgh SC. Critical review anaerobic oxidation of methane: Mechanisms, bioenergetics, and the ecology of associated microorganisms. **Environmental Science & Technology**. 2008;42(18):6791-6799. DOI: 10.1021/es800120b
- [7] IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). **Summary for Policymakers**. In: Stocker TF, Qin D, Plattner GK, Tignor M, Allen S, Boschung J, Midgley P, editors. Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Cambridge: Cambridge University Press; 2013. p. 465-570
- [8] Crutzen PJ, Lelieveld JHI. Human impacts on atmospheric chemistry. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**. 2001;29:17-45. DOI: 10.1146/annurev.earth.29.1.17
- [9] Forster P, Ramaswamy V, Artaxo P, et al. **Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing**. In: Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, et al., editors. Climate change 2007: The physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge: Cambridge University Press; 2007
- [10] Engle D, Melack JM. Methane emissions from an Amazon floodplain lake: Enhanced release during episodic mixing and during falling water. **Biogeochemistry**. 2000;51(1):71-90. DOI: 10.1023/A:1006389124823

- [11] Pangala SR, Enrich-Prast A, Basso LS, Peixoto RB, Bastviken D, Hornibrook ERC, et al. Large emissions from floodplain trees close the Amazon methane budget. **Nature**. 2017;552(7684):230-234. DOI: 10.1038/nature24639
- [12] Barbosa PM, Farjalla VF, Melack JM, Amaral JHF, da Silva JS, Forsberg BR. High rates of methane oxidation in an Amazon floodplain lake. **Biogeochemistry**. 2018;137(3): 351-365. DOI: 10.1007/s10533-018-0425-2
- [13] Sawakuchi HO, Bastviken D, Sawakuchi AO, Krusche AV, Ballester MVR, Richey JE. Methane emissions from Amazonian rivers and their contribution to the global methane budget. **Global Change Biology**. 2014;20(9):2829-2840. DOI: 10.1111/gcb.12646
- [14] Melack JNM, Hess LL, Gastil M, Forsberg BRF, Hamilton SHK, Lima IBT. Regionalization of methane emissions in the Amazon basin with microwave remote sensing. **Global Change Biology**. 2004;10:530-544. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2003.00763.x
- [15] Ringeval B, Houweling S, Van Bodegom PM, Spahni R, Van Beek R, Joos F, et al. Methane emissions from floodplains in the Amazon basin: Challenges in developing a process based model for global applications. **Biogeosciences**. 2014;11(6):1519-1558. DOI: 10.5194/bg-11-1519-2014
- [16] Bastviken D, Santoro AL, Marotta H, Pinho LQ, Calheiros DF, Crill P, et al. Methane emissions from pantanal, South America, during the low water season: Toward more comprehensive sampling. **Environmental Science & Technology**. 2010;44(14):5450-5455. DOI: 10.1021/es1005048
- [17] Peixoto RB, Machado-Silva F, Marotta H, Enrich-Prast A, Bastviken D. Spatial versus day-to-day within-lake variability in tropical floodplain lake CH<sub>4</sub> emissions - developing optimized approaches to representative flux measurements. **PLoS One**. 2015;10(4): 1-11. DOI: 10.1371/journal.pone.0123319
- [18] Dalmagro HJ, Lathuillière MJ, Hawthorne, I. *et al.* Carbon biogeochemistry of a flooded Pantanal forest over three annual flood cycles. **Biogeochemistry**. 2018; 139; 1-18. DOI: 10.1007/s10533-018-0450-1
- [19] Saunois M, Bousquet P, Poulter B, Peregon A, Ciais P, Canadell JG, et al. The global methane budget 2000 – 2012. **Earth System Science Data**. 2016;8:697-751. DOI: 10.5194/essd-8-697-2016
- [20] Kirschke S et al. Three decades of global methane sources and sinks. **Nature Geoscience**. 2013;6(10):813-823. DOI: 10.1038/ngeo1955
- [21] Prigent C, Papa F, Aires F, Rossow WB, Matthews E. Global inundation dynamics inferred from multiple satellite observations, 1993 – 2000. **Journal of Geophysical Research Atmospheres**. 2007;112(D12107):1-13. DOI: 10.1029/2006JD007847
- [22] Lolu AJ, Ahluwalia AS, Sidhu MC, Reshi ZA. Carbon sequestration potential of macrophytes and seasonal carbon input assessment into the Hokersar wetland, Kashmir. **Wetlands**. 2019;39(3):453-472. DOI: 10.1007/s13157-018-1092-8

- [23] Evans PN, Boyd JA, Leu AO, Woodcroft BJ, Parks DH, Hugenholtz P, et al. An evolving view of methane metabolism in the Archaea. **Nature Reviews Microbiology**. 2019;17(4):219- 232. DOI: 10.1038/s41579-018-0136-7
- [24] Ghattas AK, Fischer F, Wick A, Ternes TA. Anaerobic biodegradation of (emerging) organic contaminants in the aquatic environment. **Water Research**. 2017;116:268-295. DOI: 10.1016/j. watres.2017.02.001
- [25] Cronan CS. Ecosystem Biogeochemistry. Springer Textbooks in Earth Sciences, Geography and Environment. Switzerland: Springer Nature; 2018. 203p. DOI: 10.1007/978-3-319-66444-6
- [26] Hu Z, Ma R. Distribution and characteristic of nitrite-dependent anaerobic methane oxidation bacteria by comparative analysis of wastewater treatment plants and agriculture fields in northern China. **PeerJ**. 2016;4:1-15. DOI: 10.7717/peerj.2766
- [27] Schubert CJ, Vazquez F, Lösekann-Behrens T, Knittel K, Tonolla M, Boetius A. Evidence for anaerobic oxidation of methane in sediments of a freshwater system (Lago di Cadagno). **FEMS Microbiology Ecology**. 2011;76(1):26-38. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2010.01036.x
- [28] Zehnder AJ, Brock TD. Anaerobic methane oxidation: Occurrence and ecology. **Applied and Environmental Microbiology**. 1980;39(1):194-204
- [29] Ettwig KF, Butler MK, Le Paslier D, Pelletier E, Mangenot S, Kuypers MMM, et al. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. **Nature**. 2010;464(7288):543-548. DOI: 10.1038/ nature08883
- [30] Shen L, Ouyang L, Zhu Y, Trimmer M. Active pathways of anaerobic methane oxidation across contrasting riverbeds. **The ISME Journal**. 2019;13(3):752-766. DOI: 10.1038/s41396-018-0302-y
- [31] Shi Y, Wang Z, He C, Zhang X, Sheng L, Ren X. Using <sup>13</sup>C isotopes to explore denitrification-dependent anaerobic methane oxidation in a paddy-peatland. **Scientific Reports**. 2017;7(40848):1-8. DOI: 10.1038/ srep40848
- [32] Segarra KEA, Schubotz F, Samarkin V, Yoshinaga MY, Hinrichs K, Joye SB. High rates of anaerobic methane oxidation in freshwater wetlands reduce potential atmospheric methane emissions. **Nature Communications**. 2015;6:1-8. DOI: 10.1038/ncomms8477
- [33] Valenzuela EI, Prieto-Davó A, López-Lozano NE, Hernández-Eligio A, Vega-Alvarado L, Juárez K, et al. Anaerobic methane oxidation driven by microbial reduction of natural organic matter in a tropical wetland. **Applied and Environmental Microbiology**. 2017;83(11):1-15. DOI: 10.1128/ AEM.00645-17
- [34] Bridgman SD, Cadillo-Quiroz H, Keller JK, Zhuang Q. Methane emissions from wetlands: Biogeochemical, microbial, and modeling perspectives from local to global scales. **Global Change Biology**. 2013;19(5):1325-1346. DOI: 10.1111/gcb.12131

- [35] Thauer RK, Kaster AK, Seedorf H, Buckel W, Hedderich R. Methanogenic archaea: Ecologically relevant differences in energy conservation. **Nature Reviews Microbiology**. 2008;6(8):579-591. DOI: 10.1038/nrmicro1931
- [36] Schink B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 1997;61(2):262-280. DOI: 1092-2172/97/\$04.0010
- [37] Batstone DJ, Keller J, Angelidaki I, Kalyuzhnyi SV, Pavlostathis SG, Rozzi A, et al. The IWA anaerobic digestion model No 1 (ADM1). **Water Science and Technology**. 2002;45(10):65-73. DOI: 10.2166/wst.2002.0292
- [38] Nakayama CR, Penteado ED, Duarte RTD, Giachini AJ, Saia FT. **Improved methanogenic communities for biogas production**. In: Treichel H, Fongaro G, editors. *Improving Biogas Production*. Cham: Springer; 2019. pp. 69-98. DOI: 10.1007/978-3-030-10516-7\_4
- [39] Zhang Y, Ma A, Zhuang G, Zhuang X. The acetotrophic pathway dominates methane production in Zoige alpine wetland coexisting with hydrogenotrophic pathway. **Scientific Reports**. 2019;9(1):9141. DOI: 10.1038/s41598-019-45590
- [40] Enzmann F, Mayer F, Rother M, Holtmann D. Methanogens: Biochemical background and biotechnological applications. **AMB Express**. 2018;8(1): 1-22. DOI: 10.1186/s13568-017-0531-x
- [41] Berghuis BA, Brian F, Schulz F, Blainey PC, Woyke T, Quake SR. Hydrogenotrophic methanogenesis in archaeal phylum Verstraetearchaeota reveals the shared ancestry of all methanogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (USA)**. 2019;116(11):5037-5044. DOI: 10.1073/pnas.1815631116
- [42] Borrel G, O'Toole PW, Harris HMB, Peyret P, Brugère JF, Gribaldo S. Phylogenomic data support a seventh order of methylotrophic methanogens and provide insights into the evolution of methanogenesis. **Genome Biology and Evolution**. 2013;5(10):1769-1780. DOI: 10.1093/gbe/evt128
- [43] Lyu Z, Shao N, Akinyemi T, Whitman WB. Methanogenesis. **Current Biology**. 2018;28(13):R727-R732. DOI: 10.1016/j.cub.2018.05.021
- [44] Jiang Z, Xiao OT, Kuznetsov VL, Edwards PP. Turning carbon dioxide into fuel. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**. 2010;368:3343-3364. DOI: 10.1098/rsta.2010.0119
- [45] Jabłoński S, Rodowicz P, Łukaszewicz M. Methanogenic archaea database containing physiological and biochemical characteristics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2015;65(2015):1360-1368. DOI: 10.1099/ij.s.0.000065

- [46] Meyer KM, Klein AM, Rodrigues JLM, Tringe SG, Mirza BS, Tiedje JM, et al. Conversion of Amazon rainforest to agriculture alters community traits of methane-cycling organisms. **Molecular Ecology**. 2017;26(6):1547-1556. DOI: 10.1111/ijlh.12426
- [47] Stacheter A, Noll M, Lee CK, Selzer M, Glowik B, Ebertsch L, et al. Methanol oxidation by temperate soils and environmental determinants of associated methylotrophs. **The ISME Journal**. 2012;7(5):1051-1064. DOI: 10.1038/ismej.2012.167
- [48] Morawe M, Hoeke H, Wissenbach DK, Lentendu G, Wubet T, Kröber E, et al. Acidotolerant bacteria and fungi as a sink of methanol-derived carbon in a deciduous forest soil. **Frontiers in Microbiology**. 2017;8(1361): 1-18. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01361
- [49] Conrad R, Noll M, Claus P, Klose M, Bastos WR, Enrich-Prast A. Stable carbon isotope discrimination and microbiology of methane formation in tropical anoxic lake sediments. **Biogeosciences**. 2011;8(3):795-814. DOI: 10.5194/bg-8-795-2011
- [50] Conrad R, Ji Y, Noll M, Klose M, Claus P, Enrich-Prast A. Response of the methanogenic microbial communities in Amazonian oxbow lake sediments to desiccation stress. **Environmental Microbiology**. 2014;16(6):1682-1694. DOI: 10.1111/1462-2920.12267
- [51] Alves KJ. **Communities of methanogenic Archaea in different uses of Amazonian soils** [dissertation]. Piracicaba: Luiz de Queiroz College of Agriculture (ESALQ); 2018
- [52] Strong PJ, Xie S, Clarke WP. Methane as a resource: Can the methanotrophs add value? **Environmental Science & Technology**. 2015;49(7):4001-4018. DOI: 10.1021/es504242n
- [53] Kalyuzhnyaya MG, Xing X, editors. **Methane Biocatalysis: Paving the Way to Sustainability**. Switzerland: Springer International Publishing; 2018. 312p. DOI: 10.1007/978-3-319-74866-5
- [54] Dalton H. The Leeuwenhoek lecture 2000: The natural and unnatural history of methane-oxidizing bacteria. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**. 2005;360(1458):1207-1222. DOI: 10.1098/rstb.2005.1657
- [55] Sawakuchi O, Ward ND, Borges CD, Tsai SIUM, Richey JE, Centen A, et al. Oxidative mitigation of aquatic methane emissions in large Amazonian rivers. **Global Change Biology**. 2016;22(3):1075-1085. DOI: 10.1111/gcb.13169
- [56] Stanford JA, Lorang MS, Hauer FR. The shifting habitat mosaic of river ecosystems. **SIL Proceedings**, 1922- 2010. 2005;29(1):123-136. DOI: 10.1080/03680770.2005.11901979
- [57] Boye K, Noël V, Tfaily M, et al. Thermodynamically controlled preservation of organic carbon in floodplains. **Nature Geoscience**. 2017;10:415-419. DOI: 10.1038/ngeo2940
- [58] Beringer J, Livesley SJ, Randle J, Hutley LB. Carbon dioxide fluxes dominate the greenhouse gas exchanges of a seasonal wetland in the wet dry tropics of Northern Australia. **Agricultural and Forest Meteorology**. 2013;182-183:239-247. DOI: 10.1016/j.agrformet.2013.06.008

- [59] Pérez-rojas J, Moreno F, César J, Villa J. Catena soil organic carbon stocks in fluvial and isolated tropical wetlands from Colombia. **Catena**. 2019; 179:139- 148. DOI: 10.1016/j.catena.2019.04.006
- [60] Zhao J, Malone SL, Oberbauer SF, Olivas PC, Schedlbauer JL, Staudhammer CL, et al. Intensified inundation shifts a freshwater wetland from a CO<sub>2</sub> sink to a source. **Global Change Biology**. 2019;25(10):3319-3333. DOI: 10.1111/gcb.14718
- [61] Hernández M, Klose M, Claus P, Bastviken D, Marotta H, et al. Structure, function and resilience to desiccation of methanogenic microbial communities in temporarily inundated soils of the Amazon rainforest (Cunia reserve, Rondonia). **Environmental Microbiology**. 2019;21(5):1702-1717. DOI: 10.1111/1462-2920.14535
- [62] Randle-Boggis RJ, Ashton PD, Helgason T. Increasing flooding frequency alters soil microbial communities and functions under laboratory conditions. **MicrobiologyOpen**. 2018;7(1):1-13. DOI: 10.1002/mbo3.548
- [63] Mitsch WJ, Nahlik A, Wolski P, Bernal B, Zhang L, Ramberg L. Tropical wetlands: Seasonal hydrologic pulsing, carbon sequestration, and methane emissions. **Wetlands Ecology and Management**. 2010;18(5):573-586. DOI: 10.1007/s11273-009-9164-4
- [64] Kayranli B, Scholz M, Mustafa A, Hedmark Å. Carbon storage and fluxes within freshwater wetlands: A critical review. **Wetlands**. 2010;30(1):111-124. DOI: 10.1007/s13157-009-0003-4
- [65] Dunfield P, Knowles R, Dumont R, Moore TR. Methane production and consumption in temperate and subarctic peat soils: Response to temperature and pH. **Soil Biology and Biochemistry**. 1993;25(3):321-326. DOI: 10.1016/0038-0717(93)90130-4
- [66] Sanches LF, Guenet B, Marinho CC, Barros N, de Assis Esteves F. Global regulation of methane emission from natural lakes. **Scientific Reports**. 2019;9(1):1-10. DOI: 10.1038/s41598-018-36519-5
- [67] Bodelier PLE, Dedysch SN. Microbiology of wetlands. **Frontiers in Microbiology**. 2013;4:1-4. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00079
- [68] Boon E, Meehan CJ, Whidden C, Wong DHJ, Langille MGI, Beiko RG. Interactions in the microbiome: Communities of organisms and communities of genes. **FEMS Microbiology Reviews**. 2014;38(1):90-118. DOI: 10.1111/1574-6976.12035
- [69] Yarwood SA. The role of wetland microorganisms in plant-litter decomposition and soil organic matter formation: A critical review. **FEMS Microbiology Ecology**. 2018;94:1-17. DOI: 10.1093/femsec/fiy175
- [70] Lennon JT, Jones SE. Microbial seed banks: The ecological and evolutionary implications of dormancy. **Nature Reviews Microbiology**. 2011;9(2):119- 130. DOI: 10.1038/nrmicro2504



- [71] De Vrieze J, Regueiro L, Props R, Vilchez-Vargas R, Jáuregui R, Pieper DH, et al. Presence does not imply activity: DNA and RNA patterns differ in response to salt perturbation in anaerobic digestion. **Biotechnology for Biofuels**. 2016;9(244):1-13. DOI: 10.1186/s13068-016-0652-5
- [72] Liu D, Nishida M, Takahashi T, Asakawa S. Transcription of *mcrA* gene decreases upon prolonged non-flooding period in a methanogenic archaeal community of a paddyupland rotational field soil. **Microbial Ecology**. 2018;75(3):1-10. DOI: 10.1007/s00248-017-1063-2
- [73] Adrian L, Marco-Uurrea E. Isotopes in geobiochemistry: Tracing metabolic pathways in microorganisms of environmental relevance with stable isotopes. **Current Opinion in Biotechnology**. 2016;41:19-25. DOI: 10.1016/j.copbio.2016.03.018
- [74] Kueter N, Lilley MD, Schmidt MW, Bernasconi SM. Experimental carbonatite/graphite carbon isotope fractionation and carbonate/graphite geothermometry. **Geochimica et Cosmochimica Acta**. 2019;253:290-306. DOI: 10.1016/j.gca.2019.03.020
- [75] Coyotzi S, Pratscher J, Murrell JC, Neufeld JD. Targeted metagenomics of active microbial populations with stable-isotope probing. **Current Opinion in Biotechnology**. 2016;41:1-8. DOI: 10.1016/j.copbio.2016.02.017
- [76] Potter C, Melack JM, Engle D. Modeling methane emissions from Amazon floodplain ecosystems. **Wetlands**. 2014;34:501-511. DOI: 10.1007/s13157-014-0516-3
- [77] Xu, X., Yuan, F., Hanson, P. J., Wullschleger, S. D., Thornton, P. E., Riley, W. J., Song, X., Graham, D. E., Song, C., & Tian, H. (2016). Reviews and syntheses: Four decades of modeling methane cycling in terrestrial ecosystems. **Biogeosciences**, 13(12), 3735–3755. DOI: 10.5194/bg-13-3735-2016
- [78] Wilson C, Gloor M, Gatti LV, Miller JB, Monks SA, McNorton J, et al. Contribution of regional sources to atmospheric methane over the Amazon basin in 2010 and 2011. **Global Biogeochem**. 2016;30:400-420. DOI: 10.1002/2015GB005300
- [79] Clark DB, Mercado LM, Sitch S, Jones CD, Gedney N, Best MJ, et al. The joint UK land environment simulator (JULES), model description – Part 2: Carbon fluxes and vegetation dynamics. **Geoscientific Model Development**. 2011;4:701-722. DOI: 10.5194/gmd-4-701-2011
- [80] Bloom AA, Palmer PI, Fraser A, Reay DS. Seasonal variability of tropical wetland CH<sub>4</sub> emissions: The role of the methanogen-available carbon pool. **Biogeosciences**. 2012;9(8):2821-2830. DOI: 10.5194/bg-9-2821-2012
- [81] Gedney N, Cox PM, Huntingford C. Climate feedback from wetland methane emissions. *Geophysical Research Letters*. 2004;31:1-4. DOI: 10.1029/2004GL020919 [81] Xu X, Yuan F, Hanson PJ, Wullschleger SD, Thornton PE, Riley WJ, et al. Reviews and syntheses: Four decades of modeling methane cycling in terrestrial ecosystems. **Biogeosciences**. 2016;13(12):3735-3755. DOI: 10.5194/bg-13-3735-2016

### **3 Capítulo 2 - TIPOS DE ÁGUA E PULSOS DE INUNDAÇÃO MOLDAM A ATIVIDADE METABÓLICA MICROBIANA EM SOLOS DE PLANÍCIES ALUVIAIS AMAZÔNICAS<sup>1</sup>**

#### **RESUMO**

Os micro-organismos desempenham um papel essencial nas funções e na produção do ecossistema. Uma opção cada vez mais utilizada para a análise funcional da comunidade microbiana do solo é baseada no perfil fisiológico ao nível de comunidade. Esta opção permite avaliar a capacidade metabólica de micro-organismos com base nos padrões de consumo de carbono e índices derivados. No presente estudo, os efeitos dos pulsos de inundação em planícies aluviais da Amazônia na diversidade funcional das comunidades microbianas foram avaliados em solos sob influência de diferentes tipos de águas (negra, clara e branca) em sítios florestais e sistemas agrícolas tradicionais. Os solos das planícies aluviais amazônicas apresentaram diferenças na atividade metabólica, mostrando uma tendência geral de PAC (Planície aluvial de rio de água clara) > PAN (Planície aluvial de rio de água negra) > PAB (Planície aluvial de rio de água branca). A análise de redundância (RDA) indicou que a umidade do solo (pulso de inundação) foi o parâmetro ambiental mais importante na determinação da atividade metabólica de comunidades microbianas de solo de planícies aluviais de águas negra, clara e branca. Além disso, a análise de partição de variância (VPA) indicou que a atividade metabólica microbiana do solo foi mais influenciada pelo tipo de água (41,72%) do que pela sazonalidade (19,55%) e uso da terra (15,28%). A microbiota do solo de planícies aluviais de rio de água branca foi distinta ao nível de riqueza metabólica daquelas de rios de águas negra e clara, influenciada principalmente pela baixa utilização de substratos durante o período não inundado.

Palavras-chave: BIOLOG<sup>TM</sup> EcoPlate; diversidade funcional metabólica; sedimento; dinâmica sazonal.

---

<sup>1</sup> Artigo não submetido

### 3.1 Introdução

O solo é um ecossistema dinâmico e complexo cuja funcionalidade está vinculada à ligação estabelecida entre fatores ambientais e as comunidades microbianas residentes. Os micro-organismos desempenham um papel essencial nas funções e na produção do ecossistema [1]. O monitoramento da comunidade e a compreensão dos mecanismos que regulam a diversidade microbiana do solo, assim como suas características funcionais podem constituir metodologia para a compreensão de contextos ecológicos básicos e aplicados [2].

A diversidade funcional é cada vez mais reconhecida por ecólogos microbianos como o elo essencial entre os padrões de biodiversidade e o funcionamento do ecossistema, determinando as relações tróficas e interações entre micro-organismos, sua participação em ciclos biogeoquímicos e suas respostas às mudanças ambientais [3]. No entanto, informações a respeito de funções metabólicas em diferentes escalas ainda são limitadas. Uma maneira de quantificar essas funções é o uso da tecnologia BIOLOG™ EcoPlate, que obtém informações sobre a atividade geral e função metabólica entre diferentes comunidades microbianas do solo capazes de refletir na diversidade funcional [4]. Perfis fisiológicos ao nível da comunidade microbiana revelados com a tecnologia BIOLOG™ EcoPlate possuem como princípio fundamental a avaliação da capacidade das comunidades microbianas do solo metabolizar uma gama de substratos orgânicos com diferentes complexidades estruturais [5]. Esta técnica foi concebida especialmente para estudos de ecologia microbiana fornecendo um padrão de resposta metabólica da população de micro-organismos em culturas mistas ou amostras ambientais [6], e tem como base a incubação em uma microplaca contendo diferentes fontes de carbono com repetições.

Certamente, a variação mais marcante das florestas no sistema úmido da Amazônia são as inundações sazonais [7] e os processos subsequentes. As grandes planícies aluviais amazônicas são formadas por um mosaico de *habitats* governados pelos pulsos de inundação de rios. Nesses ambientes, observa-se uma ampla diversidade de *habitats* em virtude de diversos fatores atrelados, como a duração, amplitude, frequência e previsibilidade das inundações [8]. Uma melhor compreensão das relações estabelecidas em áreas úmidas é essencialmente necessária à luz dos impactos da mudança do uso e ocupação do solo frente aos serviços ecossistêmicos fornecidos por áreas úmidas. Compreender os mecanismos que controlam as respostas da comunidade microbiana dentro do contexto da variação natural a

qual os ambientes estão expostos é essencial para o entendimento desses ambientes que possuem alta singularidade ecológica.

As águas amazônicas são classificadas em três categorias biogeoquímicas distintas, que envolvem atributos como nutrientes dissolvidos, tipo de sedimento, transparência e acidez [9], refletindo na coloração das mesmas (negra, clara e branca). As águas negras apresentam pH ácido, possuem alta concentração de substâncias húmicas e baixa concentração de sólidos em suspensão. Por sua vez, as águas claras apresentam baixo teor de sedimentos em suspensão e alta transparência; e as águas brancas, também conhecidas como águas barrentas são consideradas neutras, com baixa transparência e altas cargas de sedimentos aluviais férteis em suspensão [9-11].

Na interface terrestre-aquático, o regime de água possui controle significativo sobre a transformação do carbono microbiano (C) [12]. Portanto, os micro-organismos podem reagir especificamente à entrada de nutrientes na forma de substâncias orgânicas. Se ocorrer a alteração do grau de oxigenação do sistema, o alagamento do solo pode alterar a intensidade e o modo de utilização de carbono.

Assim, utilizamos perfis fisiológicos ao nível da comunidade microbiana (BIOLOG™ EcoPlate), para avaliar o potencial metabólico da comunidade microbiana do solo em condições de seca e inundação em três planícies aluviais com diferentes tipos de água da Amazônia – negra (Rio Negro), clara (Rio Tocantins) e branca (Rio Solimões) – e uso da terra (floresta e agricultura). Duas hipóteses foram avaliadas: (1) a diversidade funcional metabólica das comunidades microbianas do solo é responsiva aos pulsos de inundação em planícies aluviais amazônicas; e (2) Os perfis metabólicos das comunidades microbianas do solo em planícies aluviais variam em função dos tipos de água da Amazônia.

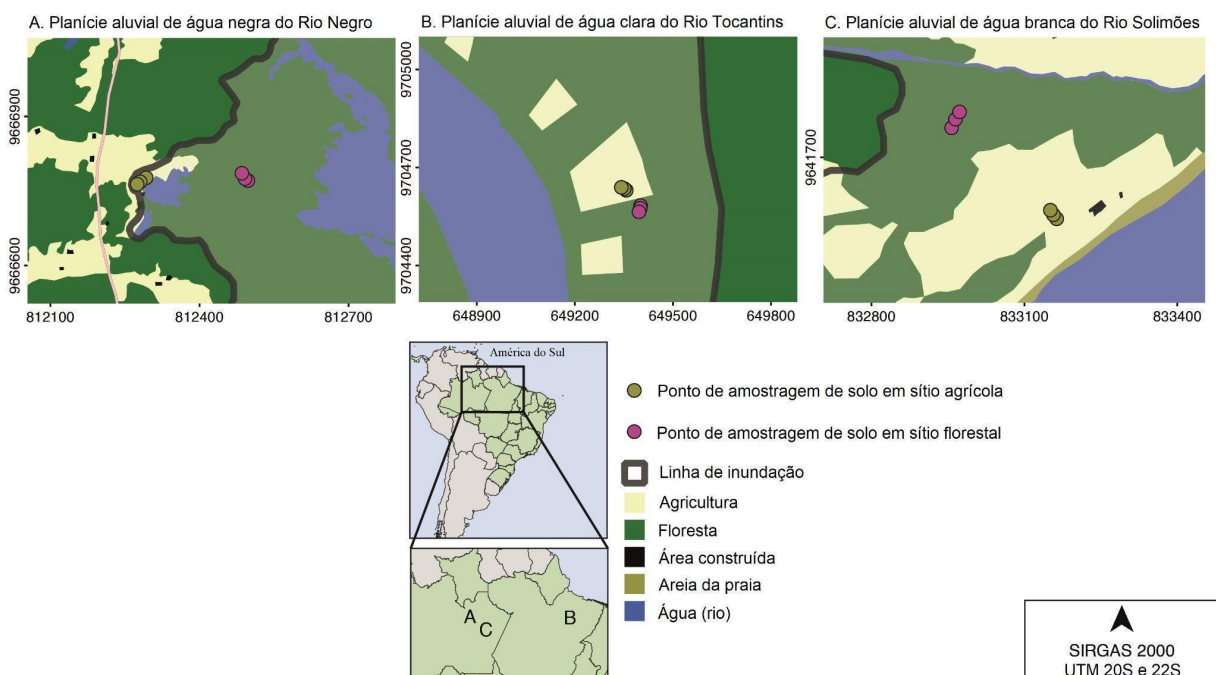
## **3.2 Material e métodos**

### **3.2.1 Sítios de amostragem**

Os solos avaliados no presente estudo foram provenientes de três planícies aluviais de rios com diferentes tipos de água, localizados na Amazônia brasileira (rios Negro, Tocantins e Solimões). Amostras desses solos foram coletadas em dois locais de amostragem

identificados como floresta primária e sistemas agrícolas tradicionais em períodos contrastantes da hidrógrafa (seca e inundação) (Figura 1). A amostragem compreendeu seis combinações de "tipo de água" vs. "tipo de uso da terra" em período não inundado (outubro de 2017) e inundado (maio de 2018). Os locais de amostragem em cada local são afetados por um pulso de inundação de longa duração (mais de 5 meses). As áreas de estudo das planícies aluviais foram localizadas na planície de inundação de água negra do rio Negro ( $3^{\circ}00'41''\text{S}$  e  $60^{\circ}11'15''\text{W}$ ), na planície de inundação de água clara do rio Tocantins ( $2^{\circ}40'51''\text{S}$  e  $49^{\circ}39'05''\text{W}$ ) e na planície de inundação de água branca do rio Solimões ( $3^{\circ}13'50''\text{S}$  e  $59^{\circ}59'26''\text{W}$ ). O clima predominante nesta região é tropical úmido, sendo classificado como 'Afi' (classificação de Köppen) com temperaturas médias anuais superiores a  $26^{\circ}\text{C}$ , precipitação anual de aproximadamente 2000 mm, incidência luminosa intensa, elevada umidade do ar e baixa velocidade do vento [13].

A floresta primária, ou seja, floresta sem indicações visíveis de atividades humanas, era adjacente a sistemas agrícolas tradicionais em todas as três planícies aluviais. Nos sistemas agrícolas tradicionais, a agricultura de subsistência à base de melancia, quiabo e rambutan tem sido praticada na planície aluvial de águas negras do rio Negro; e o cultivo de tomate e mandioca na planície aluvial de águas brancas do rio Solimões. Na planície aluvial de água clara, era um sistema agrossilvicultural à base de cacau.



**Figura 1.** Locais de amostragem na Amazônia brasileira, uso da terra e linha de inundação nas três áreas de estudo sazonalmente inundadas com água negra (A), água clara (B) e água branca (C)

### **3.2.2 Amostragem de solo**

A coleta de amostras de solo foi realizada em sítios florestais e sob sistemas agrícolas tradicionais, localizados em cada uma das três planícies aluviais amazônicas. Em cada local, foram coletadas amostras de solo em três pontos amostrais equidistantes (14 m) entre si. As amostras de solo foram coletadas com o auxílio de um tubo cilíndrico asséptico (camada de solo de 0-15 cm de diâmetro e 10 cm de diâmetro - Figura 2), durante o período não inundado. No regime de inundação das planícies aluviais foram coletados núcleos de solo subaquático (camada de solo de 0-15 cm e 10 cm de diâmetro) utilizando um amostrador manual universal de sedimentos (Figura 2) com núcleo ajustável de 0-15 cm (Aquatic Research Instruments, ID, EUA).



**Figura 2.** Amostradores utilizados para coletar amostras de solo indeformadas para análises físico-químicas e perfil fisiológico ao nível da comunidade durante o período não inundado (a - núcleo cilíndrico asséptico, b - camada de solo de 0-15 cm de profundidade e com diâmetro de 10 cm, c - camada de solo de 0-15 no núcleo cilíndrico) e inundado (d.1 - configuração do amostrador universal de núcleo de sedimento com cortador de núcleo ajustável de 0-15 cm, d.2 - amostragem em campo com o amostrador manual universal, e.1 - descrição do túnel de extrusão do sedimento, e.2 - amostragem em campo com o amostrador manual universal, visão do túnel de extrusão do sedimento)

### 3.2.3 Análise de perfil fisiológico ao nível da comunidade

Perfis fisiológicos ao nível da comunidade foram determinados usando BIOLOG™ EcoPlate (Biolog Inc., Hayward CA, EUA). BIOLOG™ EcoPlate consistiu em 96 poços, que continham 31 fontes de carbono (6 aminoácidos, 2 amins, 10 carboidratos, 7 ácidos carboxílicos, 2 compostos fenólicos e 4 polímeros) e um branco (controle), em triplicata. As

amostras de solo foram submetidas ao preparo antes da inoculação nas placas. Para tanto, 1 g de solo fresco foi adicionado em 9 mL de NaCl 0,85% (v/v) estéril (diluição  $10^{-1}$ ), e a mistura foi agitada a 150 rpm a uma temperatura de 25 °C por 30 min [14]. Diluições seriadas foram feitas de cada amostra e uma alíquota de 150  $\mu$ L (diluição  $10^{-3}$  g.mL<sup>-1</sup>) foi adicionada à BIOLOG™ EcoPlate. As placas foram incubadas a 25 °C e a absorbância lida a 540 nm [15-17] a cada 24 h até 168 h em leitor de microplacas (LMR-96, Locus, SP, Brasil). Solo coletado de cada um dos três pontos amostrais em cada local de amostragem nas três planícies de inundação diferentes foi inoculado em uma única BIOLOG™ EcoPlate. A absorbância a 540 nm ( $OD_{540}$ ) foi medida imediatamente após a inoculação das placas ( $t = 0$ ). Os valores de OD foram submetidos a correções de dados, incluindo primeiro a subtração do valor do poço de controle (apenas água) seguido pela subtração do valor de OD inicial de cada poço medido logo após o enchimento dos poços com a suspensão de solo ( $t = 0$ ) para eliminar o efeito das partículas de solo na leitura dos valores de OD. Os valores negativos foram definidos como zero [14]. A atividade microbiana em cada microplaca, expressa como atividade metabólica média (*Average Well Color Development* - AWCD, em inglês), foi determinada da seguinte forma:

$$AWCD = \sum (C_i - R) / 31$$

onde, R é a absorbância do poço de controle (contendo água em vez da fonte C) e  $C_i$  é a absorbância da placa inoculada com fonte de C. Para AWCD foi atribuído um valor de 0 quando  $C_i - R < 0$ . As leituras da BIOLOG™ EcoPlate em 168 h [4, 18-19] foram usadas para o cálculo da riqueza metabólica. Tal medida corresponde ao número de substratos de C oxidados.

Para simplificar a comparação direta, seis guildas de substratos foram agrupadas de acordo com [20]: aminoácidos (L-arginina, L-asparagina, L-fenilalanina, L-serina, Ácido Glicil-L-glutâmico, L-treonina), aminas (Feniletilamina, Putrescina), ácidos carboxílicos (Ácido D-galacturônico, Ácido D-Málico, Ácido itacônico, Éster metílico do ácido pirúvico, Ácido D-glicosamínico, Ácido alfa-cetobutírico, Ácido gama-aminobutírico), carboidratos (D-manitol, Glicose-1-fosfato, D,L-alfa-glicerol fosfato, Beta-metil-d-glicosídeo, Ácido D-galacturônico gama-lactona, i-Eritritol, D-xilose, N-acetil-D-glicosamina, D-celobiose, alpha-D-lactose), compostos fenólicos (Ácido 2-hidroxibenzóico, Ácido 4-hidroxibenzóico) e



polímeros (Tween 40, Tween 80, Alfa-ciclodextrina, Glicogênio). Para cada série, os valores de absorvância corrigidos dos substratos foram resumidos e expressos pela média correspondente a cada uma das guildas.

### 3.2.4 Fatores físicos e químicos do solo

A determinação de fatores químicos e físicos foi realizada a partir de cada uma das 36 amostras de solo. O pH do solo foi medido em suspensão de solo/0,01 M CaCl<sub>2</sub> (1:5). A umidade do solo foi determinada pelo método gravimétrico, como descrito em EMBRAPA [21]. Os teores totais de carbono (C) e nitrogênio (N) foram determinados por combustão seca utilizando o analisador elementar CHNS/O (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA) a partir das amostras de solo. A determinação foi realizada utilizando 5-7 mg de solo seco peneirado em malha de 0,15 mm. O NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N e NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N do solo foram extraídos por cloreto de potássio 2 M (KCl) e quantificados usando espectrofotometria conforme descrito por [22] e [23], respectivamente.

### 3.2.5 Análise estatística

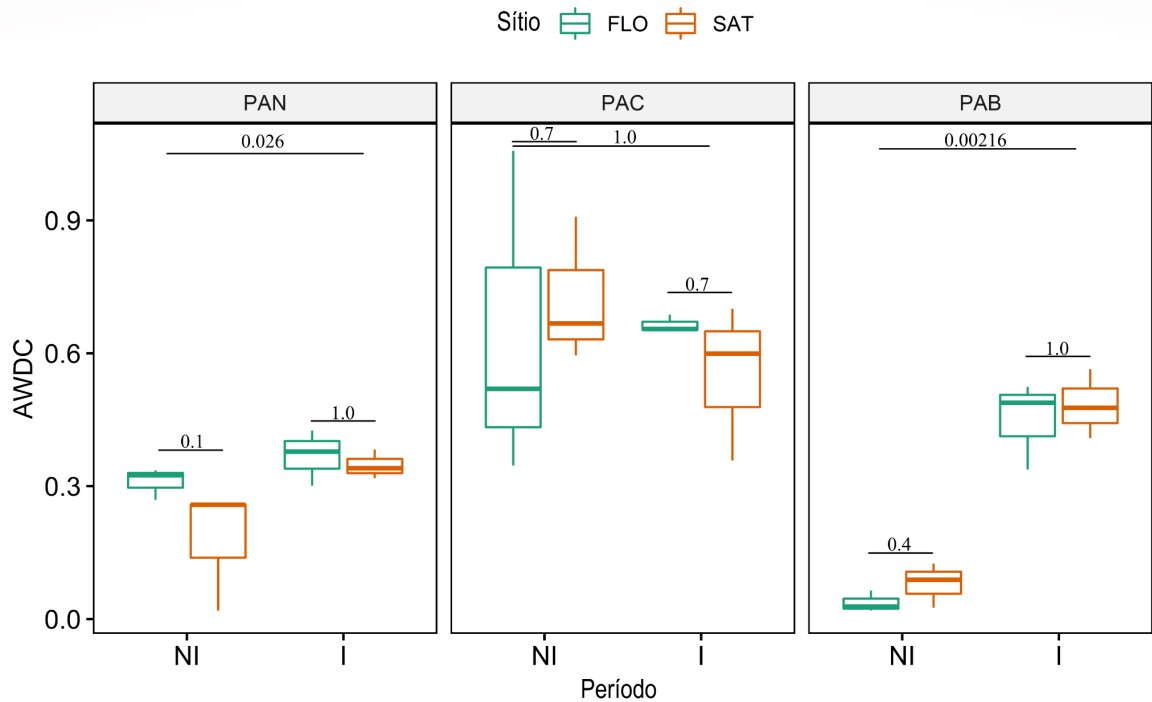
Os dados de absorvância de 168 h foram utilizados para análise do AWDC e riqueza metabólica utilizando o pacote "pacman" [24] do software R para o teste estatístico de Mann-Whitney. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para determinar diferenças entre as amostras sob diferentes águas amazônicas para AWDC e riqueza metabólica. *Heatmaps* foram gerados com base nos valores médios de AWCD em 168 h usando o pacote do software R "pheatmap" [25]. Os fatores físicos e químicos do solo foram submetidos ao teste de Tukey para avaliar as diferenças entre uso do solo dentro de cada planície e período. A análise de redundância (RDA) foi utilizada para avaliar a relação entre a função microbiana e os fatores ambientais, e foi feita utilizando o programa Canoco 4.5 (Biometrics, Wageningen, The Netherlands). Além disso, para quantificar as contribuições da "sazonalidade", "uso da terra" e "tipo de água" sobre o consumo das guildas funcionais foi realizada a análise de partição de variância (VPA) com o pacote "vegan" do software R [26]. As análises estatísticas foram realizadas no software "R Studio 3.5.1" [27].

### 3.3 Resultados

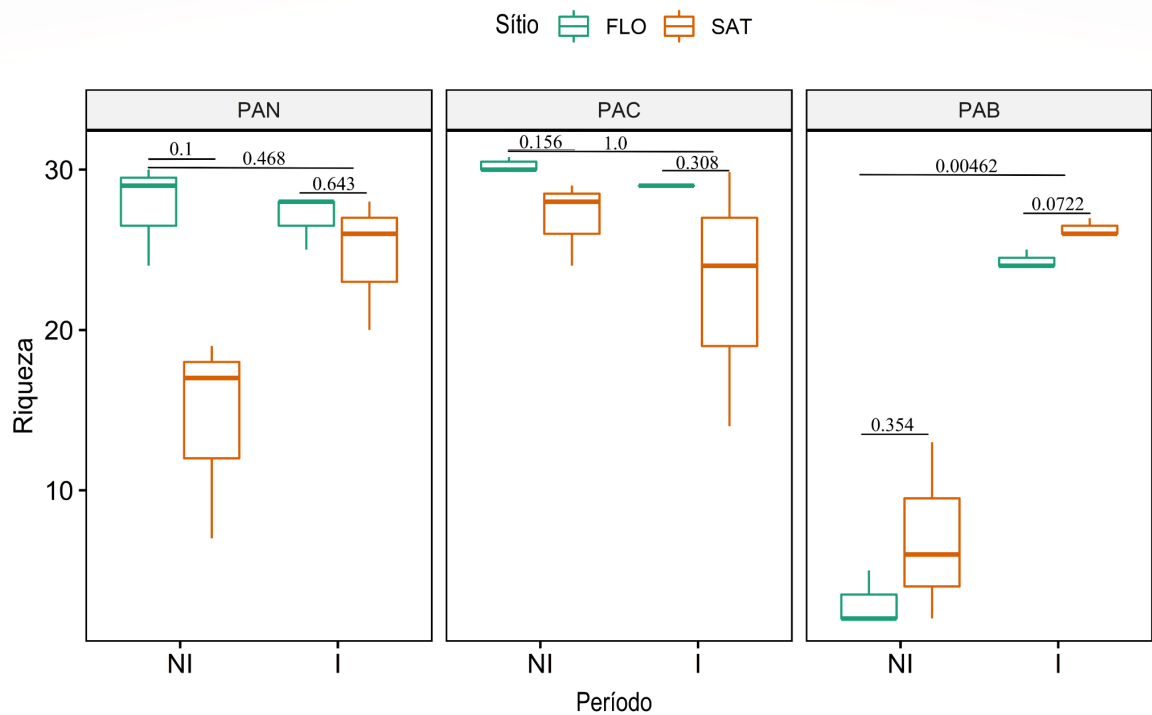
#### 3.3.1 Análise do perfil fisiológico ao nível da comunidade

A atividade metabólica média (AWCD) e a riqueza de utilização de substratos pela comunidade microbiana em solos das planícies aluviais de rios de águas negra, clara e branca da Amazônia 168 horas após a incubação em BIOLOG<sup>TM</sup> EcoPlate são mostradas nas Figuras 3 e 4, respectivamente. Em ambos os casos, não houve diferença estatística entre os sítios de floresta e sistema agrícola tradicional para as três planícies aluviais estudadas. AWCD mostrou diferença em relação aos períodos sazonais em solo de planícies aluviais de rios de águas negra ( $p < 0.05$ ) e branca ( $p < 0.01$ ). Em ambas as planícies aluviais foi revelado aumento da AWCD durante o período inundado.

Para comparar a diversidade metabólica entre as diferentes condições avaliadas, a riqueza de utilização de substrato foi empregada e revelou que na planície aluvial do rio de água branca o fator que apresentou maior influência sobre a diversidade metabólica da comunidade microbiana do solo foi a sazonalidade ( $p < 0.01$ ). O sítio florestal ( $3,00 \pm 1,73$ ) e o sistema agrícola tradicional ( $7,00 \pm 5,56$ ) localizados nesta planície aluvial apresentaram menor utilização de substratos no período não inundado. Apesar dos dados de riqueza de utilização de substratos pela microbiota da planície aluvial de água negra não apresentarem diferença significativa, o sítio florestal mostrou maior riqueza quando comparado ao sistema agrícola tradicional nos dois períodos. A riqueza de utilização de substratos pelas comunidades microbianas em solos florestais de planícies aluviais de rios de água clara diminuiu de  $30,33 (\pm 0,57)$  para  $29,00 (\pm 0,00)$  com a inundação. No sistema agrícola tradicional a diminui o foi de  $27,00 (\pm 2,64)$  para  $22,67 (\pm 8,08)$ . Assim, o solo de sítio florestal de planície aluvial de água clara apresentou a maior riqueza de utiliza o de substratos durante o estudo.

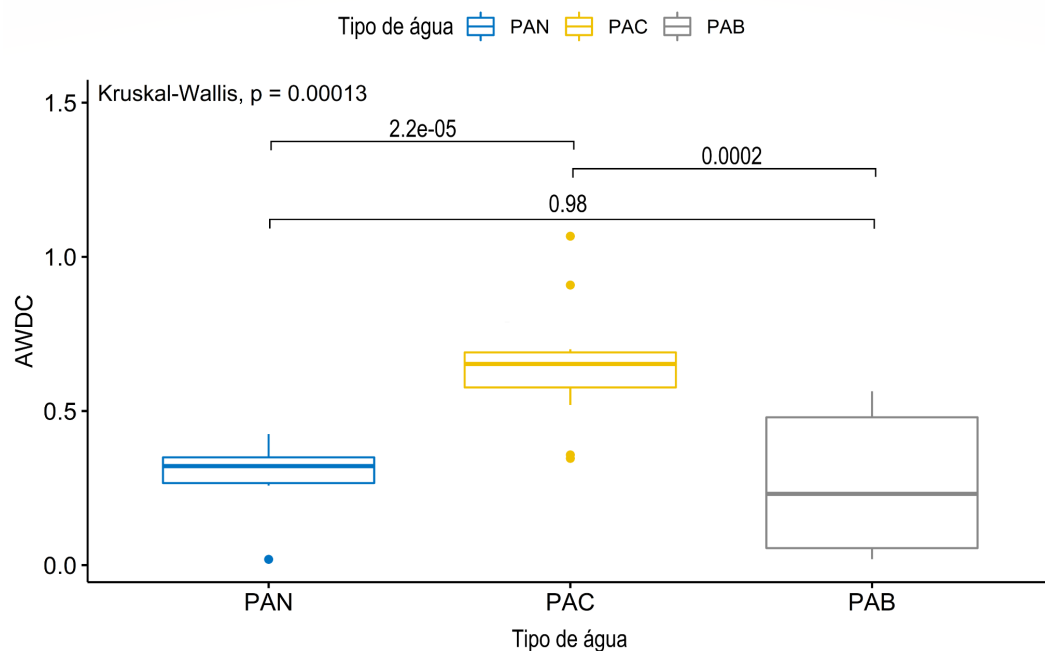


**Figura 3.** Atividade metabólica média (AWDC) da comunidade microbiana em solos de planícies aluviais de rios de águas negra (PAN), clara (PAC) e branca (PAB) sob diferentes usos da terra (FLO - Florestal e SAT - Sistema Agrícola Tradicional) e amostrados em dois períodos sazonais (NI - Não inundado e I - inundado) baseado na utilização de fontes de carbono 168 h após a incubação em BIOLOG™ EcoPlate. As barras acompanhadas de valores indicam o *p*-valor obtido pelo teste Mann-Whitney

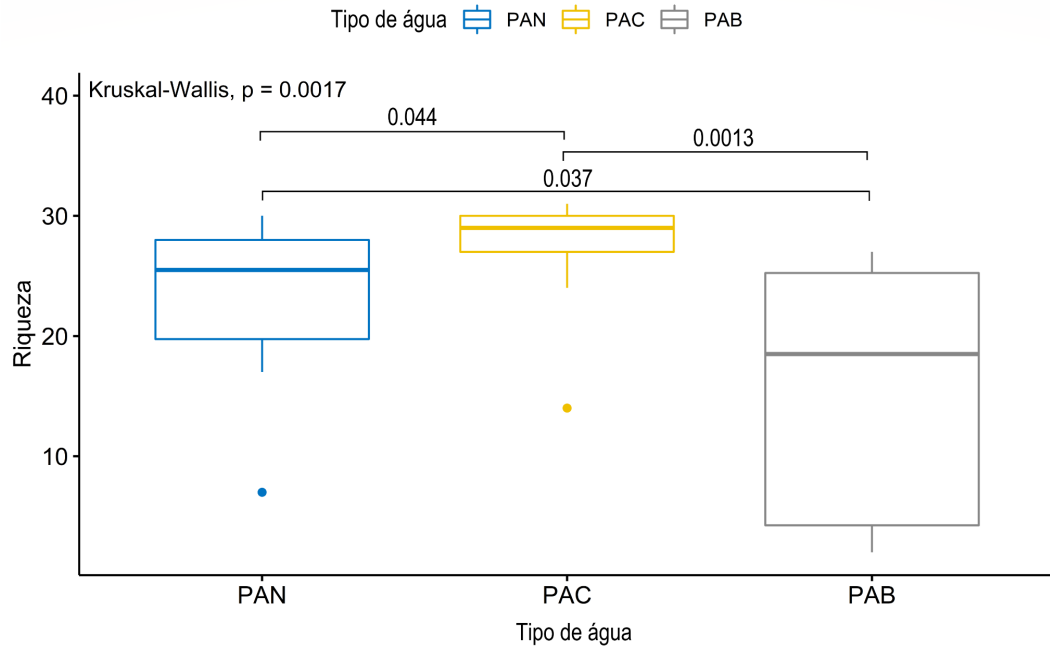


**Figura 4.** Riqueza de utilização de substratos pela comunidade microbiana em solos de planícies aluviais de rios de águas negras (PAN), clara (PAC) e branca (PAB) sob diferentes usos da terra (FLO - Florestal e SAT - Sistema Agrícola Tradicional) e amostrados em dois períodos sazonais (NI - Não inundado e I - inundado) baseado na utilização de fontes de carbono 168 h após a incubação em BIOLOG™ EcoPlate. As barras acompanhadas de valores indicam o *p*-valor obtido pelo teste Mann-Whitney

O conjunto de dados sobre os solos de diferentes tipos de planícies aluviais amazônicas foi utilizado para comparar as diferenças de AWDC e riqueza de utilização de substrato sob influência dos três tipos de águas amazônicas. Conforme mostrado na Figura 5, a atividade metabólica média foi significativamente mais elevada em solos da planície aluvial do rio de água clara ( $0,64 \pm 0,20$ ) em comparação com aquela determinada em solos das planícies aluviais de rios de águas negra ( $0,30 \pm 0,10$ ) e branca ( $0,26 \pm 0,22$ ). Não houve diferença significativa entre solos das planícies aluviais de águas negra e branca em relação ao AWDC. Em relação à riqueza de utilização de substrato, os solos das planícies dos três tipos de águas apresentaram comportamento contrastante ( $p < 0.05$ ): PAC (Planície aluvial de rio de água clara) > PAN (Planície aluvial de rio de água negra) > PAB (Planície aluvial de rio de água branca) (Figura 6).

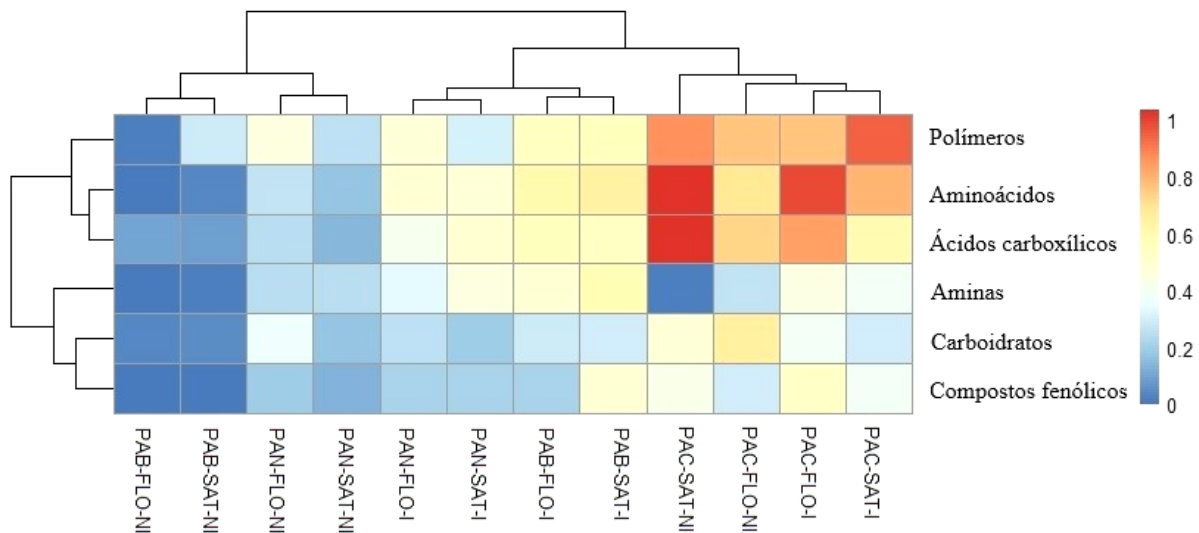


**Figura 5.** AWDC baseado na utilização de substratos de carbono em 168 h pela comunidade microbiana em diferentes águas amazônicas. Tipos de águas são abreviadas com as seguintes abreviações: PAN - planície aluvial de rio de água negra, PAC - planície aluvial de rio de água clara, PAB - planície aluvial de rio de água branca. As barras acompanhadas de valores indicam o  $p$ -valor obtido pelo teste Kruskal-Wallis



**Figura 6.** Riqueza de utilização de substratos baseados na utilização de substratos de carbono em 168 h pela comunidade microbiana em diferentes águas amazônicas. Tipos de águas são abreviadas com as seguintes abreviações: PAN - planície aluvial de rio de água negra, PAC - planície aluvial de rio de água clara, PAB - planície aluvial de rio de água branca. As barras acompanhadas de valores indicam o *p*-valor obtido pelo teste Kruskal-Wallis

A utilização das fontes de carbono pelas comunidades microbianas do solo dos sítios florestais e sistemas agrícolas tradicionais em planícies aluviais de rios de águas negra, clara e branca no período não inundado e inundado com a comparação das guildas de substratos são mostrados na Figura 7. Considerando o efeito sazonal, os dados obtidos em solos da planície aluvial de águas claras apresentaram uma tendência de comportamento diferente entre os sítios amostrais. No sítio florestal, a inundação alterou a maior utilização da guilda polímeros para aminoácidos. Já no sistema agrícola tradicional observamos tendência oposta, com a inundação alterando de aminoácidos/ácidos carboxílicos para polímeros. Comparando a distribuição de utilização das guildas de substratos para solos advindos de planícies aluviais com as três colora es de água, a guilda menos utilizada durante o período não inundado foi amina e as mais utilizadas ácidos carboxílicos, polímeros e aminoácidos.

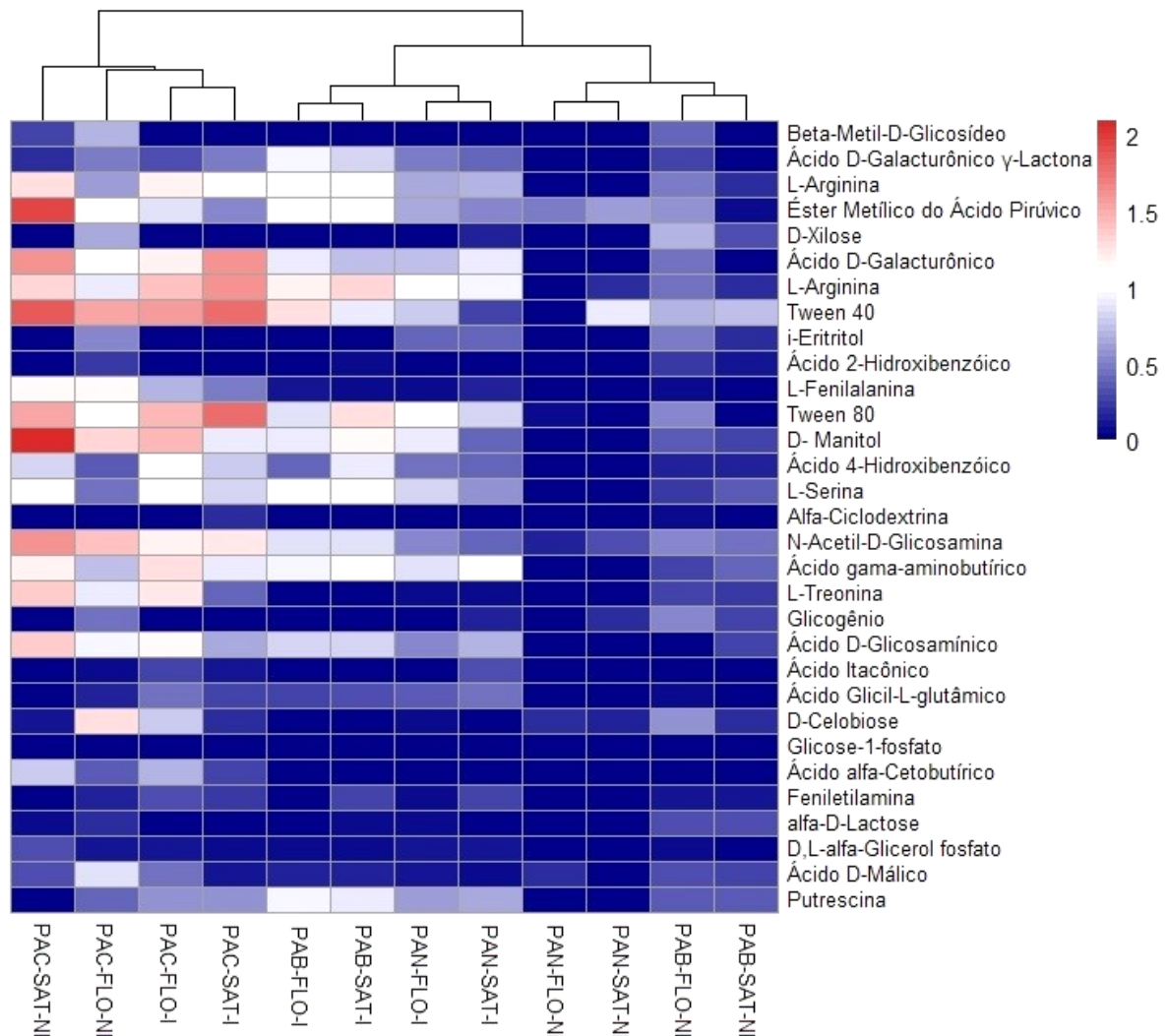


**Figura 7.** Resposta da utilização de carbono com a representação em forma de *heatmap* com dendograma para as diferentes guildas de substratos - aminoácidos, aminas, ácidos carboxílicos, carboidratos, compostos fenólicos e polímeros pela comunidade microbiana do solo em diferentes águas amazônicas. Tipos de águas são abreviadas com as seguintes abreviações: PAN - planície aluvial de rio de água negra, PAC - planície aluvial de rio de água clara, PAB - planície aluvial de rio de água branca. Os diferentes usos da terra (FLO - Florestal e SAT - Sistema Agrícola Tradicional) e amostrados em dois períodos sazonais (NI - Não inundado e I - inundado) baseado na utilização de fontes de carbono 168 h após a incubação em BIOLOG™ EcoPlate

As diferenças entre a utilização de substratos são mostradas na Figura 8. Amostras de solo coletadas em planície aluvial de rio de águas branca durante o período não inundado agrupam-se por apresentar baixa utilização de substratos de forma global. Os substratos que apresentaram a maior metabolização em cada um dos sítios amostrais apresentaram a seguinte disposição em relação ao AWDC: PAN-FLOR-NI (Tween 40, 0,68 e D-xilose, 0,67) e PAN-SAT-NI (Tween 40, 0,71). Durante o período inundado, PAN-FLOR-I (Tween 80, 1,10 e L-asparagina, 0,98) e PAN-SAT-I (Ácido gama-aminobutírico, 0,98 e L-Asparagina, 0,94). Em águas claras, PAC-FLOR-NI (Tween 40, 1,51), PAC-SAT-NI (D-manitol, 2,08), PAC-FLOR-I (Tween 40, 1,55) e no PAC-SAT-I (Tween 40, 1,77 e Tween 80, 1,76), Por fim, em águas brancas, PAB-FLOR-NI (Éster metílico do ácido pirúvico, 0,50) e no PAB-SAT-NI (Tween 40, 0,91). No período inundado, o PAB-FLOR-I (Tween 40, 1,25 e L-asparagina, 1,19) e o PAB-SAT-I (L-asparagina, 1,33 e Tween 80, 1,28).

Metabolização baixa ou nenhuma utilização de substratos foram observadas em quase todas as amostras, apresentando a seguinte disposição: PAN-FLOR-NI (Ácido itacônico, 0,007), PAN-SAT-NI (Ácido D-galacturônico, Glicose-1-fosfato e Ácido alfa-cetobutírico, 0,00), PAN-FLOR-I (D-xilose e Ácido 2-hidroxibenzóico, 0,00), PAN-SAT-I (Ácido

2-hidroxibenzóico e Ácido alfa-cetobutírico, 0,00). Em solos de planície aluvial de rio de águas claras, PAC-FLO-R-NI (Glicose-1-fosfato, 0,017), PAC-SAT-NI (D-xilose, 0,00), PAC-FLO-R-I e PAC-SAT-I (Ácido 2-hidroxibenzóico, 0,00). Em águas brancas, PAB-FLO-R-NI (Éster metílico do ácido pirúvico, Ácido D-Málico, D-Cellobiose e N-acetil-D-glicosamina apresentaram metabolização <0,10), PAB-SAT-NI (Éster metílico do ácido pirúvico, L-asparagina, Tween 40, N-acetil-D-glicosamina, Glicogênio e D-Cellobiose apresentaram metabolização <0,10), PAB-FLO-R-I (D-xilose, Ácido 2-hidroxibenzóico, Ácido alfa-cetobutírico e Feniletilamina, 0,00), PAB-SAT-I (D-xilose e Ácido alfa-cetobutírico, 0,00).



**Figura 8.** Heatmap com dendograma da utilização das 31 fontes de carbono contempladas pela BIOLOG™ EcoPlate após 168 h de incubação. Tipos de águas seguiram as seguintes abreviações: PAN - planície aluvial de rio de água negra, PAC - planície aluvial de rio de água clara, PAB - planície aluvial de rio de água branca. Os diferentes usos da terra (FLO - Florestal e SAT - Sistema Agrícola Tradicional) foram amostrados em dois períodos sazonais (NI - Não inundado e I - inundado)

### **3.3.2 Contribuição de fatores físicos e químicos do solo para a variação das características metabólicas funcionais da comunidade bacteriana**

Os fatores físicos e químicos do solo são mostrados na Tabela 1. A RDA (Figura 9) foi utilizada para ilustrar as relações entre fatores físicos e químicos do solo e a diversidade metabólica bacteriana. As variáveis explicativas, incluindo umidade relativa, nitrogênio total, carbono total, amônio, nitrato, pH, silte, argila, areia e relação C:N, representaram 49,10% nos dois primeiros eixos de análise. Umidade relativa e nitrato foram os principais fatores influenciadores da atividade metabólica em solos de planícies aluviais amazônicas.



**Tabela 1.** Valores médios ( $\pm$  DP) de fatores químicos do solo: umidade relativa (%), pH ( $\text{CaCl}_2$ ), carbono total (%), nitrogênio total (%), amônio ( $\text{mg Kg}^{-1}$ ), nitrato ( $\text{mg Kg}^{-1}$ ), areia (%), argila (%) e silte (%) durante períodos não inundado e inundado em sítios amostrais florestal e sistema agrícola tradicional em diferentes tipo de água da Amazônia.

Parâmetros físico-químicos	Planície aluvial de água negra do Rio Negro				Planície aluvial de água clara do Rio Tocantins				Planície aluvial de água branca do Rio Solimões			
	NI		I		NI		I		NI		I	
	FLO	SAT	FLO	SAT	FLO	SAT	FLO	SAT	FLO	SAT	FLO	SAT
Umidade relativa (%)	4,88*a $\pm$ 2,18	1,98*a $\pm$ 0,34	42,97*a $\pm$ 12,04	30,78*a $\pm$ 5,16	8,05*a $\pm$ 5,24	6,09*a $\pm$ 1,16	33,74*a $\pm$ 2,78	31,0*a $\pm$ 3,75	4,60*a $\pm$ 0,44	2,85*a $\pm$ 0,07	37,92*a $\pm$ 0,20	32,99*a $\pm$ 0,70
pH ( $\text{CaCl}_2$ )	3,77*a $\pm$ 0,14	4,05*a $\pm$ 0,08	3,79*a $\pm$ 0,22	4,42*b $\pm$ 0,35	3,65*a $\pm$ 0,01	3,97*a $\pm$ 0,04	3,75*a $\pm$ 0,01	4,08*a $\pm$ 0,09	4,15*a $\pm$ 0,05	4,08*a $\pm$ 0,04	4,58*a $\pm$ 0,25	4,43*a $\pm$ 0,06
Carbono Total (%)	4,45*a $\pm$ 1,80	4,55*a $\pm$ 0,59	2,12*a $\pm$ 0,64	0,96*a $\pm$ 0,64	2,05*a $\pm$ 1,04	1,37*a $\pm$ 0,14	1,49*a $\pm$ 0,69	1,14*a $\pm$ 0,85	1,35*a $\pm$ 0,10	1,12*a $\pm$ 0,21	0,75*a $\pm$ 0,25	0,86*a $\pm$ 0,35
Nitrogênio Total (%)	0,52*a $\pm$ 0,12	0,43*a $\pm$ 0,06	0,16*a $\pm$ 0,04	0,08*a $\pm$ 0,05	0,25*a $\pm$ 0,06	0,16*a $\pm$ 0,10	0,12*a $\pm$ 0,05	0,10*a $\pm$ 0,05	0,23*a $\pm$ 0,02	0,20*b $\pm$ 0,03	0,09*a $\pm$ 0,02	0,09*a $\pm$ 0,02
Amônio ( $\text{mg Kg}^{-1}$ )	24,88*a $\pm$ 10,28	10,86*a $\pm$ 5,81	77,69*a $\pm$ 40,75	20,00*b $\pm$ $\pm$ 7,92	6,08*a $\pm$ 2,85	13,00*a $\pm$ 9,21	31,44*a $\pm$ 17,96	24,35*a $\pm$ 5,28	4,41*a $\pm$ 1,91	8,44*a $\pm$ 2,79	23,18*a $\pm$ 1,67	12,85*a $\pm$ 0,73
Nitrato ( $\text{mg Kg}^{-1}$ )	2,73*a $\pm$ 4,41	1,90*a $\pm$ 0,86	0,09*a $\pm$ 0,16	0,00*a $\pm$ 0,00	9,33*a $\pm$ 2,03	4,20*b $\pm$ 1,52	0,25*a $\pm$ 0,20	0,07*a $\pm$ 0,06	0,66*a $\pm$ 0,77	7,10*b $\pm$ 2,38	0,00*a $\pm$ 0,00	0,00*a $\pm$ 0,00
Areia <sup>1</sup> (%)	63,43 $\pm$ 7,65	77,64 $\pm$ 6,67	63,43 $\pm$ 7,65	77,64 $\pm$ 6,67	30,14 $\pm$ 2,42	53,39 $\pm$ 14,92	30,14 $\pm$ 2,42	53,39 $\pm$ 14,92	2,84b $\pm$ 0,24	8,11a $\pm$ 2,81	2,84b $\pm$ 0,24	2,84b $\pm$ 0,24
Argila <sup>1</sup> (%)	29,35 $\pm$ 5,08	18,07 $\pm$ 5,02	29,35 $\pm$ 5,08	18,07 $\pm$ 5,02	26,03 $\pm$ 3,34	17,62 $\pm$ 8,34	26,03 $\pm$ 3,34	17,62 $\pm$ 8,34	22,33 $\pm$ 1,20	21,8 $\pm$ 2,10	22,33 $\pm$ 1,20	22,33 $\pm$ 1,20
Silte <sup>1</sup> (%)	7,22 $\pm$ 2,60	4,3 $\pm$ 1,66	7,22 $\pm$ 2,60	4,3 $\pm$ 1,66	43,83 $\pm$ 1,25	28,99 $\pm$ 11,5	43,83 $\pm$ 1,25	28,99 $\pm$ 11,5	74,83a $\pm$ 1,40	70,09b $\pm$ 0,78	74,83a $\pm$ 1,40	74,83a $\pm$ 1,40

DP, Desvio Padrão

FLO, Florestal; SAT, Sistema Agrícola Tradicional;

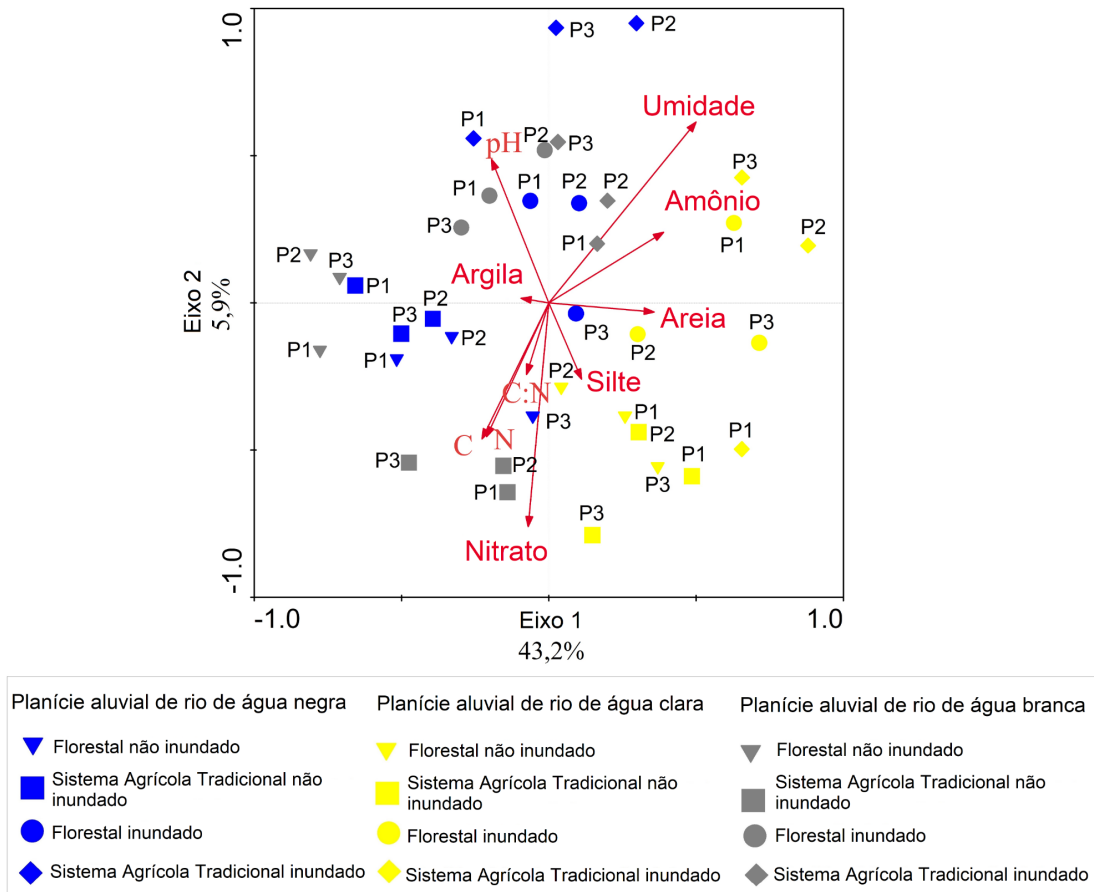
NI, Período Não Inundado; I, Período Inundado.

Valores com a mesma letra não foram significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) baseados no teste de Tukey HSD (Teste de Tukey da Diferença Honestamente Significativa) comparando FLOR versus SAT dentro de cada sazonalidade dos tipos de água da Amazônia.

Valores com o mesmo número de asterisco (\*) não foram significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) baseados no teste de Tukey HSD.

Todos os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

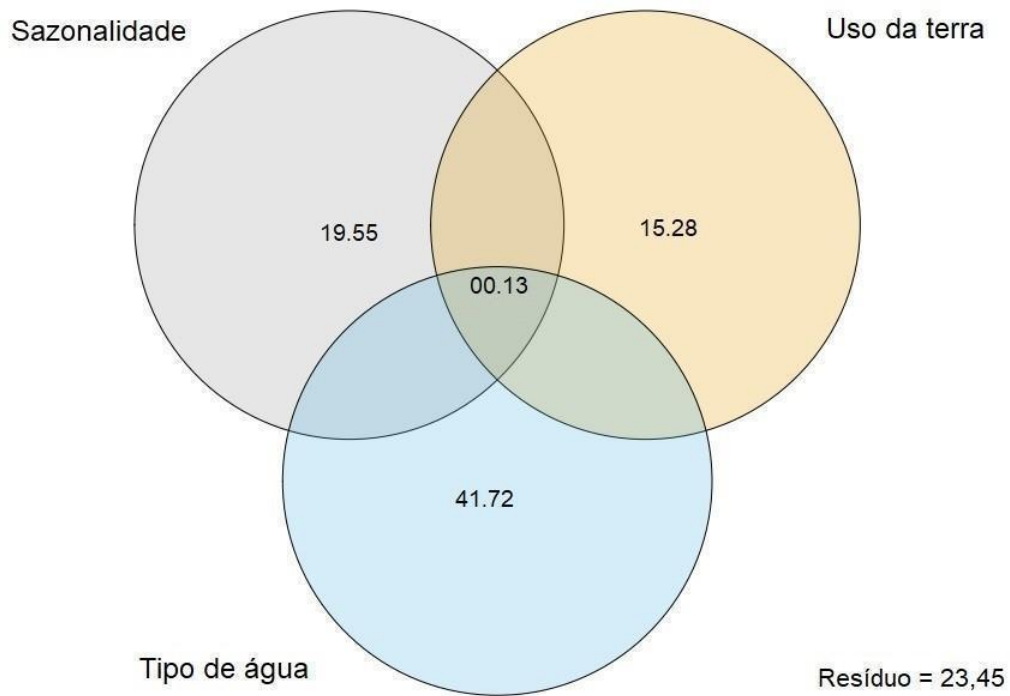
<sup>1</sup> A análise de granulometria do solo (porcentagens de areia, argila e silte) foram realizadas apenas no período não inundado.



**Figura 9.** Diagrama de ordenação restrito para os dois primeiros eixos de análise de redundância (RDA) com base nos fatores físico-químicos do solo e sua relação com a utilização de fontes de carbono às 168 h pela comunidade microbiana em três pontos de amostragem (P1, P2 e P3) de sítios florestais e sistemas agrícolas tradicionais de planícies aluviais amazônicas de rio de água negra (em azul), água clara (em amarelo) e água branca (em cinza) em dois períodos sazonais (não inundado e inundado). As quatro formas geométricas representam o sítio florestal não inundado (triângulo invertido), sistema agrícola tradicional não inundado (quadrado), sítio florestal inundado (círculo) e sistema agrícola tradicional inundado (losango)

### 3.3.3 Contribuição da sazonalidade, uso da terra e tipo de água para a variação das características metabólicas da comunidade microbiana

A VPA (Figura 10) foi utilizada para clarificar a influência da sazonalidade (período não inundado e inundado), uso da terra (florestal e sistema agrícola tradicional) e tipo de água (negra, clara e branca) sobre a função metabólica (guildas funcionais). A análise revelou que a proporção explicada puramente pelo tipo de água (41,72%) na atividade metabólica de comunidades microbiana é maior do que a explicação das variações pela sazonalidade (19,55%) e uso da terra (15,28%).



**Figura 10.** Análise de partição da variância (VPA) da contribuição da sazonalidade, uso da terra e tipo de água para a variação do consumo de guildas de substratos (aminoácidos, aminas, ácidos carboxílicos, carboidratos, compostos fenólicos e polímeros) pela comunidade microbiana em solos de planícies aluviais de diferentes águas amazônicas

### 3.4 Discussão

BIOLOG<sup>TM</sup> EcoPlate tem sido cada vez mais utilizada como metodologia de avaliação de perfis metabólicos de comunidades microbianas em áreas úmidas [4, 19, 28-32]. Esse estudo revelou a distribuição da diversidade funcional metabólica de comunidades microbianas em diferentes planícies aluviais amazônicas pela primeira vez. Salientamos que a metodologia BIOLOG<sup>TM</sup> EcoPlate possui uma configuração fechada, sendo que a resposta alcançada está dentro de um espectro esperado, ou seja, dentro das fontes contempladas pela metodologia. Nossos dados possuem caráter exploratório e destacam a necessidade de sabermos mais sobre a fisiologia e ecologia da microbiota do solo amazônico.

#### *Influência do uso da terra nos padrões de diversidade metabólica*

Na tentativa de avaliar tanto o efeito dos pulsos de inundações em planícies aluviais sob a influência de águas com diferentes colorações tal como sobre os usos da terra,

selecionamos o uso de solo florestal e sistema agrícola tradicional. O padrão de resposta da microbiota do solo da planície aluvial de rio de água negra revela que o sítio florestal quando comparado ao sistema agrícola tradicional apresentou uma maior capacidade geral da comunidade microbiana em utilizar uma gama superior de fontes de carbono (riqueza) e atividade metabólica média (AWDC). Os solos da planície aluvial de rio de água clara, por sua vez, apresentaram padrões diferentes em decorrência da sazonalidade. No período não inundado, o sistema agrícola tradicional apresentava maior capacidade geral de utilização quando comparado ao sítio florestal, no entanto a riqueza metabólica foi inferior. No período inundado, o sítio florestal responde com a maior atividade metabólica e riqueza de utilização de substratos. A comunidade microbiana do solo de planície aluvial de rio de água branca indicou que o sistema agrícola tradicional apresenta uma atividade microbiana e uma riqueza metabólica superior ao sítio florestal em ambos os períodos. A teoria ecológica sugere que maior diversidade de plantas deve levar a maior diversidade funcional da comunidade microbiana, talvez seja surpreendente que a influência da diversidade de plantas na função da comunidade microbiana não tenha sido fortemente observada [33-34] em todas as planícies aluviais.. Além disso, [35] destacam que a técnica pode favorecer os micro-organismos estrategistas-r, ou seja, aqueles que crescem rapidamente nos substratos, em paralelo aos micro-organismos estrategistas-k, espécies oligotróficas que acabam ficando em desvantagem.

Em relação a diferença de uso específico de fontes orgânicas, algumas inferências podem ser feitas em relação ao uso da terra. A amina (Feniletilamina) não foi utilizada pela microbiota do solo do sítio florestal da planície aluvial de água branca. Oest *et al.* [36] ao investigar os padrões de utilização do substrato de carbono das comunidades microbianas de sedimentos do Rio Saint Clair e do Lago Saint Clair na fronteira entre EUA e Canadá, observaram que essa amina tinha sido utilizada em um nível significativamente mais alto nos sedimentos do rio e não foram utilizados, ou foram mal metabolizados, pelas comunidades microbianas nos sedimentos do lago.

A D-xilose que é o segundo açúcar mais abundante da lignocelulose [37], não foi utilizado durante o período não inundado pela microbiota do solo do sistema agrícola tradicional de água clara, enquanto isso no sítio florestal ele foi moderadamente consumido  $AWDC_{0,64}$ .

*Influência dos pulsos de inundações nos padrões de diversidade metabólica*

As inundações podem ser consideradas um grande distúrbio em ecossistemas de várzea, resultando em efeito sobre a dinâmica do carbono e dinâmica microbiana [38]. Grande parte dessas alterações podem ser resultantes da liberação de compostos orgânicos solúveis no solo, criando condições favoráveis para o crescimento de micro-organismos [39].

A análise dos dados de utilização das 31 fontes de carbono revela que a inundação resultou em uma gama mais diversa e intensa de utilização de substratos pela população microbiana nativa. No entanto, algumas fontes apresentaram comportamento que vale ser destacado, como por exemplo o composto fenólico, Ácido 2-hidroxibenzóico não utilizado pelos sítios amostrais de solo de planície aluvial de águas negra e clara durante o período inundado. Em estudo realizado por [39], com simulação de inundação, o substrato era um dos menos degradados pela microbiota do solo. Rutgers *et al.* [40] aponta para o fato desse substrato ser de difícil degradação. Ao contrário, o também composto fenólico avaliado (Ácido 4-hidroxibenzóico) que se distingue pela posição dos grupos hidroxila no anel de fenol, apresentou melhor metabolização durante o período inundado. Dentre os ácidos carboxílicos que apresentaram alteração entre os períodos, o Ácido d-galacturônico foi bem assimilado pela microbiota presente no solo em planícies aluviais de rios de águas negras, claras e brancas durante o período inundado. Furtak *et al.* [39] apresentou o Ácido d-galacturônico como um dos substratos mais intensamente decompostos. Segundo [32], o Ácido d-galacturônico surge geralmente durante a hidrólise enzimática da pectina.

Embora a taxa de utilização das seis guildas de carbono pelas comunidades microbianas do solo tenha variado com o tipo de água e período amostral, preferencialmente, os grupos utilizados foram aminoácidos, polímeros e ácidos carboxílicos. Dentre os seis aminoácidos avaliados, a melhor metabolização de substratos em decorrência da inundação decorrente do pulso de inundação foi observada em L-arginina, L-asparagina e L-serina. L-asparagina e L-serina pertencem ao grupo de aminoácidos polares e têm uma estrutura química semelhante [32]. O acúmulo de matéria orgânica do solo e o maior conteúdo de N do solo apresentaram relação positiva com o acréscimo de aminoácidos livres, adsorvidos e hidrolisáveis em solo de altitudes elevadas [41]. Assim a entrada de resíduos e o provável aumento do nível de serapilheira decorrentes dos pulsos de inundações podem tornar esses substratos mais utilizados. A produção e utilização de aminoácidos nas células vegetais ou

microbianas, bem como os processos do ecossistema, estão todos significativamente relacionados à composição de aminoácidos do solo [41].

A utilização dos grupos de substratos polímeros foi mantida em um nível mais alto durante o período não inundado. A criação de um ambiente mais favorável para certos micro-organismos do solo para utilizar substratos específicos foi observada também por [42] ao monitorar as mudanças da comunidade microbiana em solos ácidos degradados, avaliados em um experimento de microcosmo utilizando a lama vermelha (resíduo de bauxita) como possível agente estimulante para atividade microbiana.

Cristian *et al.* [43] ao avaliarem padrões sazonais na interface sedimento-água em um reservatório eutrófico nos EUA relataram diferenças sazonais no padrão de uso de substrato. Durante a primavera, período em que ocorre aumento de temperatura e decréscimo de oxigênio dissolvido, a preferência foi por carboidratos. Com o advento do verão, maior acréscimo de temperaturas e esgotamento de oxigênio dissolvido, a preferência de substratos mudou para aminoácidos, ácidos carboxílicos e aminas. Já durante o inverno, carboidratos e polímeros foram os mais metabolizados. Sedimento de um riacho de água doce tropical avaliado sob condições aeróbias e anaeróbias apresentaram maior diversidade metabólica sob condições anaeróbias [44].

Em solos de planícies aluviais de rios de águas negras e claras, a utilização preferencial do carboidrato denominado D-xilose foi observada nos sítios florestais durante o período não-inundado. Sob influência da inundaçã, houve um decréscimo acentuado ou não utilização do mesmo. O decréscimo de utilização também foi observado para outros carboidratos, tais como: D-Celobiose, alpha-D-Lactose, Beta-metil-d-glicosídeo.

O polímero Tween 40 foi o substrato mais metabolizado de forma geral. Com exceção da baixa utilização pela microbiota do solo no sistema agrícola tradicional de rio de água negra e sítio florestal de rio de água clara durante o período não inundado, AWDC esteve acima de 0,65 em todos os pontos amostrais. Behera *et al.* [45] ao avaliarem a diversidade estrutural e metabólica de comunidades microbianas da rizosfera de *Phragmites karka* em uma lagoa costeira tropical na Índia revelaram que os polímeros Tween 40 e 80 estiveram entre as nove fontes de carbono utilizadas em todas as amostras de sedimentos. Os autores registraram o maior consumo dos substratos de carbono: Ácido D-galacturônico (ácidos carboxílicos), Ácido 4-hidroxibenzóico (composto fenólico), D-manitol (carboidrato), L-asparagina (aminoácido), Putrescina (aminas) e Tween 40 (polímero). Nossos resultados

revelam padrão de comportamento similar para os substratos Tween 40 e 80 (polímeros), L-Asparagina (aminoácido) e D-manitol (carboidrato). Assim, polímeros e aminoácidos que estão tipicamente presentes nos exsudatos da raiz [45] parecem fornecer os melhores substratos de crescimento para comunidades do solo amazônico.

#### *Influência da coloração das águas nos padrões de diversidade metabólica*

Respostas das comunidades microbianas dos solos de planícies aluviais de rios de águas negras e brancas apresentaram o mesmo padrão em relação a menor utilização de substratos (compostos fenólicos). Os dados sugerem que os solos sob a influência de água clara possuem menor capacidade de utilizar aminas durante o período não inundado e carboidratos durante o período inundado. Em estudo recente conduzido em manguezais tropicais chineses, os autores traçaram perfil de utilização de fontes de carbono contempladas pela metodologia BIOLOG<sup>TM</sup> EcoPlate, a taxa de utilização de polímeros, aminoácidos e ácidos carboxílicos variou conforme a região de amostragem, mas foi maior do que o das outras três fontes de carbono [4].

Claramente, compreender como as comunidades microbianas respondem a vetores de mudança climática em condições de campo é importante para fazer previsões precisas de como os ecossistemas podem responder a cenários futuros climáticos. Castro *et al.* [46] avaliaram respostas da comunidade microbiana do solo a múltiplos fatores experimentais de mudanças climáticas e a precipitação teve o maior impacto na composição da comunidade microbiana. Os autores salientam que a umidade do solo pode afetar o estado fisiológico dos micro-organismos, propriedades físico-químicas dos solos e a produtividade das plantas.

O fator ambiental ‘umidade do solo’ em planícies aluviais de água negra e branca atuou no acréscimo de metabolização das fontes de carbono e mudanças das guildas de utilização, já em solos de planície aluvial de água clara o pulso de inundação foi um preditor de alteração de guildas utilizadas. Durante o período inundado houve uma prevalência do uso da guilda aminoácidos, que é considerada uma fonte de carbono rica em nitrogênio para plantas em ecossistemas naturais e sistemas agrícolas [47, 48]. A microbiota além de utilizar o carbono presente em tais substratos, incorpora a cadeia lateral de  $\text{NH}_4^+$ , que posteriormente é transformado em moléculas orgânicas, como aminoácidos e proteínas [36]. Liu *et al.* [49] ao avaliarem taxas de absorção e contribuições de formas orgânicas e inorgânicas de N por

marcação com  $^{15}\text{N}$  espécies arbóreas dominantes em florestas temperadas e tropicais revelaram uma forte preferência por  $\text{NH}_4^+$  ao invés de glicina e absorção de  $\text{NO}_3^-$ . Os dados das frações de nitrogênio revelam o acréscimo das concentrações de  $\text{NH}_4^+$  em decorrência do pulso de inundação, de acordo com [50] o incremento de nitrogênio (N), particularmente em florestas tropicais ricas em N, provavelmente mudará a composição e o comportamento das comunidades microbianas impulsionada por interações complexas entre a comunidade microbiana composição, capacidade enzimática e química do solo.

### 3.5 Conclusão

Em conclusão, os resultados obtidos demonstraram que os solos de planícies aluviais com diferentes propriedades biogeoquímicas têm comunidades microbianas que exibem respostas metabólicas distintas a uma variedade de fontes de carbono. Observamos que as alterações do solo resultante dos pulsos de inundação e consequente acréscimo do parâmetro ‘umidade do solo’, desencadeou aumento da atividade metabólica em solos de planícies aluviais de rios de águas negra e branca. Já sob solo de planície aluvial de rio de água clara, com a maior habilidade metabólica geral, a mudança esteve mais relacionada a alteração das guildas funcionais, com o sítio florestal alterando o maior consumo de polímeros e ácidos carboxílicos para carboidratos e o sistema agrícola tradicional, de aminoácidos e ácidos carboxílicos para polímeros. Em relação à segunda hipótese, os resultados revelam que existem diferenças nos perfis metabólicos de solos sob influência de diferentes águas amazônicas. Demonstramos que a microbiota do solo de planície aluvial de rio de água branca é distinta em riqueza metabólica daquelas de solo de planícies aluviais de rios de águas negra e branca. Fornecemos assim, algumas informações que reforçam a importância de incluir solos sob a influência de diferentes águas e a ‘umidade do solo’ como fator ambiental modelador em planícies aluviais amazônicas para monitoramento e planejamento da conservação.



## Referências

- [1] SHAH, V.; BELOZEROVA, I. Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 197, n. 1–4, p. 143–148, 2009.
- [2] FRĄC, M.; OSZUST, K.; LIPIEC, J. Community level physiological profiles (CLPP), characterization and microbial activity of soil amended with dairy sewage sludge. **Sensors**, v. 12, n. 3, p. 3253–3268, 2012.
- [3] ESCALAS, A.; HALE, L.; VOORDECKERS, J. W.; *et al.* Microbial functional diversity: From concepts to applications. **Ecology and Evolution**, v. 9, n. 20, p. 12000–12016, 2019.
- [4] WANG, H.; TIAN, T.; GONG, Y.; *et al.* Both environmental and spatial variables affect bacterial functional diversity in mangrove sediments at an island scale. **Science of the Total Environment**, v. 753, p. 142054, 2021.
- [5] HUESO, S.; GARCÍA, C.; HERNÁNDEZ, T. Severe drought conditions modify the microbial community structure, size and activity in amended and unamended soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 50, p. 167–173, 2012.
- [6] GRYTA, A.; FRĄC, M.; OSZUST, K. The Application of the Biolog EcoPlate Approach in Ecotoxicological Evaluation of Dairy Sewage Sludge. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 4, p. 1434–1443, 2014.
- [7] FLORES, B. M.; HOLMGREN, M.; XU, C.; *et al.* Floodplains as an Achilles' heel of Amazonian forest resilience. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 17, p. 4442–4446, 2017.
- [8] JUNK, W. J.; WITTMANN, F.; SCHÖNGART, J.; PIEDADE, M. T. F. A classification of the major habitats of Amazonian black-water river floodplains and a comparison with their white-water counterparts. **Wetlands Ecology and Management**, v. 23, n. 4, p. 677–693, 2015.
- [9] BOGOTÁ-GREGORY, J. D.; LIMA, F. C. T.; CORREA, S. B.; *et al.* Biogeochemical water type influences community composition, species richness, and biomass in megadiverse Amazonian fish assemblages. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2020.
- [10] JUNK, W. J.; PIEDADE, M. T. F.; SCHÖNGART, J.; COHN-HAFT, M.; ADENEY, J. M.; WITTMANN, F. A classification of major naturally-occurring amazonian lowland wetlands. **Wetlands**, v. 31, n. 4, p. 623–640, 2011.
- [11] DE FÁTIMA ROSSETTI, D.; MANN DE TOLEDO, P.; GÓES, A. M. New geological framework for Western Amazonia (Brazil) and implications for biogeography and evolution. **Quaternary Research**, v. 63, n. 1, p. 78–89, 2005.

- [12] WEISE, L.; ULRICH, A.; MOREANO, M.; *et al.* Water level changes affect carbon turnover and microbial community composition in lake sediments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 5, p. 1–14, 2016.
- [13] ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; DE MORAES GONÇALVES, J. L.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711–728, 2013.
- [14] MENDES, L. W.; DE CHAVES, M. G.; FONSECA, M. DE C.; *et al.* Resistance Breeding of Common Bean Shapes the Physiology of the Rhizosphere Microbiome. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–10, 2019.
- [15] VINTHER, F. P.; ELSGAARD, L.; JACOBSEN, O. S. Heterogeneity of bacterial populations and pesticide degradation potentials in the unsaturated zone of loamy and sandy soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 33, n. 6, p. 514–520, 2001.
- [16] VINTHER, F. P.; MORTENSEN, G. K.; ELSGAARD, L. Effects of linear alkylbenzene sulfonates on functional diversity of microbial communities in soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 35–39, 2003.
- [17] FECKLER, A.; GOEDKOOP, W.; ZUBROD, J. P.; SCHULZ, R.; BUNDSCHUH, M. Exposure pathway-dependent effects of the fungicide epoxiconazole on a decomposer-detritivore system. **Science of the Total Environment**, v. 571, p. 992–1000, 2016.
- [18] SONG, B.; ZENG, Z.; ZENG, G.; *et al.* Effects of hydroxyl, carboxyl, and amino functionalized carbon nanotubes on the functional diversity of microbial community in riverine sediment. **Chemosphere**, v. 262, p. 128053, 2021.
- [19] ZHEN TENG; FAN, W.; WANG, H.; CAO, X.; XU, X. Monitoring Soil Microorganisms with Community-Level Physiological Profiles Using Biolog EcoPlates™ in Chaohu Lakeside Wetland, East China. **Eurasian Soil Science**, v. 53, n. 8, p. 1142–1153, 2020.
- [20] SALA, M. M.; TERRADO, R.; LOVEJOY, C.; UNREIN, F.; PEDRÓS-ALIÓ, C. Metabolic diversity of heterotrophic bacterioplankton over winter and spring in the coastal Arctic Ocean. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 942–949, 2008.
- [21] EMBRAPA (2009). Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes. EMBRAPA Informações Tecnológicas, 2 Edn. rev. ampl. Brasília: **EMBRAPA** Informação Tecnológica.
- [22] NORMAN, R. J.; EDBERG, J. C.; STUCKI, J. W. Determination of Nitrate in Soil Extracts by Dual-wavelength Ultraviolet Spectrophotometry. **Soil Science Society of America Journal**, v. 49, n. 5, p. 1182–1185, 1985.
- [23] KRORN, M. D. Spectrophotometric Determination of Ammonia : A Study of a Modified Berthelot Reaction Using Salicylate and Dichloroisocyanurate. **The Analyst**, v. 105, n. 1249, p. 305–316, 1980.

- [24] Rinker, T. W.; Kurkiewicz, D. (2017). **pacman: Package Management for R**. version 0.4.6. University at Buffalo. Buffalo, New York. <http://github.com/trinker/pacman>
- [25] KOLDE R. **Package ‘pheatmap’**. 2019. <https://cran.r-project.org/web/packages/pheatmap/pheatmap.pdf>. Data do acesso: 10 de maio de 2021
- [26] OKSANEN J, BLANCHET FG, LEGENDRE P, MINCHIN PR, O’HARA RB, SIMPSON GL *et al.* (2016). **Vegan: Community Ecology Package R Package Version 2.3-3**.
- [27] RStudio Team. (2018). **RStudio: Integrated development for R**. Retrieved from <http://www.rstudio.com/>
- [28] FURTAK, K.; GRZADZIEL, J.; GAŁAZKA, A.; NIEDŹWIECKI, J. Analysis of soil properties, bacterial community composition, and metabolic diversity in fluvisols of a floodplain area. **Sustainability** (Switzerland), v. 11, n. 14, 2019.
- [29] LV, T.; CARVALHO, P. N.; ZHANG, L.; *et al.* Functionality of microbial communities in constructed wetlands used for pesticide remediation: Influence of system design and sampling strategy. **Water Research**, v. 110, p. 241–251, 2017.
- [30] RAMÍREZ-VARGAS, C. A.; ARIAS, C. A.; ZHANG, L.; PAREDES, D.; BRIX, H. Community level physiological profiling of microbial electrochemical-based constructed wetlands. **Science of the Total Environment**, v. 721, p. 137761, 2020.
- [31] ZHANG, Y.; LYU, T.; ZHANG, L.; *et al.* Microbial community metabolic profiles in saturated constructed wetlands treating iohexol and ibuprofen. **Science of the Total Environment**, v. 651, p. 1926–1934, 2019.
- [32] SALOMO, S.; MÜNCH, C.; RÖSKE, I. Evaluation of the metabolic diversity of microbial communities in four different filter layers of a constructed wetland with vertical flow by Biolog<sup>TM</sup> analysis. **Water Research**, v. 43, n. 18, p. 4569–4578, 2009.
- [33] WU, M.; ZHANG, M.; DING, W.; *et al.* Microbial carbon metabolic functions in sediments influenced by resuspension event. **Water** (Switzerland), v. 13, n. 1, p. 1–14, 2021.
- [34] BUTTON, M.; RODRIGUEZ, M.; BRISSON, J.; WEBER, K. P. Use of two spatially separated plant species alters microbial community function in horizontal subsurface flow constructed wetlands. **Ecological Engineering**, v. 92, p. 18–27, 2016.
- [35] LAGERLÖF, J.; ADOLFSSON, L.; BÖRJESSON, G.; *et al.* Land-use intensification and agroforestry in the Kenyan highland: Impacts on soil microbial community composition and functional capacity. **Applied Soil Ecology**, v. 82, p. 93–99, 2014.
- [36] OEST, A.; ALSAFFAR, A.; FENNER, M.; AZZOPARDI, D.; TIQUIA-ARASHIRO, S. M. Patterns of change in metabolic capabilities of sediment microbial communities in river and lake ecosystems. **International Journal of Microbiology**, v. 2018, p. 5–7, 2018.
- [37] NAKAMURA, N.; YAMADA, R.; KATAHIRA, S.; *et al.* Effective xylose/cellobiose co-fermentation and ethanol production by xylose-assimilating *S. cerevisiae* via expression of

$\beta$ -glucosidase on its cell surface. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 3, p. 233–236, 2008.

[38] WILSON, J.S.; BALDWIN, D.S.; REES, G.N.; WILSON, B.P. The effects of short-term inundation on carbon dynamics, microbial community structure and microbial activity in floodplain soil. **River Res. Applic.**, v. 27, p. 213–225, 2011.

[39] FURTAK, K.; GRZĄDZIEL, J.; GAŁĄZKA, A.; NIEDŹWIECKI, J. Prevalence of unclassified bacteria in the soil bacterial community from floodplain meadows (fluvisols) under simulated flood conditions revealed by a metataxonomic approach. **Catena**, v. 188, n. December 2019, 2020.

[40] RUTGERS, M.; WOUTERSE, M.; DROST, S. M.; *et al.* Monitoring soil bacteria with community-level physiological profiles using Biolog<sup>TM</sup> ECO-plates in the Netherlands and Europe. **Applied Soil Ecology**, v. 97, p. 23–35, 2016.

[41] CAO, X.; MA, Q.; ZHONG, C.; *et al.* Elevational variation in soil amino acid and inorganic nitrogen concentrations in Taibai Mountain, China. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, 2016.

[42] FEIGL, V.; UJACZKI, É.; VASZITA, E.; MOLNÁR, M. Influence of red mud on soil microbial communities: Application and comprehensive evaluation of the Biolog EcoPlate approach as a tool in soil microbiological studies. **Science of the Total Environment**, v. 595, p. 903–911, 2017.

[43] CHRISTIAN, B. W.; LIND, O. T. Multiple carbon substrate utilization by bacteria at the sediment-water interface: Seasonal patterns in a stratified eutrophic reservoir. **Hydrobiologia**, v. 586, n. 1, p. 43–56, 2007.

[44] COSTA, P. S.; REIS, M. P.; ÁVILA, M. P.; *et al.* Metagenome of a microbial community inhabiting a metal-rich tropical stream sediment. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–21, 2015.

[45] BEHERA, P.; MOHAPATRA, M.; ADHYA, T. K.; *et al.* Structural and metabolic diversity of rhizosphere microbial communities of *Phragmites karka* in a tropical coastal lagoon. **Applied Soil Ecology**, v. 125, n. December 2017, p. 202–212, 2018.

[46] CASTRO, H. F.; CLASSEN, A. T.; AUSTIN, E. E.; NORBY, R. J.; SCHADT, C. W. Soil microbial community responses to multiple experimental climate change drivers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 4, p. 999–1007, 2010.

[47] CHAPIN, F. S.; MOILANEN, L.; KIELLAND, K. Preferential use of organic nitrogen for growth by a non-mycorrhizal arctic sedge. **Nature**, v. 361, n. 6408, p. 150–153, 1993.

[48] KIELLAND, K.; MCFARLAND, J.; OLSON, K. Amino acid uptake in deciduous and coniferous taiga ecosystems. **Plant and Soil**, v. 288, n. 1–2, p. 297–307, 2006.

[49] LIU, M.; LI, C.; XU, X.; *et al.* Organic and inorganic nitrogen uptake by 21 dominant tree species in temperate and tropical forests. **Tree Physiology**, v. 37, n. 11, p. 1515–1526, 2017.

[50] CUSACK, D. F.; SILVER, W. L.; TORN, M. S.; BURTON, S. D.; FIRESTONE, M. K. Changes in microbial community characteristics and soil organic matter with nitrogen additions in two tropical forests. **Ecology**, v. 92, n. 3, p. 621–632, 2011.

#### 4 Capítulo 3 - PRODUÇÃO POTENCIAL DE METANO EM SOLOS DE PLANÍCIES ALUVIAIS AMAZÔNICAS EM CENÁRIO PREVISTO DE MUDANÇA CLIMÁTICA<sup>2</sup>

##### RESUMO

Os solos de planícies aluviais amazônicas armazenam grande quantidade de carbono orgânico, o qual pode ser liberado na atmosfera como gás metano (CH<sub>4</sub>). Para explorar a importância da metanogênese acetoclástica, hidrogenotrófica e metilotrófica em planícies aluviais dos Rios Negro (água negra), Tocantins (água clara) e Solimões (água branca) localizadas na Amazônia brasileira, assumindo um acréscimo de 2°C previsto para essa região como consequência das mudanças climáticas, o potencial de produção de CH<sub>4</sub> pela microbiota do solo foi avaliado em reatores biológicos anaeróbios. As amostras de solos foram enriquecidas com meio de cultura acrescido de acetato de sódio, formiato de sódio e metanol, separadamente, para estimular os metabolismos acetoclástico, hidrogenotrófico e metilotrófico, respectivamente. Adicionalmente, a glicose foi utilizada como indutor da fermentação anaeróbia, com seus produtos da fermentação podendo ser utilizados como substratos primários para a metanogênese. O monitoramento da produção de CH<sub>4</sub> foi realizado por cromatografia gasosa em um total de 144 biorreatores. Analisando o potencial de produção de CH<sub>4</sub> entre os precursores das vias acetoclástica, hidrogenotrófica e metilotrófica, os enriquecimentos em biorreatores contendo acetato de sódio ( $0,19 \pm 0,04$  a  $595,38 \pm 149,69 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo) e metanol ( $0,08 \pm 0,02$  a  $1474,72 \pm 391,86 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo) apresentaram maior potencial quando comparados aos enriquecimentos com formiato de sódio ( $0,11 \pm 0,00$  a  $41,96 \pm 1,22 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo). As mais elevadas produções de CH<sub>4</sub> para os enriquecimentos com acetato de sódio, glicose e metanol foram observadas no sistema agrícola tradicional de água branca durante o período não inundado ( $595,38 \pm 149,69$ ,  $2043,86 \pm 198,51$ ,  $1474,72 \pm 391,86 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo, respectivamente) coincidindo com a maior temperatura de incubação (33,60°C). O DNA total dos solos enriquecidos e incubados foi hibridizado em microarranjo de DNA (GeoChip v.5.0S) e os resultados revelaram que as maiores porcentagens de hibridizações para a degradação e fixação de carbono e metanogênese não foram associadas às maiores produções de CH<sub>4</sub>. Esses resultados demonstram a relevância do potencial de

---

<sup>2</sup> Artigo não submetido

produção de CH<sub>4</sub> pela metanogênese metilotrófica e reforçam a compreensão acerca do envolvimento de genes microbianos associados a múltiplos processos no solo, além daqueles associados à ciclagem de carbono, como responsáveis por essa produção de CH<sub>4</sub>.

Palavras-chave: Degradação anaeróbia; microarranjo de DNA; acetato de sódio; formiato de sódio; metanol.

#### 4.1 Introdução

O funcionamento das planícies aluviais amazônicas está vinculado a diferentes dinâmicas de trocas gasosas e tem sido apontado como uma importante, mas ainda pouco conhecida, fonte natural de emissão de CH<sub>4</sub> nos trópicos. A dinâmica dos fluxos gasosos está atrelada a condições altamente variáveis e heterogêneas, que oscilam de estritamente aeróbias a estritamente anaeróbias [1]. Essa dinâmica é resultado da variação mais marcante do sistema de várzea amazônica que são as inundações sazonais. O pulso de inundação, responsável pela mudança na saturação do solo, torna essas áreas predispostas à atividade da comunidade microbiana anaeróbia.

O ciclo de CH<sub>4</sub> em áreas úmidas é impulsionado principalmente por metanogênicas e metanotróficas [2]. As metanogênicas são um grupo de micro-organismos filogeneticamente coesos do domínio *Archaea* responsáveis pela produção de CH<sub>4</sub>, considerado o segundo gás de efeito estufa mais importante, com potencial de aquecimento global 25 vezes superior ao do gás carbônico (CO<sub>2</sub>) [3]. Não obstante, apenas uma fração do CH<sub>4</sub> produzido pelas metanogênicas é emitida para a atmosfera, uma vez que parte é oxidada pelas metanotróficas aeróbias e anaeróbias. Diante deste cenário e frente às mudanças em frequência de secas e cheias resultantes do aquecimento global [4,5] faz-se necessário compreender em mais detalhes como a seca e a inundação afetam o ciclo do CH<sub>4</sub> em planícies aluviais amazônicas.

A Amazônia, longe de ser homogênea, é detentora de um mosaico de habitats com uma variedade de solos e substratos distintos, integrados por uma rede ribeirinha biogeoquimicamente diversa que leva a extensas inundações sazonais com emissões reais variando com a área inundada e as características hidrogeoquímicas dos corpos d'água [6,7]. Sendo assim, as águas amazônicas são classificadas em três categorias biogeoquímicas (águas

negra, clara e branca) distintas por uma combinação de conteúdo de nutrientes dissolvidos, tipo de sedimento, transparência e acidez [8]. Tal classificação tem revelado alta heterogeneidade no fluxo de CH<sub>4</sub> em escala temporal e espacial de grandes rios amazônicos [9,10]. No entanto, a influência do tipo biogeoquímico da água sobre as comunidades relacionadas ao ciclo do CH<sub>4</sub> ainda permanecem poucos documentadas, apesar dos esforços da comunidade científica [11,12].

As comunidades microbianas metanogênicas possuem uma gama de substratos específicos, sendo ainda dependente de uma rede complexa de micro-organismos que conduzem até as condições necessárias para o estágio terminal da degradação da matéria orgânica [13]. Ocorrendo assim na etapa final a conversão de acetato, formiato, H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> ou metanol em CH<sub>4</sub> [14-16]. São assim classificadas em três grupos baseados no uso de substrato - acetoclástica, hidrogenotrófica e metilotrófica [17]. A metanogênese acetoclástica é realizada por *Methanosarcina* e *Methanosaeta* [18,19] que dividem o acetato para formar o CH<sub>4</sub> e o CO<sub>2</sub>. As metanogênicas hidrogenotróficas oxidam H<sub>2</sub>, formiato ou alguns álcoois simples e reduzem o CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub> [17]. As ordens *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanopyrales*, *Methanocellales* e *Methanomicrobiales* são predominantemente compostas por metanogênicas hidrogenotróficas [16, 20]. O terceiro tipo de substrato é o grupo que inclui metanol e compostos metilados, vinculando-se à metanogênese metilotrófica, que é realizada por membros da ordem *Methanomassiliicoccales* e *Methanofastidiosales*. Elas possuem sistemas de metiltransferase específicos de substrato para a utilização de metanol e aminas metiladas [21].

O sequenciamento de amplicon de transcritos alvo de 16S rRNA de *Archaea* das mesmas amostras de solo coletadas nas áreas amostrais estudadas nesse trabalho demonstrou a presença de diferentes ordens metanogênicas: *Methanobacteriales*, *Methanocellales*, *Methanofastidiosales*, *Methanomassiliicoccales*, *Methanomicrobiales* e *Methanosarcinales* [22]. Ao contrário das suposições de longa data sobre as restrições ambientais para a metanogênese metilotrófica, a ordem *Methanomassiliicoccales* apresentou abundâncias relativas oscilando entre 4,53 e 89,98% nas áreas deste estudo. Esta descoberta, combinada com resultados anteriores em áreas úmidas [23,24] levantou a possibilidade de que a metanogênese metilotrófica possa contribuir para o fluxo de CH<sub>4</sub> em áreas úmidas de água doce [25].



A metanogênese é um processo muito mais sensível à temperatura do que a metanotrofia que é mais fortemente limitada pelo substrato [26]. Assim, essa diferença entre as respostas à temperatura dentro do cenário de aumento de temperatura projetadas para região amazônica poderá perturbar o equilíbrio entre os dois processos, aumentando as emissões de metano desses ambientes de água doce.

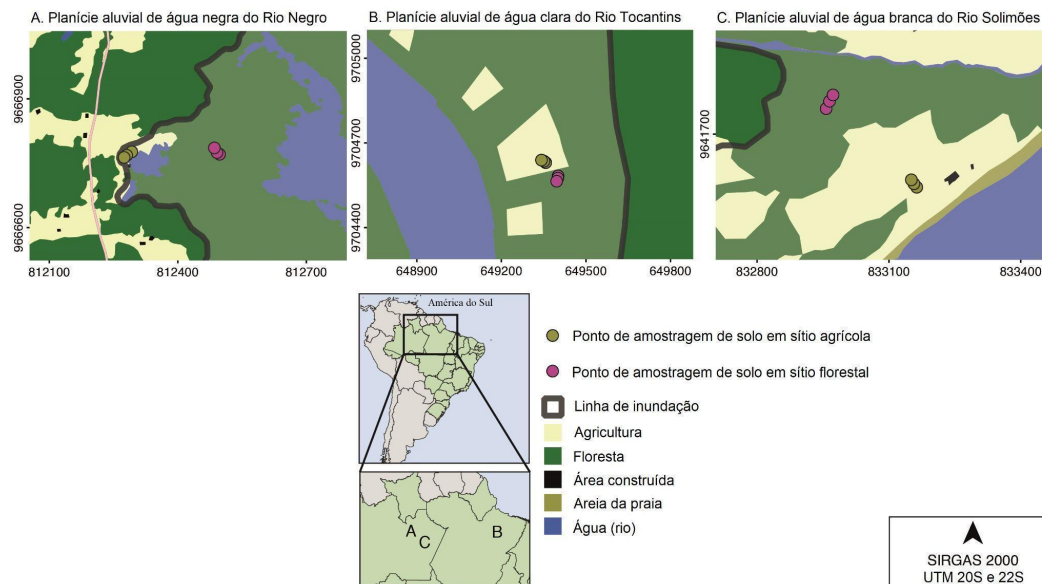
Assumindo o aumento de temperatura em 2°C previsto para a região da Amazônia nos próximos anos, hipotetizamos que a maior produção de CH<sub>4</sub> em solos de sítios florestais e agrícolas em planícies aluviais de rios amazônicos sazonalmente inundadas com águas negra, clara e branca envolve conjuntamente as vias acetoclástica, hidrogenotrófica e metilotrófica, com variações sazonais na conversão de acetato de sódio, formiato de sódio e metanol, em CH<sub>4</sub>. Em uma hipótese corolária, as maiores produções de CH<sub>4</sub> nesse cenário previsto é acompanhada por aumento da abundância de genes microbianos associados com a metanogênese e fixação e degradação de C. Para avaliar essas hipóteses, o efeito do aumento pontual da temperatura no potencial metanogênico foi avaliado utilizando ensaios em reatores biológicos contendo solo de planícies aluviais de rios com os diferentes tipos de água da Amazônia e meio de cultura enriquecido com diferentes fontes de C (acetato de sódio, formiato de sódio, glicose e metanol). A abundância dos genes funcionais microbianos foi estimada nesses solos utilizando a tecnologia denominada GeoChip v. 5.0S.

## **4.2 Materiais e métodos**

### **4.2.1 Sítios de amostragem**

Os solos avaliados no presente estudo foram provenientes de três planícies de aluviais de rios com diferentes tipos de água, localizados na Amazônia brasileira (rios Negro, Tocantins e Solimões). Amostras desses solos foram coletadas em dois locais de amostragem identificados como floresta primária e sistema agrícola tradicional em períodos contrastantes da hidrografia (seca e inundação) (Figura 1). A amostragem compreendeu seis combinações de "tipo de água" vs. "tipo de uso da terra" em período não inundado (outubro de 2017) e inundado (maio de 2018). Os locais de amostragem em cada local são afetados por um pulso de inundação de longa duração (mais de 5 meses). As áreas de estudo das planícies aluviais foram localizadas na planície de inundação de água negra do rio Negro (3°00'41"S e 60°11'15"W), na planície de inundação de água clara do rio Tocantins (2°40'51"S e

49°39'05"W) e na planície de inundação de água branca do rio Solimões (3°13'50"S e 59°59'26"W). O clima predominante nesta região é tropical úmido, sendo classificado como ‘Afi’ (classificação de Köppen) com temperaturas médias anuais superiores a 26°C, precipitação anual de aproximadamente 2000 mm, sol intenso, elevada umidade do ar e baixa velocidade do vento [27].



**Figura 1.** Locais de amostragem na Amazônia brasileira, uso da terra e linha de inundação nas três áreas de estudo sazonalmente inundadas com água negra (A), água clara (B) e água branca (C)

#### 4.2.2 Amostragem de solo

A amostragem de campo foi realizada em cada um dos locais de amostragem de florestas e sistemas agrícolas tradicionais, localizados em cada uma das planícies aluviais. Em cada local, foram recolhidas três amostras de solo equidistantes 14 m. As amostras de solo foram coletadas em um núcleo cilíndrico asséptico (camada de solo de 0-15 cm de profundidade, com 10 cm de diâmetro). No regime de inundação das planícies aluviais, foram recolhidas amostras de solo sub-aquáticos (camada de solo de 0-15 cm, com 10 cm de diâmetro) utilizando um amostrador manual universal de sedimentos com núcleo ajustável de 0-15 cm (Aquatic Research Instruments, ID, EUA).

#### 4.2.3 Potencial de produção de CH<sub>4</sub> com substratos adicionais

O experimento foi realizado com doze amostras compostas (três amostras de solo do

mesmo sítio amostral foram homogeneizadas para obter uma amostra) das planícies aluviais amazônicas. Os solos foram incubados em temperatura de 2°C acima da temperatura de amostragem para cada sítio, assim as temperaturas oscilaram entre 27,60 e 33,60°C (Tabela 1). Os biorreatores foram preparados em duplicata em frascos do tipo Schott Duran com capacidade de 0,50 L, em que 0,23 L correspondiam ao meio de enriquecimento anaeróbico e 8% (v/v) ao solo utilizado como inóculo (20g). O meio de cultura [28] foi preparado com a composição (g.L<sup>-1</sup>) conforme descrito por [29]. Tanto a água como as soluções foram preparadas de forma estéril e sob uma atmosfera de 99,99% de N<sub>2</sub>.

**Tabela 1.** Temperaturas de incubação dos biorreatores anaeróbios (°C) contendo amostras de solo coletadas durante os períodos não inundado (NI) e inundado (I) em sítios amostrais florestal (FLO) e sistema agrícola tradicional (SAT). A temperaturas correspondem à temperatura do ar durante a amostragem acrescidas em 2°C conforme projeção do IPCC para região amazônica

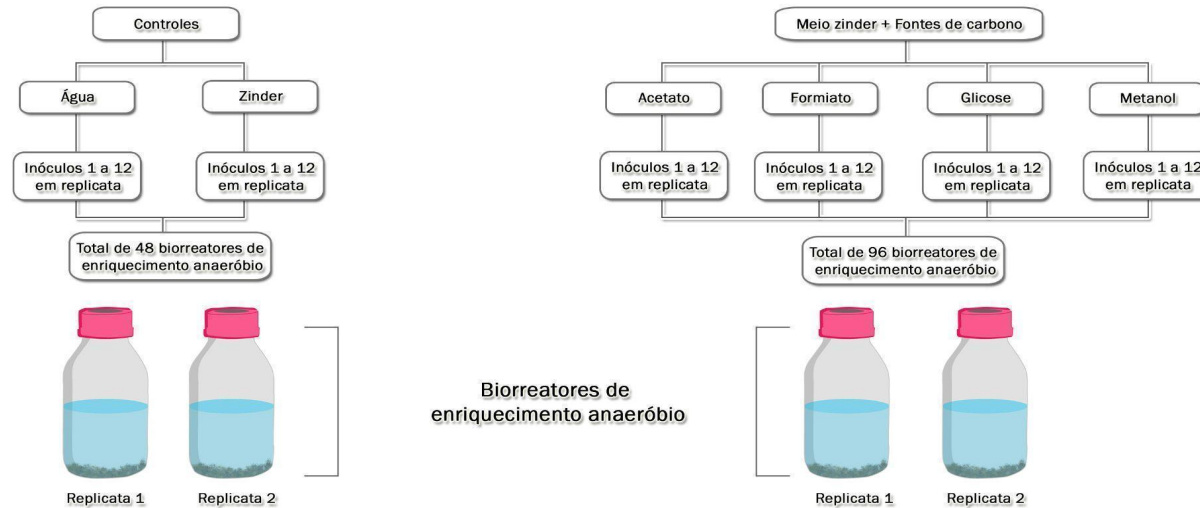
Planície aluvial de água negra do Rio Negro				Planície aluvial de água clara do Rio Tocantins				Planície aluvial de água branca do Rio Solimões			
NI		I		NI		I		NI		I	
FLO	SAT	FLO	SAT	FLO	SAT	FLO	SAT	FLO	SAT	FLO	SAT
27,60	33,60	31,80	30,50	29,60	31,80	27,60	30,50	28,70	33,60	29,60	29,60

As incubações foram realizadas até a estabilização da produção de CH<sub>4</sub> em cada biorreator metanogênico ou por 40 dias. Sendo dividido em duas fases: na fase 1, os primeiros sete dias de incubação antes do acréscimo das fontes orgânicas e na fase 2 do sétimo dia até a estabilização da produção de CH<sub>4</sub> ou por 40 dias. Os biorreatores apresentaram as seguintes configurações: controle água (230 mL de água destilada), controle Zinder (222,5 mL de meio, 2,5 mL de solução de vitamina, 2,5 mL de Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O e 2,5 mL de NaHCO<sub>3</sub>); fontes orgânicas (217,5 mL de meio, 2,5 mL de solução de vitamina, 2,5 mL de Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O, 2,5 mL de NaHCO<sub>3</sub>, e 5 mL de soluções de fontes orgânicas de C estoque anóxicas estéreis (1 M de acetato de sódio, formiato de sódio, glicose e metanol; para uma concentração de 22,47 mM). Os biorreatores foram mantidos sob atmosfera de mistura de gás N<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (70/30%, [vol/vol]) para garantir condições anaeróbicas do *headspace* [30]. No total, foram incubados 144 biorreatores (3 planícies x 2 períodos amostrais x 2 sítios amostrais x 6 tratamentos de substratos x 2 repetições - ver Figura 2), e 3456 amostras foram coletadas e analisadas (3 planícies x 2 períodos amostrais x 2 sítios amostrais x 6 tratamentos x 2 repetições x 24 amostras) para quantificação de CH<sub>4</sub>.

## INÓCULOS



## CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS



**Figura 2.** Representação esquemática das doze amostras compostas utilizadas como inóculos para as culturas de enriquecimento. Os biorreatores de enriquecimento anaeróbio a partir dos 12 inóculos foram suplementados com quatro tipos de fontes de carbono, além de dois tipos de controles e incubados sob condições de anaerobiose. Um total de 144 biorreatores foram monitorados durante o período de incubação

#### 4.2.4 Quantificação e cálculo de concentração de CH<sub>4</sub> no *headspace*

Os biorreatores foram monitorados periodicamente quanto à concentração de CH<sub>4</sub> no *headspace* por cromatografia gasosa (GC 2014 Shimadzu, Kyoto, Japan). O gás nitrogênio foi usado como gás de arraste com pressão de 400 kPa e as temperaturas do detector foram ajustadas isotérmicamente em 150°C e 400°C, respectivamente. O equipamento foi calibrado diariamente com sete padrões certificados: 0,96, 1,84, 3,58, 11,0, 24,0, 102,0 e 1030,0 ppm. As amostras de gás foram coletadas com seringa de 2,5 mL com uma válvula de três vias, e esse mesmo volume foi injetado para análise no cromatógrafo.

#### 4.2.5 Produção cumulativa de CH<sub>4</sub>

O modelo de Gompertz modificado foi utilizado para avaliar a produção de CH<sub>4</sub>. A taxa de produção de CH<sub>4</sub> é proporcional à atividade microbiana na cultura de enriquecimento, o modelo de Gompertz modificado pode ser usado para avaliar a fase de latência, rendimento máximo de CH<sub>4</sub> e taxa de produção de CH<sub>4</sub> [31,32]. As taxas de metanogênese foram calculadas a partir da concentração de CH<sub>4</sub> mensurado, que foi convertido e corrigido utilizando os dados de temperatura de incubação, pressão atmosférica do local de amostragem aplicando a lei de gases. O ajuste dos dados foi feito por meio da equação de Gompertz utilizando o software OriginPro 9.0, conforme descrito por [33] para cálculo da máxima produção (P) e início da produção de CH<sub>4</sub> ( $\lambda$ ). Os resultados são apresentados a partir do acúmulo de CH<sub>4</sub> por grama do solo seco ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  de solo).

#### 4.2.6 Extração de DNA das amostras dos biorreatores

Após análise das concentrações de CH<sub>4</sub> do *headspace* dos biorreatores foram escolhidas nove amostras. As amostras escolhidas eram provenientes dos biorreatores metanogênicos contendo solo da planície de água branca e contemplavam reatores (controle água, acetato de sódio, formiato de sódio, glicose e metanol) do sistema agrícola tradicional e florestal, durante período não inundado e inundado, respectivamente. Os controles contendo água geraram uma amostra única para hibridização para análise de Geochip 5.0. As extrações de DNA foram realizadas em triplicata a partir de 0,25 g de amostras de solo incubado

utilizando *PowerSoil Total DNA Kit* (Qiagen, Hilden, Germany), com protocolo fornecido. As concentrações e pureza das amostras de DNA foram mensuradas por espectrofotometria (Nanodrop ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc. Wilmington, DE, USA) para determinar absorvância nos seguintes comprimentos de onda: 230, 260, 280, and 320 nm.

#### **4.2.7 Análises utilizando GeoChip v. 5.0S e processamento de dados brutos**

Genes funcionais microbianos foram analisados usando a versão 60 K do Geochip v. 5.0S (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EUA), que contém aproximadamente 57.000 sondas para aproximadamente 151.000 genes alvo e é focado na análise dos principais processos ecológicos e geoquímicos (C, N, S e P) e outros grupos de genes funcionais importantes, como genes de degradação de contaminantes orgânicos e genes de resistência a antibióticos que alteram ou degradam o antibiótico alvo [34]. Um foco especial foi dado aos genes envolvidos diretamente na degradação de C, fixação de C e produção de CH<sub>4</sub> (metanogênese). A hibridização das amostras foi realizada conforme descrito anteriormente [35] no *Institute for Environmental Genomics* (IEG) na Oklahoma University (OU), Norman, Estados Unidos. Foram removidas as sondas como negativas se o SNR <2 ou intensidade do sinal <200. Pontos que foram detectados em menos de duas amostras foram removidos. As sondas hibridizadas foram primeiramente agrupadas por processo funcional (ciclagem de C), somando as intensidades dos sinais, para obter a abundância total de genes de cada processo. Posteriormente, foram calculadas as abundâncias relativas referente as hibridizações para cada gene.

#### **4.2.8 Análise estatística**

Os parâmetros  $P$ ,  $R_m$  e  $\lambda$  foram estimados por meio do software OriginPro<sup>®</sup> versão 9.0, sendo realizadas 100 interações para convergir os dados usando o modelo matemático de Gompertz modificado. Os dados de detecção relativa da intensidade do sinal normalizado dos principais genes ligados a cada família gênica são apresentados em porcentagens. Os gráficos foram elaborados no software OriginPro<sup>®</sup> versão 9.0. A análise de componentes principais

(ACP) foi utilizada para avaliar o agrupamento das amostras dos biorreatores metanogênicos, e foi realizada utilizando o programa Canoco 4.5 (Biometrics, Wageningen, The Netherlands).

### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 Produção de CH<sub>4</sub> em biorreatores

Experimentos conduzidos utilizando biorreatores revelaram que todos os solos amazônicos possuem potencial de produção de CH<sub>4</sub> em relação às fontes de C adicionadas (Figura 2). A maior produção de CH<sub>4</sub> nos biorreatores denominados “controles água” foram observadas no sítio florestal ( $5,69 \pm 1,28 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo) e no sistema agrícola tradicional de planície aluvial de água negra durante o período inundado ( $2,04 \pm 1,29 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo). Os biorreatores denominados “controles Zinder” apresentaram produção de CH<sub>4</sub> inferior ao controle água em solos da planície aluvial de água negra com exceção do sítio florestal durante o período não inundado que apresentou produção de  $1,99 \pm 0,38 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo nos biorreatores controle Zinder e  $1,77 \pm 0,13 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo nos biorreatores controle água. Em biorreatores contendo solos da planície aluvial de água clara foi observado o inverso do observado em biorreatores contendo solo da planície aluvial de água negra. Onde os biorreatores controle Zinder apresentando maior produção do que o solo incubado em biorreatores controle água. Assim, maiores produções de CH<sub>4</sub> para os controles Zinder foram observadas em biorreatores contendo solos do período não inundado (sítio florestal:  $5,65 \pm 1,71 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo, e sistema agrícola tradicional:  $4,27 \pm 1,04 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo). Os biorreatores controle água e Zinder da planície aluvial de água branca apresentaram produção de CH<sub>4</sub> inferior a  $0,20 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo.

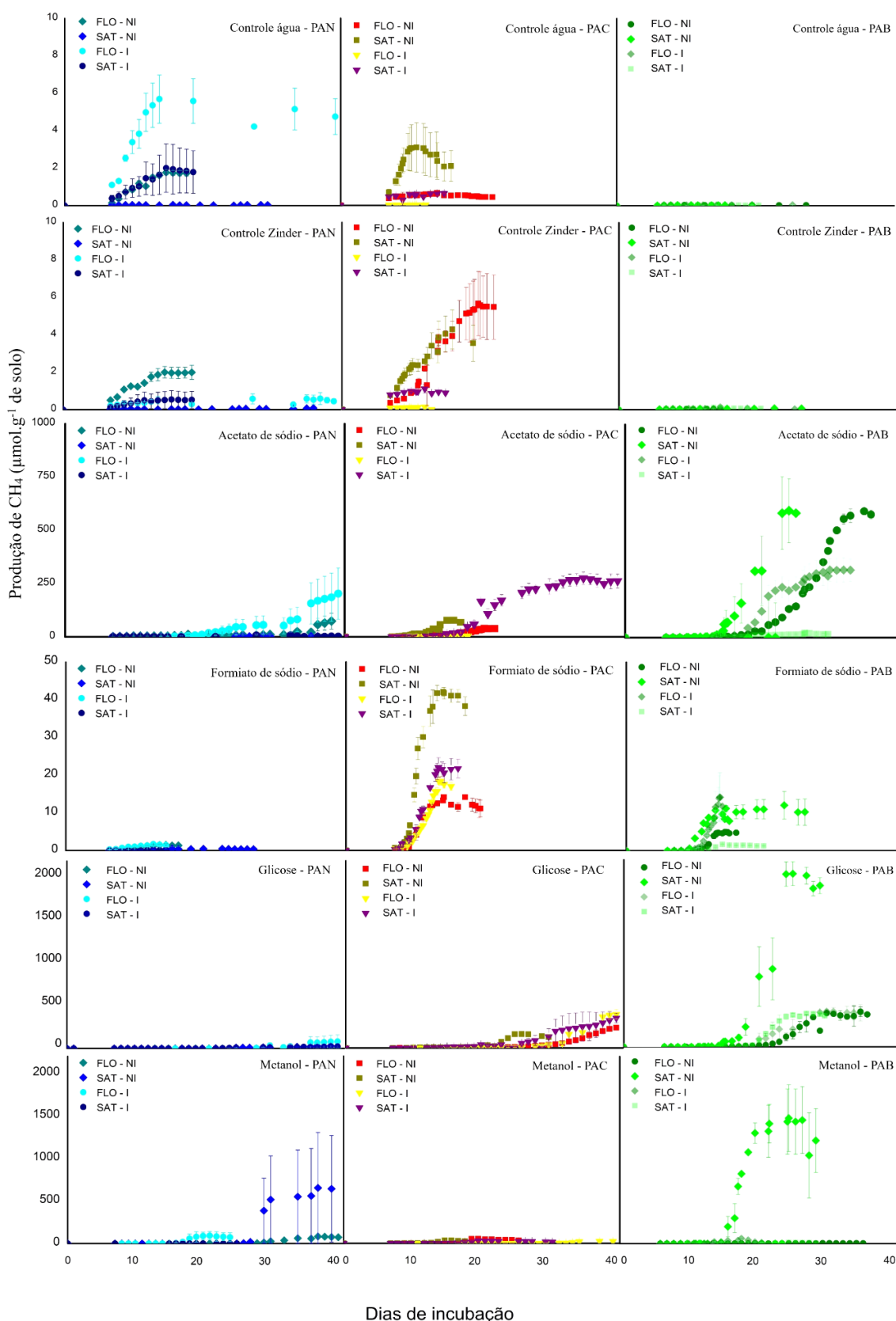
Observando as médias dos biorreatores contendo o co-substrato acetato de sódio, em planície aluvial de água negra, as maiores concentrações foram observadas no sítio florestal durante o período inundado ( $203,16 \pm 120,20 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo). Em solos de planície aluvial de águas claras, o sistema agrícola tradicional apresentou a maior produção de CH<sub>4</sub> ( $275,16 \pm 28,89 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo) durante o período inundado. Já em biorreatores contendo solo da planície aluvial de água branca, os sítios amostrais durante o período não inundado apresentaram média de produção similar (sítio florestal:  $593,19 \pm 5,06 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo, e sistema agrícola tradicional:  $595,38 \pm 149,69 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo).

Para os enriquecimentos que receberam formiato de sódio como co-substrato, as produções de CH<sub>4</sub> oscilaram entre  $0,11 \pm 0,009 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo e  $41,96 \pm 1,22 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo. A máxima produção e a estabilização da produção ocorreram entre 6-8 dias após o acréscimo do co-substrato na maioria dos biorreatores. As maiores produções de CH<sub>4</sub> foram observadas em solos da planície de água clara no sistema agrícola tradicional (sítio florestal:  $14,11 \pm 5,06 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo, e sistema agrícola tradicional:  $41,96 \pm 1,22 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo).

Avaliando os enriquecimentos que receberam a glicose como co-substrato, as produções de CH<sub>4</sub> apresentaram seus maiores valores mensurados em solos incubados oriundos da planície aluvial de água branca, no entanto os biorreatores contendo solo dos sítios florestais nos dois períodos amostrais e sistema agrícola tradicional de planície aluvial de água clara durante o período inundado não apresentaram estabilização da produção de CH<sub>4</sub> até o 40º dia de incubação. Os biorreatores contendo solo do sistema agrícola tradicional de água clara apresentaram a maior produção de CH<sub>4</sub> no 26º dia de incubação (19 dias após a adição do co-substrato), durante o período não inundado ( $162,36 \pm 0,01 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo). No 40º dia de incubação, os biorreatores contendo solo do sítio florestal apresentaram produção de CH<sub>4</sub> de  $237,21 \pm 21,69 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo durante o período não inundado e  $395,53 \pm 54,70 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo durante o período inundado. Já em solos do sistema agrícola tradicional a produção acumulada foi de  $350,77 \pm 54,70 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo no 40º dia.

Os biorreatores que receberam o metanol como co-substrato em solos da planície aluvial de água negra apresentou produção média de CH<sub>4</sub> similar em seu sítio florestal (não inundado:  $82,61 \pm 18,20 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo e inundado:  $92,37 \pm 50,17 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo). Os biorreatores contendo amostras de solo durante o período inundado atingiram a máxima produção no 21º dia de incubação, enquanto no período não inundado isso ocorreu no 37º dia de incubação. Nos biorreatores contendo solos da planície aluvial de água branca a maior produção média foi observada no sistema agrícola tradicional durante o período não inundado ( $1.474,72 \pm 391,86 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo). Os biorreatores contendo solos pertencentes à planície aluvial de água clara apresentaram comportamento mais homogêneo com produções em seu sítio florestal apresentando decréscimo com a inundação do solo da planície aluvial (período não inundado:  $51,90 \pm 30,33 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo, e período inundado:  $24,38 \pm 6,45 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo). No sistema agrícola tradicional a máxima produção passou de  $33,83 \pm 0,12 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo durante o período não inundado para  $30,38 \pm 13,83 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo durante o período inundado.

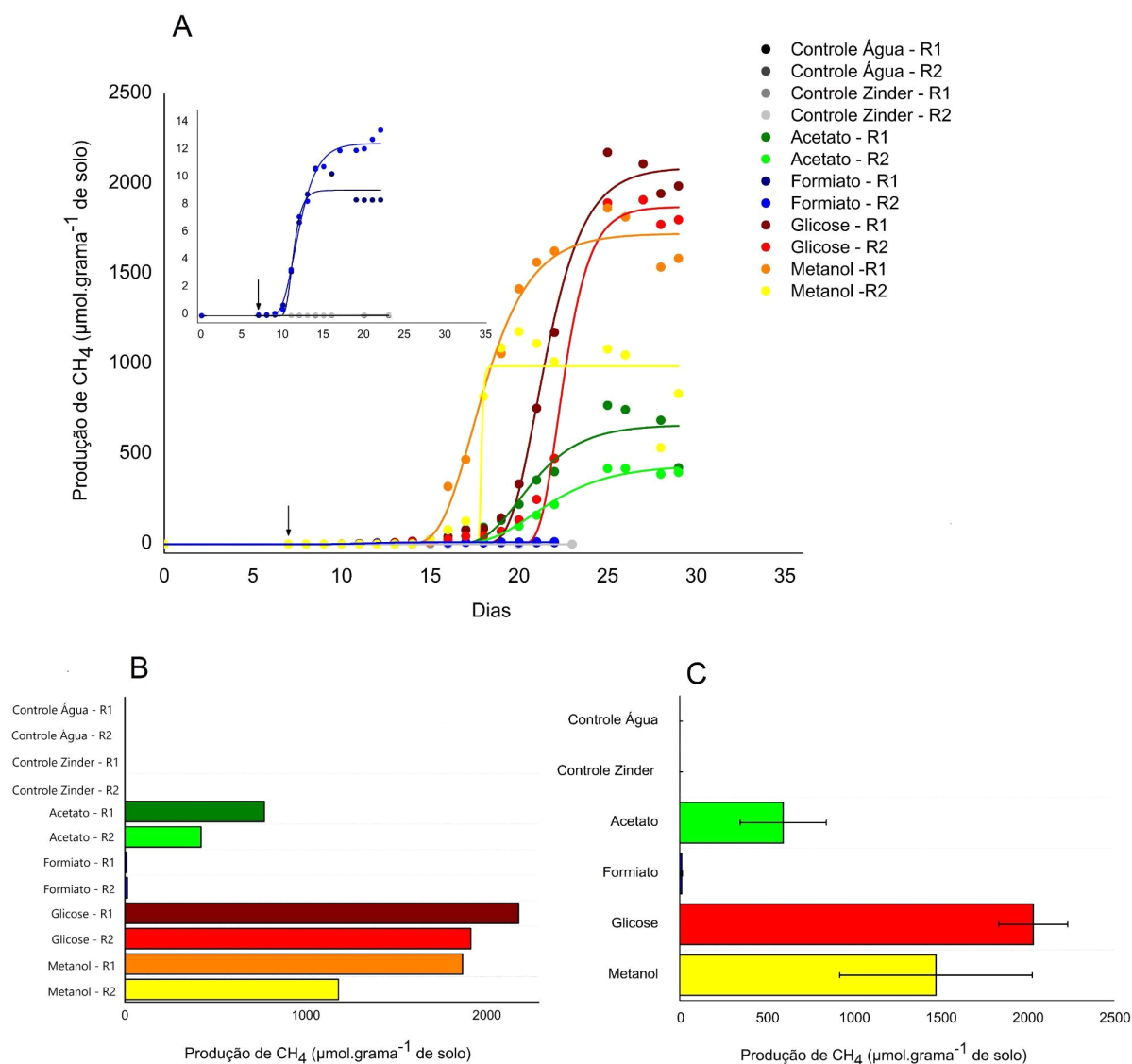




**Figura 2.** Produção de CH<sub>4</sub> (µmol.g<sup>-1</sup> de solo) em biorreatores contendo solos de planícies aluviais de rios de águas negra (PAN), clara (PAC) e branca (PAB) sob diferentes usos da terra (FLO - Florestal e SAT - Sistema Agrícola Tradicional) em dois períodos sazonais (NI - não inundado e I - inundado) com diferentes condições de incubação (controle água, controle Zinder, acetato de sódio, formiato de sódio, glicose, metanol). As barras representam o erro padrão da taxa média de produção obtida entre a duplicata de biorreatores metanogênicos

### 4.3.2 Maiores produções de CH<sub>4</sub> em biorreatores

Baseado nos resultados obtidos nas incubações apresentadas na Figura 2, a incubação com as produções mais significativas para os co-substratos acetato, glicose e metanol estavam contempladas na incubação de solo no período não inundado da planície aluvial de água branca no sistema agrícola tradicional, assim também foram inclusas as amostras do co-substrato formiato. Com a suposição de que a produção de CH<sub>4</sub> é uma função da atividade de micro-organismos em biorreatores, os parâmetros cinéticos foram adequados ao modelo de Gompertz modificado. Na Figura 3 a cinética da produção de CH<sub>4</sub>, além do ajuste por meio da equação de Gompertz modificado dos biorreatores do sistema agrícola tradicional de água branca pode ser visualizado. Na Tabela 2, os dados do cálculo da produção máxima (P) e início da produção CH<sub>4</sub> ( $\lambda$ ) com base nos valores obtidos por meio da equação de Gompertz modificado, além da maior produção mensurada são apresentados.

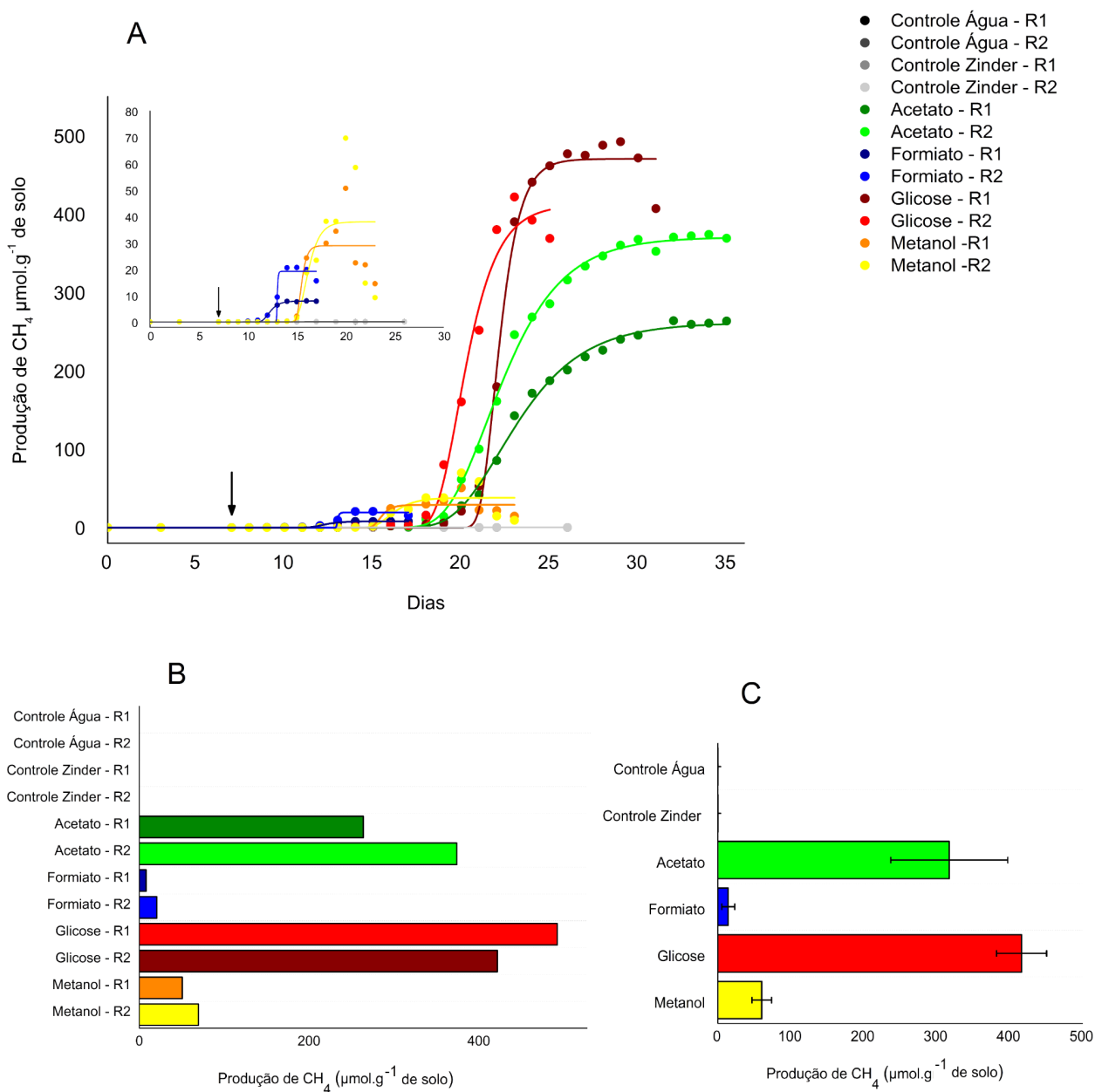


**Figura 3.** Os gráficos da representação A representam a curva de Gompertz para os ensaios metanogênicos contendo solo pertencente ao sistema agrícola tradicional à planície aluvial de água branca durante o período não inundado. Os controles: água (R1 e R2) e meio de cultura Zinder (R1 e R2) e co-substratos: acetato de sódio (R1 e R2), formiato de sódio (R1 e R2), glicose (R1 e R2) e metanol (R1 e R2) têm a sua produção de CH<sub>4</sub> apresentada na unidade (µmol. grama<sup>-1</sup> de solo). A seta representa o dia em que os co-substratos foram adicionados. A representação B mostra as produções máximas por reator metanogênico e a representação C revela as produções médias dos reatores acrescidos das barras contendo o erro padrão da taxa média de produção obtida entre a duplicata de biorreatores metanogênicos

**Tabela 2.** Produção máxima de CH<sub>4</sub> (μmol.g<sup>-1</sup> de solo), início da produção de de CH<sub>4</sub> e coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) baseado nos parâmetros obtidos com a curva de Gompertz e máxima produção de CH<sub>4</sub> (μmol.g<sup>-1</sup> de solo) medida em biorreatores com diferentes condições de incubação (controle água, controle Zinder, acetato de sódio, formiato de sódio, glicose, metanol) em solos do sistema agrícola tradicional de planície aluvial de água branca durante o período não inundado

Condição experimental	P (μmol. g <sup>-1</sup> de solo)	Máxima produção medida (μmol. g <sup>-1</sup> de solo)	λ (dias)	R <sup>2</sup>
Controle Água - R1	<0,20	<0,20	-	-
Controle Água - R2	<0,20	<0,20	-	-
Controle Zinder - R1	<0,20	<0,20	-	-
Controle Zinder - R2	<0,20	<0,20	-	-
Acetato - R1	662,97 ± 45,21	758,86	18,08 ± 0,61	0,92
Acetato - R2	438,67 ± 19,43	432,00	18,31 ± 0,31	0,98
Formiato - R1	11,57 ± 0,51	10,74	9,84 ± 0,50	0,94
Formiato - R2	12,55 ± 0,22	15,70	9,87 ± 0,18	0,99
Glicose - R1	2090,69 ± 43,19	2175,54	19,50 ± 0,18	0,99
Glicose - R2	1872,62 ± 42,12	1912,27	21,19 ± 0,18	0,99
Metanol - R1	1724,41 ± 37,73	1866,57	15,57 ± 0,22	0,98
Metanol - R2	987,70 ± 44,16	1082,86	17,75*	0,93

Para efeitos comparativos e em virtude da alta variabilidade entre os solos das três planícies, o solo de biorreatores de sítio florestal da planície aluvial de água branca, durante o período inundado foi escolhido. Na Figura 4 a cinética da produção de CH<sub>4</sub> além do ajuste por meio da equação de Gompertz modificado dos biorreatores do sítio florestal de água branca durante o período inundado pode ser visualizado. Na Tabela 3, os dados da máxima produção (P) e início da produção de CH<sub>4</sub> (λ) com base nos valores obtidos por meio da equação de Gompertz modificada são apresentados.



**Figura 4.** Os gráficos da representação A representam a curva de Gompertz para os ensaios metanogênicos contendo solo pertencente à planície aluvial de água branca durante o período inundado em seu sítio florestal. Os controles: água (R1 e R2) e meio de cultura Zinder (R1 e R2) e co-substratos: acetato de sódio (R1 e R2), formiato de sódio (R1 e R2), glicose (R1 e R2) e metanol (R1 e R2) têm a sua produção de CH<sub>4</sub> apresentada na unidade (µmol. g<sup>-1</sup> de solo). A seta representa o dia em que os co-substratos foram adicionados. A representação B mostra as produções máximas por reator metanogênico e a representação C revela as produções médias dos reatores acrescidos das barras contendo o erro padrão da taxa média de produção obtida entre as duplicatas

**Tabela 3.** Produção máxima de CH<sub>4</sub> (μmol. g<sup>-1</sup> de solo), início da produção de de CH<sub>4</sub> e coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) baseado nos parâmetros obtidos com a curva de Gompertz e máxima produção de CH<sub>4</sub> (μmol. g<sup>-1</sup> de solo) medida em biorreatores com diferentes condições de incubação (controle água, controle Zinder, acetato de sódio, formiato de sódio, glicose, metanol) em solos florestais de planície aluvial de água branca durante o período inundado

Condição experimental	P (μmol.g <sup>-1</sup> de solo)	Máxima produção medida (μmol. g <sup>-1</sup> de solo)	λ (dias)	R <sup>2</sup>
Controle Água - R1	<0,20	<0,20	-	-
Controle Água - R2	<0,20	<0,20	-	-
Controle Zinder - R1	<0,20	<0,20	-	-
Controle Zinder - R2	<0,20	<0,20	-	-
Acetato - R1	261,27 ± 3,25	263,91	19,56 ± 0,15	0,99
Acetato - R2	370,51 ± 3,09	374,01	19,04 ± 0,12	0,99
Formiato - R1	7,92 ± 0,12	7,96	10,85 ± 0,05	0,99
Formiato - R2	18,79 ± 0,98	20,64	11,38 ± 0,18	0,95
Glicose - R1	470,42 ± 7,38	492,36	21,07 ± 0,15	0,99
Glicose - R2	411,62 ± 17,04	421,92	18,57 ± 0,22	0,98
Metanol - R1	28,91 ± 3,00	50,65	14,98 ± 0,58	0,78
Metanol - R2	45,70 ± 7,11	69,70	15,08 ± 1,03	0,75

#### 4.3.3 Diversidade funcional das comunidades microbianas associadas a ciclagem de C

Para compreender se as condições de produção de CH<sub>4</sub> afetam a diversidade funcional da comunidade dos solos incubados sob diferentes co-substratos, o DNA genômico do solo incubado foi analisado ao final de cada incubação com a metodologia de microarranjo de DNA (Geochip versão 5S) (Tabela 4). Um total de 110 genes diretamente ligados ao ciclo do C mostraram uma hibridização significativa em pelo menos duas das nove amostras de DNA do solo. Todos os principais grupos genéticos funcionais associados ao ciclo do carbono incluídos no GeoChip foram detectados em todas as amostras.

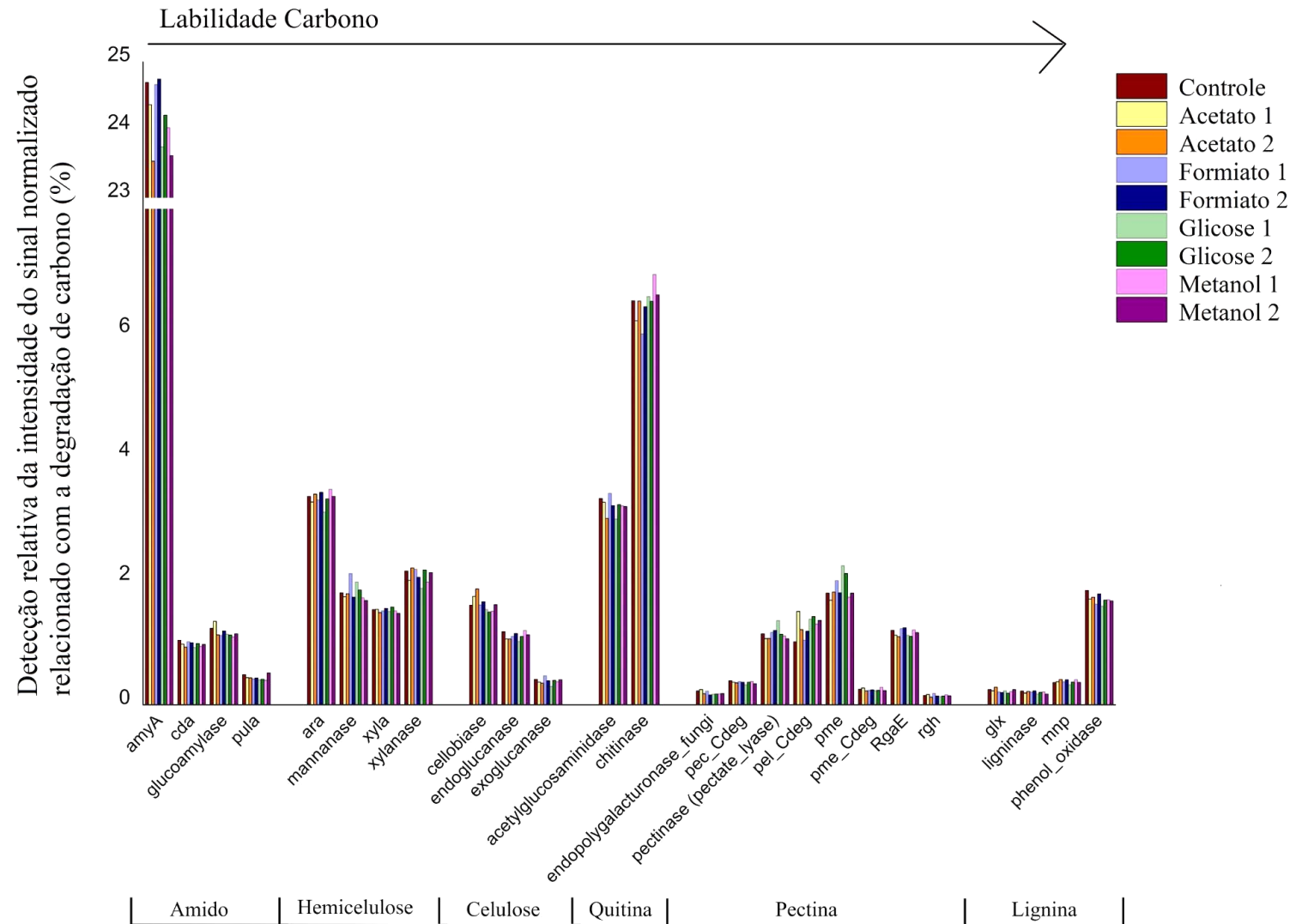
**Tabela 4.** Nomenclatura, descrição das amostras e média da produção máxima de CH<sub>4</sub> mensurada nos biorreatores escolhidos para a metodologia de microarranjo de DNA (Geochip v.5S)

Nomenclatura	Descrição da amostra	Média da produção máxima medida entre os biorreatores ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ de solo)
Controle	Biorreatores “controle água”: R1 e R2 do sistema agrícola tradicional, período não inundado + R1 e R2 do sítio florestal, período inundado	<0,20
Acetato 1	Biorreatores “acetato”: R1 e R2 do sítio florestal, período inundado	318,96
Acetato 2	Biorreatores “acetato”: R1 e R2 do sistema agrícola tradicional, período não inundado	595,38
Formiato 1	Biorreatores “formiato”: R1 e R2 do sítio florestal, período inundado	14,30
Formiato 2	Biorreatores “formiato”: R1 e R2 do sistema agrícola tradicional, período não inundado	13,22
Glicose 1	Biorreatores “glicose”: R1 e R2 do sítio florestal, período inundado	457,14
Glicose 2	Biorreatores “glicose”: R1 e R2 do sistema agrícola tradicional, período não inundado	2043,86
Metanol 1	Biorreatores “metanol”: R1 e R2 do sítio florestal, período inundado	60,17
Metanol 2	Biorreatores “metanol” : R1 e R2 do sistema agrícola tradicional, período não inundado	1474,72

#### 4.3.3.1 Degradação de C

O potencial metabólico funcional das famílias/enzimas dos genes de degradação de C foram classificadas de C lábil para C recalcitrante (Figura 7). A degradação de amido (*amyA*), quitina (*chitinase*), hemicelulose (*Ara* - Arabinofuranosidase), lignina (*phenol\_oxidase*), celulose (*cellobiose*) e pectina (*pme* - pectin methylesterase) foram os genes com maiores hibridizações para as respectivas famílias gênicas.

Em relação às famílias/enzimas dos genes relacionados ao ciclo do carbono, o gene *amyA* responde com a maior porcentagem de hibridizações em todas as nove amostras (23,54-24,74%) apresentando seu maior número de hibridizações nos solos incubados que apresentaram as menores produções de CH<sub>4</sub> (controle e formiato 1 e 2). O gene mais abundante na degradação de quitina apresentou as maiores porcentagens de hibridizações nos biorreatores metanogênicos contendo metanol como co-substrato (6,61 e 6,94%).



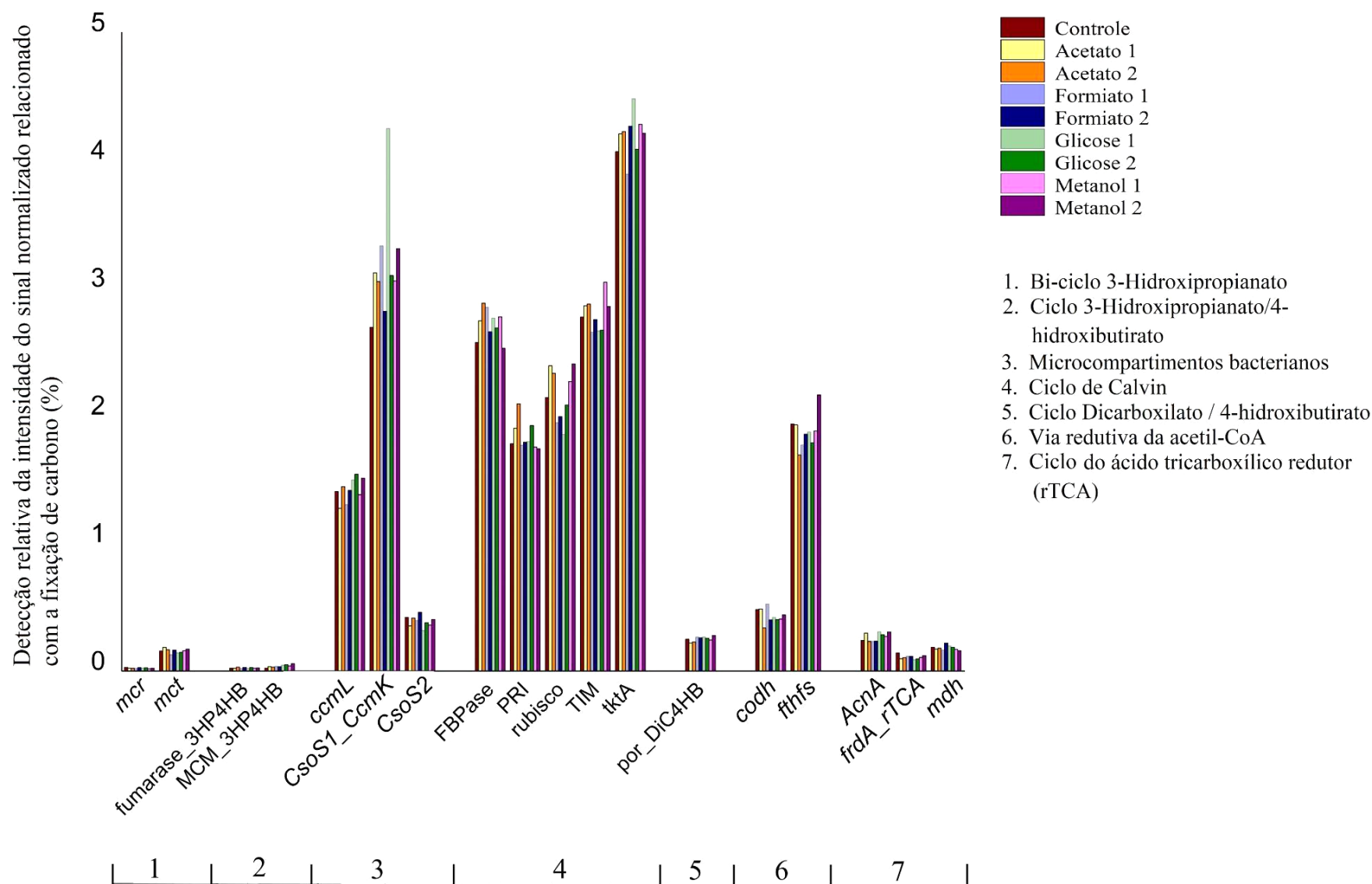
**Figura 7.** Detecção relativa da intensidade do sinal normalizado por Geochip de genes relacionado com a degradação de carbono (%) classificadas de C lábil para C recalcitrante presentes em amostras de solo incubadas em biorreatores anaeróbios denominados como controle e co-substratos acetato de sódio, formiato de sódio, glicose e metanol em diferentes condições de produção de CH<sub>4</sub>



#### 4.3.3.2 Fixação de C

A fixação do C foi a segunda categoria mais importante no ciclo do carbono em todas as amostras (Figura 8). As vias de fixação de C no solo incubados incluíram principalmente o bi-ciclo 3-hidroxiopionato, via do microcompartimento bacteriano, ciclo de Calvin, ciclo de dicarboxilato/4-hidroxiбутирато, via reductiva do acetil-CoA, e o ciclo do ácido tricarboxílico reductor (rTCA).

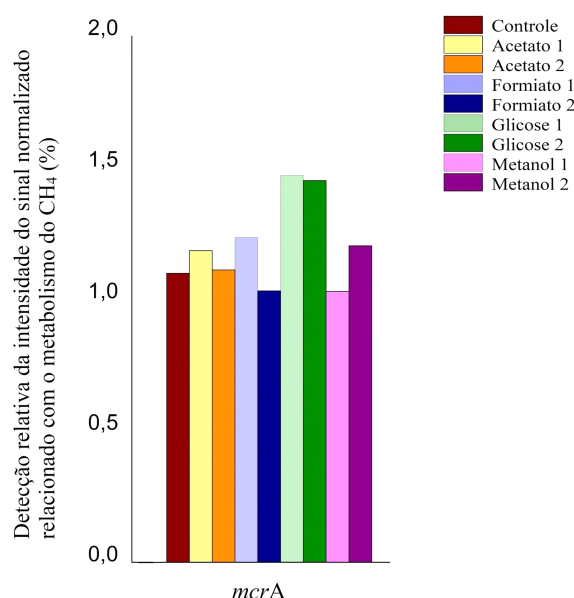
As principais enzimas nas vias de fixação autotrófica de carbono usadas para indicar autotrofia incluem a *TktA* (Transketolase) no ciclo de Calvin, oscilando entre 3,89 e 4,48%, a *CsoSI\_CcmK* (Microcompartments protein) na via do macrocompartimento bacteriano apresentou porcentagens de hibridizações entre 2,69 e 4,24%, o *FTHFS* (Formyltetrahydrofolate synthetase) na via reductiva do acetil-CoA com hibridizações 1,69 a 2,16%, *Por\_DiC4HB* (Pyruvate synthase) no ciclo de dicarboxilato/4-hidroxiбутирато, *AcnA* (Aconitate hydratase 2) no ciclo do ácido tricarboxílico reductor, 0,23 e 0,31%, o gene *mct* (L-carnitine dehydratase/bile acid-inducible protein F) no bi-ciclo de 3-hidroxiopionato, 0,13 a 0,18% e o *MCM\_3HP4HB* (Methylmalonyl-CoA mutase) no ciclo 4-hidroxiбутирато/3-hidroxiopionato, de 0,02 a 0,06%.



**Figura 8.** Detecção relativa da intensidade do sinal normalizado por Geochip de genes relacionado com a fixação de carbono (%) presentes em amostras de solo incubadas em biorreatores anaeróbios denominados como controle e co-substratos acetato de sódio, formiato de sódio, glicose e metanol em diferentes condições de produção de  $\text{CH}_4$

#### 4.3.3.3 Metabolismo do CH<sub>4</sub>

Das 315 sondas contempladas pelo arranjo Geochip ligados ao *mcrA* (methyl coenzyme-M reductase) 65 foram detectados nas amostras de solo incubadas em biorreatores. Das sondas detectadas, 56 foram derivadas de organismos não cultivados, com exceção de: *Methanocorpusculum labreanum* Z (Gene ID 124363917), *Methanoculleus marisnigri* JR1 (Gene ID 126178328), *Methanofollis ethanolicus* (Gene ID 380692198), *Candidatus Methanoregula boonei* 6A8 (Gene ID 153998677), *Methanosaeta harundinacea* (Gene ID 61743606), *Methanosaeta harundinacea* 6Ac (Gene ID 386001204), *Methanohalobium evestigatum* Z-7303 (Gene ID 298674844), *Methanolobus profundi* (Gene ID 380692170) e *Methanosarcina barkeri* str. *fusaro* (Gene ID 72395594).

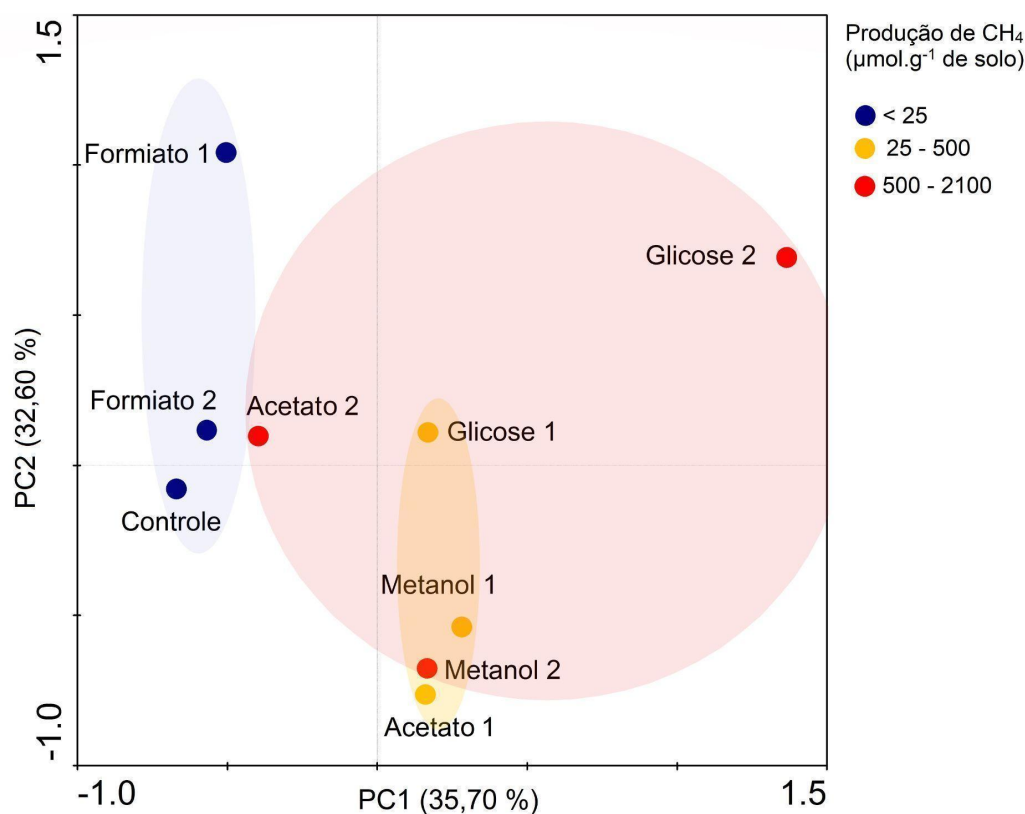


**Figura 9.** Deteção relativa da intensidade do sinal normalizado por Geochip de genes relacionado com o metabolismo de CH<sub>4</sub> (%) presentes em amostras de solo incubadas em biorreatores anaeróbios denominados como controle e co-substratos acetato de sódio, formiato de sódio, glicose e metanol em diferentes condições de produção de CH<sub>4</sub>

#### 4.3.3.4 Respostas dos genes funcionais ligados ao C

A análise de componentes principais (ACP) foi conduzida para examinar se a estrutura da comunidade microbiana mudou significativamente em diferentes taxas de produção de CH<sub>4</sub>. Conforme mostrado na Figura 10 os biorreatores com menores produções de CH<sub>4</sub> (< 25

$\mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo) e produções medianas de  $\text{CH}_4$  (25 a  $500 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo) agruparam-se. Especificamente, os biorreatores com as maiores produções de  $\text{CH}_4$  (500 a  $2100 \mu\text{mol.g}^{-1}$  de solo) apresentaram comportamento completamente distintos.



**Figura 10.** Eixos 1 e 2 da análise de componentes principais explicam 35,70 e 32,60%, respectivamente, da variação dos principais genes funcionais ligados a fixação, degradação de C e metanogênese detectadas por microarranjo de DNA (Geochip).

#### 4.4 Discussão

A inundação e dessecação são eventos-chave para processos metanogênicos [15] em áreas úmidas, especialmente em áreas que sofrem inundações sazonais, como as planícies aluviais de rios amazônicos. Os solos de planícies aluviais amazônicas dos rios Negro, Tocantins e Solimões, utilizado para a cultura de enriquecimento revelaram potenciais claros de produção de  $\text{CH}_4$  com/sem quaisquer adições de co-substratos como precursores.

##### *Desempenho dos biorreatores*

Aqui fornecemos evidências de que solos das planícies aluviais amazônicas de águas

negra, clara e branca possuem potencial para a atividade metanogênica estimulada por acetato, formiato, glicose e metanol, com padrões de comportamento diferentes. Sete dias após a inoculação do solo, os biorreatores vinculados às planícies de água negra e clara sem a adição de co-substratos foram capazes de produzir CH<sub>4</sub>. O desempenho dos biorreatores contendo solo oriundos da planície aluvial de água branca foi baixo (<0,2 μmol.g<sup>-1</sup> de solo) ou nulo naqueles biorreatores denominados controle água e controle Zinder. Ji *et al.* [12] e [11] ao avaliarem as taxas de produção de CH<sub>4</sub> em sedimentos amazônicos de áreas inundáveis com águas negras, claras e brancas incubados sem acréscimo de co-substratos, observaram que as taxas de produção foram de uma a duas ordens de magnitude menores em sedimentos áreas inundáveis de água branca quando comparados ao sedimento sob a influência de outros tipos de águas. Os solos de planície aluvial de água branca apresentaram comportamento único devido às suas baixas taxas de produção de CH<sub>4</sub> naqueles biorreatores controle e elevadas produções ao terem os co-substratos adicionados. Esta característica funcional pode ser melhor explicada pelas menores concentrações de carbono observadas em solos de águas brancas (Tabela 1 - *Capítulo 2*) aliada a altas concentrações de ferro e manganês (como indicadores para disponibilidade de aceptores de elétrons - dados não apresentados aqui). É possível que a falta de substratos lábeis por si só favorece outros micro-organismos e não a ação das arqueas metanogênicas, enquanto o aumento da disponibilidade de C permite elevadas produções.

*Arqueas* metanogênicas operam na ausência de oxigênio, no entanto, podem sobreviver em solos aerados e dissecados [36]. Sendo provável e principalmente devido a plasticidade, que o potencial de funcionamento metanogênico foi restabelecido prontamente assim que as condições de anaerobiose foram estabelecidas durante a incubação. *In situ*, tais condições geralmente ocorrem algum tempo após a inundação, o período de atraso depende da disponibilidade relativa de matéria orgânica degradável e aceptores de elétrons inorgânicos e orgânicos [37].

#### *Microarranjo de DNA (Geochip v. 5.0S)*

As condições de anaerobiose aliado ao acréscimo de substratos metanogênicos específicos revelaram abundâncias relativas por biorreator (ou seja, as abundâncias de genes funcionais com base na intensidade de Geochip ligado ao ciclo do carbono) de uma maioria dos genes funcionais associados à degradação e fixação de carbono e metabolismo do CH<sub>4</sub>.

Esses genes incluíram genes para amido (*amyA*), quitina (*chitinase*) e hemicelulose (*Ara* - Arabinofuranosidase). Comparando tais genes sob a ótica da produção de CH<sub>4</sub> nos biorreatores, aqueles que continham acetato e metanol como co-substratos apresentaram uma redução de hibridizações ligadas ao gene *amyA* quando comparado aos biorreatores controle. A abundância de genes funcionais microbianos do solo a partir do DNA pode refletir o potencial metabólico da comunidade microbiana, mas não necessariamente a comunidade microbiana real funcionando *in situ* [38]. Yang *et al.* [39] ao avaliarem por Geochip, solos provenientes de microcosmos anóxicos construídos na tentativa de mimetizar *permafrost* com duas temperaturas de incubação (-2°C e 8°C) foram escolhidas para simular uma condição de quase congelamento e o mês mais quente em solo ártico observaram uma diminuição da abundância total relativa dos genes *amyA*, *chitinase* e *ara* ao final de 122 dias do solo incubado a 8°C.

Sete vias de fixação de CO<sub>2</sub>, incluindo o ciclo de Calvin e vias alternativas foram detectadas nas amostras provenientes de biorreatores. Entre as principais famílias funcionais de genes ou enzimas de fixação de C encontradas neste estudo, o *tktA* (Transketolase) no ciclo de Calvin apresentou as maiores hibridizações. Este gene é responsável pela produção de NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), bem como vários outros fosfatos intermediários de açúcar [40]. NADPH é um passo crítico na produção e regeneração de carboidratos bifosfatos de ribulose (*RuBP*) no ciclo de Calvin. O ciclo de Calvin consiste em 3 etapas principais- carboxilação, redução e regeneração [41] - na qual os genes que reuniam altas intensidades sob a categoria de ciclo Calvin e estavam envolvidos nas três etapas do ciclo de fixação do C. A presença de genes para carboxilação (*rubisco*), redução (*FBPase*, *TIM*) e regeneração (*RPI*, *prk*), também foi observada.

Os microcompartimentos bacterianos (BMCs) têm papel crucial na fixação de CO<sub>2</sub> em autótrofos e no catabolismo de substratos orgânicos em heterótrofos, contribuindo para a versatilidade metabólica de bactérias, proporcionando uma vantagem competitiva em nichos ambientais específicos [42]. Com relação aos processos de fixação de C nos biorreatores, o gene *CsoSI\_CcmK* apresentou a maior porcentagem de hibridizações em biorreatores onde houve o acréscimo de co-substratos.

A fixação de C direcionada pela abordagem de microarranjo de DNA Geochip revelou hibridizações do gene que codifica para formyltetrahydrofolate synthetase (*FTHFS*), uma enzima chave para via redutiva de acetil-coA/via Wood-Ljungdahl (WLP). Sendo um gene altamente conservado e pode ser usado como um marcador molecular para inferir sobre as

comunidades acetogênicas [43]. As bactérias acetogênicas são um grupo de bactérias anaeróbias obrigatórias que utilizam a via redutiva de acetil-coA para sintetizar acetato a partir de precursores C1 [44]. O potencial para fixação de C vinculado à via supracitada foi suportado em maior frequência pelos reatores que apresentaram maior produção de CH<sub>4</sub> contendo como co-substrato metanol.

Para os genes relacionados ao metabolismo de CH<sub>4</sub>, a abundância de hibridizações relacionada à metanogênese, teve seus maiores valores em biorreatores contendo como co-substrato a glicose. Teoricamente, a degradação completa da glicose deve favorecer os processos de fermentação a álcoois e ácidos graxos, seguido da degradação sintrófica de álcoois e ácidos graxos em acetato e H<sub>2</sub> [45]. Já o metanol, em solos pantanosos pode ser produzido a partir da decomposição da pectina derivada de plantas [46]. Assim, a degradação da glicose pode gerar os precursores para as três vias metanogênicas. Observamos a hibridização ligada a sonda *mcrA* vinculada a *Methanosarcina barkeri str; fusaro* (Gene ID 72395594) exclusivamente em biorreatores contendo glicose. *Methanosarcina barkeri* é conhecida por apresentar afinidade com vários substratos, incluindo metanol, acetato, metilaminas e uma combinação de hidrogênio e dióxido de carbono para produção de CH<sub>4</sub> [47].

#### 4.5 Conclusões

Em conclusão, este trabalho reporta que os solos de sítios florestais e sistemas agrícolas tradicionais em planícies aluviais amazônicas sazonalmente inundadas suportam a metanogênese através das vias acetoclástica, hidrogenotrófica e metilotrófica, utilizando o acetato de sódio, formiato de sódio e metanol, como co-substratos metanogênicos, respectivamente. Tornando assim, a nossa primeira hipótese aceita. De forma global, nossa segunda hipótese é refutada. As maiores produções de CH<sub>4</sub> em condições laboratoriais não estão sistematicamente vinculadas às maiores porcentagens de hibridizações para metanogênese, fixação de degradação de C avaliadas através da tecnologia GeoChip v. 5.0S.

## Referências

- [1] DUŠEK, J.; NGUYEN, V. X.; LE, T. X.; PAVELKA, M. Methane and carbon dioxide emissions from different ecosystems at the end of dry period in South Vietnam. **Tropical Ecology**, v. 62, n. 1, p. 1–16, 2021.
- [2] CHEEMA, S.; ZEYER, J.; HENNEBERGER, R. Methanotrophic and methanogenic communities in swiss alpine fens dominated by *Carex rostrata* and *Eriophorum angustifolium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 17, p. 5832–5844, 2015.
- [3] BRIDGHAM, S. D.; CADILLO-QUIROZ, H.; KELLER, J. K.; ZHUANG, Q. Methane emissions from wetlands: Biogeochemical, microbial, and modeling perspectives from local to global scales. **Global Change Biology**, v. 19, n. 5, p. 1325–1346, 2013.
- [4] CAI, W.; LENGAIGNE, M.; BORLACE, S.; *et al.* More extreme swings of the South Pacific convergence zone due to greenhouse warming. **Nature**, v. 488, n. 7411, p. 365–369, 2012.
- [5] LIU, Q.; TAN, Z. M.; SUN, J.; HOU, Y.; FU, C.; WU, Z. (2020). Changing rapid weather variability increases influenza epidemic risk in a warming climate. **Environmental Research Letters**, v. 15, n. 4, 2020.
- [6] COVEY, K.; SOPER, F.; PANGALA, S.; *et al.* Carbon and Beyond: The Biogeochemistry of Climate in a Rapidly Changing Amazon. **Frontiers in Forests and Global Change**, v. 4, n. March, 2021.
- [7] HESS, L. L.; MELACK, J. M.; AFFONSO, A. G.; *et al.* Wetlands of the Lowland Amazon Basin: Extent, Vegetative Cover, and Dual-season Inundated Area as Mapped with JERS-1 Synthetic Aperture Radar. **Wetlands**, v. 35, n. 4, p. 745–756, 2015.
- [8] BOGOTÁ-GREGORY, J. D.; LIMA, F. C. T.; CORREA, S. B.; *et al.* Biogeochemical water type influences community composition, species richness, and biomass in megadiverse Amazonian fish assemblages. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2020.
- [9] SAWAKUCHI, H. O.; BASTVIKEN, D.; SAWAKUCHI, A. O.; *et al.* Methane emissions from Amazonian Rivers and their contribution to the global methane budget. **Global Change Biology**, v. 20, n. 9, p. 2829–2840, 2014.
- [10] SAWAKUCHI, H. O.; BASTVIKEN, D.; SAWAKUCHI, A. O.; *et al.* Oxidative mitigation of aquatic methane emissions in large Amazonian rivers. **Global Change Biology**, v. 22, n. 3, p. 1075–1085, 2016.
- [11] CONRAD, R.; JI, Y.; NOLL, M.; *et al.* Response of the methanogenic microbial communities in Amazonian oxbow lake sediments to desiccation stress. **Environmental microbiology**, v. 16, n. 6, p. 1682–1694, 2014.
- [12] JI, Y.; KLOSE, M.; CLAUS, P.; *et al.* Environmental factors determine the structure and function of methanogenic microbial communities in Amazonian lake sediments Supplementary Tables and Figures. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 12, p.



5082–5100, 2016.

[13] HUNGER, S.; SCHMIDT, O.; HILGARTH, M.; et al. Competing formate- and carbon dioxide-utilizing prokaryotes in an anoxic methane-emitting fen soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 11, p. 3773–3785, 2011.

[14] ZINDER, S. H. 1993. **Physiological ecology of methanogens**, p. 128–206. In J. G. Ferry (ed.), *Methanogenesis: ecology, physiology, biochemistry and genetics*. Chapman and Hall Inc., New York, NY.

[15] CONRAD, R. Importance of hydrogenotrophic, acetoclastic and methylotrophic methanogenesis for methane production in terrestrial, aquatic and other anoxic environments: A mini review. **Pedosphere**, v. 30, n. 1, p. 25–39, 2020.

[16] EVANS, P. N.; BOYD, J. A.; LEU, A. O.; et al. An evolving view of methane metabolism in the Archaea. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 219–232, 2019.

[17] LYU, Z.; SHAO, N.; AKINYEMI, T.; WHITMAN, W. B. Methanogenesis. **Current Biology**, v. 28, n. 13, p. R727–R732, 2018.

[18] LACKNER, N.; HINTERSONNLEITNER, A.; WAGNER, A. O.; ILLMER, P. Hydrogenotrophic methanogenesis and autotrophic growth of *methanosarcina thermophila*. **Archaea**, v. 2018, Article ID 4712608, p. 1-7, 2018.

[19] ZHANG, M.; LI, Y.; SUN, Q.; CHEN, P.; WEI, X. Correlations of functional genes involved in methane, nitrogen and sulfur cycling in river sediments. **Ecological Indicators**, v. 115, n. April, p. 106411, 2020.

[20] LIU, Y.; WHITMAN, W. B. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, p. 171–189, 2008.

[21] KURTH, J. M.; OP DEN CAMP, H. J. M.; WELTE, C. U. Several ways one goal—methanogenesis from unconventional substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 16, p. 6839–6854, 2020.

[22] BENTO, M. S.; BARROS D. J.; ARAÚJO, M. G. S.; RÓZ, R. CARVALHO; CARMO, J.B., et al. Active methane processing microbes and the disproportionate role of NC10 phylum in methane mitigation in Amazonian floodplains. **Biogeochemistry**, v. 155, n. 3, p. 1-25, 2021.

[23] ZALMAN, C. A.; MEADE, N.; CHANTON, J.; et al. Methylotrophic methanogenesis in Sphagnum-dominated peatland soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 118, n. July 2017, p. 156–160, 2018.

[24] NARROWE, A. B.; ANGLE, J. C.; DALY, R. A.; et al. High-resolution sequencing reveals unexplored archaeal diversity in freshwater wetland soils. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 6, p. 2192–2209, 2017.

[25] NARROWE, A. B.; BORTON, M. A.; HOYT, D. W.; et al. Uncovering the Diversity and

Activity of Methylophilic Methanogens in Freshwater Wetland Soils. **mSystems**, v. 4, n. 6, p. 1–15, 2019.

[26] ZHU, Y.; PURDY, K. J.; EYICE, Ö.; *et al.* Disproportionate increase in freshwater methane emissions induced by experimental warming. **Nature Climate Change**, v. 10, n. 7, p. 685–690, 2020.

[27] ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; DE MORAES GONÇALVES, J. L.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711–728, 2013.

[28] ZINDER, S. H.; KOCH, M. Non-aceticlastic methanogenesis from acetate. **Archives of Microbiology**, p. 263–272, 1984.

[29] GABRIEL, G. V. M.; OLIVEIRA, L. C.; BARROS, D. J.; BENTO, M. S.; NEU, V.; TOPPA, R. H.; *et al.* Methane emission suppression in flooded soil from Amazonia. **Chemosphere**, v. 250, 2020.

[30] LACKNER, N.; HINTERSONNLEITNER, A.; WAGNER, A. O.; ILLMER, P. Hydrogenotrophic methanogenesis and autotrophic growth of methanosarcina thermophila. **Archaea**, v. 2018, 2018.

[31] CHEN, J.; LIU, Y. F.; ZHOU, L.; *et al.* Long-chain n-alkane biodegradation coupling to methane production in an enriched culture from production water of a high-temperature oil reservoir. **AMB Express**, v. 10, n. 1, 2020.

[32] XU, Z.; YU, G.; ZHANG, X.; *et al.* Plant functional traits determined the latitudinal variations in soil microbial functions: evidence from a forest transect in China. **Biogeosciences Discussions**, p. 1–29, 2019.

[33] MOTTERAN, F.; OKADA, D. Y.; DELFORNO, T. P.; VARESCHE, M. B. A. Influence of cosubstrates for linear anionic sulfonated alkylbenzene degradation and methane production in anaerobic batch reactors. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 139, p. 60–68, 2020.

[34] SHI, Z.; YIN, H.; VAN NOSTRAND, J. D.; *et al.* Functional Gene Array-Based Ultrasensitive and Quantitative Detection of Microbial Populations in Complex Communities. **mSystems**, v. 4, n. 4, p. 1–16, 2019.

[35] NAVARRETE, A. A.; MELLIS, E. V.; ESCALAS, A.; *et al.* Zinc concentration affects the functional groups of microbial communities in sugarcane-cultivated soil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 236, p. 187–197, 2017.

[36] FETZER, S.; BAK, F.; CONRAD, R. Sensitivity of methanogenic bacteria from paddy soil to oxygen and desiccation. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 12, n. 2, p. 107–115, 1993.

[37] YAO, H.; CONRAD, R.; WASSMANN, R.; NEUE, H. U. Effect of soil characteristics on sequential reduction and methane production in sixteen rice paddy soils from China, the

Philippines, and Italy. **Biogeochemistry**, v. 47, n. 3, p. 269–295, 1999.

[38] YU, L.; LUO, S.; XU, X.; GOU, Y.; WANG, J. The soil carbon cycle determined by GeoChip 5.0 in sugarcane and soybean intercropping systems with reduced nitrogen input in South China. **Applied Soil Ecology**, v. 155, n. November 2019, p. 103653, 2020.

[39] YANG, Z.; YANG, S.; VAN NOSTRAND, J. D.; et al. Microbial community and functional gene changes in Arctic tundra soils in a microcosm warming experiment. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. SEP, p. 1–11, 2017.

[40] IIDA, A.; TESHIBA, S.; MIZOBUCHI, K. Identification and characterization of the tktB gene encoding a second transketolase in Escherichia coli K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 17, p. 5375–5383, 1993.

[41] ABEBE, T.; WISE, R. P.; SKADSEN, R. W. Comparative Transcriptional Profiling Established the Awn as the Major Photosynthetic Organ of the Barley Spike While the Lemma and the Palea Primarily Protect the Seed. **The Plant Genome**, v. 2, n. 3, 2009.

[42] KERFELD, C. A.; AUSSIGNARGUES, C.; ZARZYCKI, J.; CAI, F.; SUTTER, M. Bacterial microcompartments. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 277–290, 2018.

[43] SINGH, A.; MÜLLER, B.; FUXELIUS, H. H.; SCHNÜRER, A. AcetoBase: a functional gene repository and database for formyltetrahydrofolate synthetase sequences. **Database : the journal of biological databases and curation**, v. 2019, p. 1–14, 2019.

[44] LEAPHART, A. B.; LOVELL, C. R. Recovery and Analysis of Formyltetrahydrofolate Synthetase Gene Sequences from Natural Populations of Acetogenic Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 1392–1395, 2001.

[45] CONRAD, R. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 28, n. 3, p. 193–202, 1999.

[46] SCHINK, B.; ZEIKUS, J. G. Microbial methanol formation: A major end product of pectin metabolism. **Current Microbiology**, v. 4, n. 6, p. 387–389, 1980.

[47] GONNERMAN, M. C.; BENEDICT, M. N.; FEIST, A. M.; METCALF, W. W.; PRICE, N. D. Genomically and biochemically accurate metabolic reconstruction of Methanosarcina barkeri Fusaro, iMG746. **Biotechnology Journal**, v. 8, n. 9, p. 1070–1079, 2013.

## 5 Capítulo 4 - EMISSÕES DE CH<sub>4</sub> EM PLANÍCIES ALUVIAIS NA BACIA AMAZÔNICA: MODELO BASEADO EM PROCESSO MICROBIANO<sup>3</sup>

### RESUMO

Planícies aluviais amazônicas são fontes naturais de CH<sub>4</sub> globalmente significativas. As emissões líquidas de CH<sub>4</sub> representam o equilíbrio entre a produção microbiana (metanogênese) e a sua oxidação (metanotrofia), cada uma com diferente sensibilidade ao pulso de inundação em planícies aluviais amazônicas. Apesar da importância dos processos microbianos do solo para o fluxo de CH<sub>4</sub> ainda não existem modelos matemáticos que contemplem tais informações. Aqui, investigamos as relações entre variáveis ambientais, aspectos ecológicos das comunidades microbianas metanogênica e metanotrófica e o fluxo de CH<sub>4</sub> em planícies aluviais amazônicas de rios de águas negra (Rio Negro), clara (Rio Tocantins) e branca (Rio Solimões). Um conjunto de metadados composto por fatores físicos e químicos do solo, dados quantitativos de abundância de grupos taxonômicos metanogênicos e metanotróficos das áreas inundáveis com os diferentes tipos de água e métricas da paisagem foi utilizado para a definição de um modelo matemático para a emissão de CH<sub>4</sub> em áreas inundáveis da Amazônia. Quatro modelos de regressão múltipla para a predição do fluxo de CH<sub>4</sub> nas diferentes planícies aluviais foram definidos, sendo um modelo global e os demais individuais. Os modelos revelam que os melhores preditores de emissão de CH<sub>4</sub> diferem por planície aluvial. O modelo com melhor ajuste dos dados foi o da planície aluvial de rio de água clara ( $R^2 = 0,94$ ), sendo composto por variáveis vinculadas às comunidades metanogênicas (sequências gene 16S rRNA e Shannon) e a temperatura do solo. Assim, determinar os principais impulsionadores do fluxo de CH<sub>4</sub> em planícies aluviais amazônicas fornecerá abordagens de escala mais precisa, bem como subsídios para a inserção de comunidades metanogênicas e metanotróficas nesses modelos.

Palavras-chaves: Modelagem matemática; fluxo de CH<sub>4</sub>; comunidade metanogênica; comunidade metanotrófica.

---

<sup>3</sup> Artigo não submetido

## 1 Introdução

O  $\text{CH}_4$  é reconhecido como um dos principais contribuintes para o efeito estufa, com sua concentração atmosférica aumentando constantemente [1, 2]. As áreas úmidas são a maior fonte natural global de  $\text{CH}_4$  atmosférico [3] emitindo cerca de 177–284 Tg de  $\text{CH}_4$  para a troposfera a cada ano [4]. À luz da forte contribuição dos ecossistemas úmidos como importantes emissores naturais de  $\text{CH}_4$ , é determinante desvendar os fatores desencadeadores e ainda não completamente compreendidos dos processos nesses ambientes.

Os inventários de emissão de  $\text{CH}_4$  das planícies de inundação da região amazônica, maior fonte geográfica de emissão de  $\text{CH}_4$  nos trópicos apontam para uma grande lacuna em nossa compreensão da contribuição desses ecossistemas para emissões de  $\text{CH}_4$  [5]. Embora as taxas de emissão de  $\text{CH}_4$  sejam conhecidas por serem controladas por uma ampla gama de fatores [6], incluindo alterações do nível de água e decomposição da camada de serrapilheira em solos e sedimentos, para citar alguns, a incorporação de drivers em abordagens para modelagem e predição de emissões de  $\text{CH}_4$  em planícies aluviais amazônicas ainda é limitada pela falta de dados a respeito desses fatores.

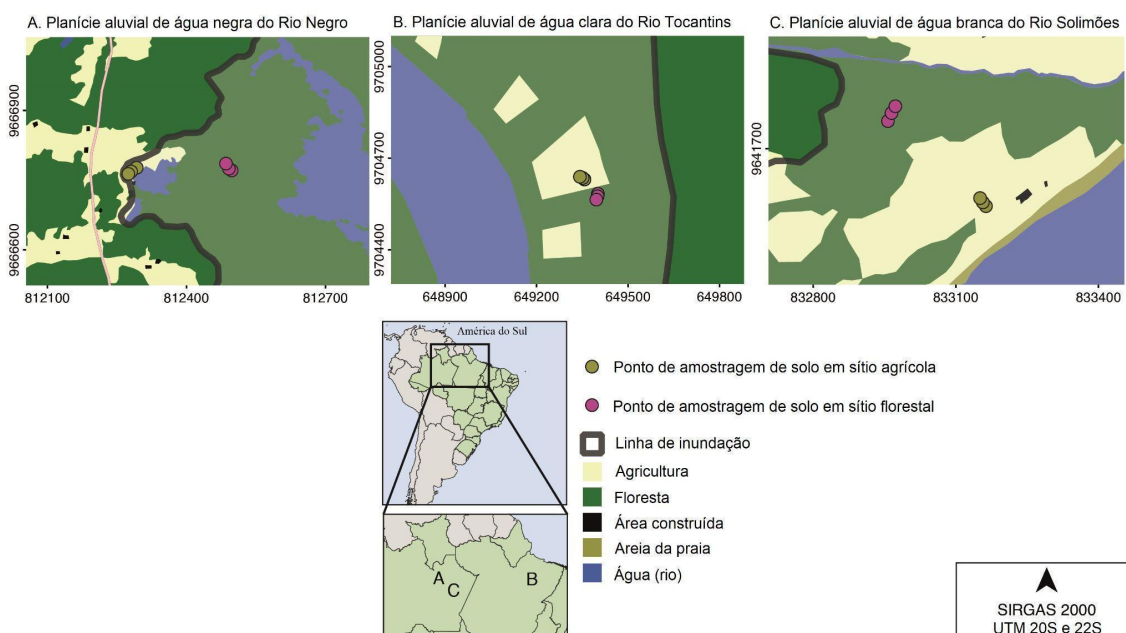
A concentração atmosférica de  $\text{CH}_4$  é um equilíbrio complexo de suas fontes e sumidouros, ambos com alto grau de incerteza [7]. Embora inúmeras medições e análises da emissão de  $\text{CH}_4$  na escala local na amazônia tenham sido realizadas [5, 8-13], a influência da coloração das águas amazônicas vinculado às comunidades metanogênicas e metanotróficas ativas e os fluxos de  $\text{CH}_4$  ainda é pouco compreendida. Avanços na melhoria em estimativas de emissões de  $\text{CH}_4$  sob diferentes regimes climáticos requer o desenvolvimento de um modelo matemático baseado em processo para relacionar fatores ambientais e processos biológicos com fluxo de emissão de  $\text{CH}_4$  [14].

Assim, nosso objetivo foi o desenvolvimento de um modelo de emissão para planícies aluviais amazônicas sob a influência de negra (Rio Negro), clara (Rio Tocantins) e branca (Rio Solimões), a partir da observação direta de variáveis de interesse. Para a elaboração da modelagem, utilizamos fatores ambientais e biológicos associados aos processos de produção e oxidação de  $\text{CH}_4$ . Optamos aqui por uma abordagem de modelagem deliberadamente simplista que nos permite fazer uso de dados entregue por uma abordagem observada.

## 5.2 Materiais e métodos

### 5.2.1 Cenário dos modelos

As áreas de estudo das planícies aluviais foram localizadas nas planícies aluviais do rio Negro (água negra) ( $3^{\circ}00'41''\text{S}$  e  $60^{\circ}11'15''\text{W}$ ), do rio Tocantins (água clara) ( $2^{\circ}40'51''\text{S}$  e  $49^{\circ}39'05''\text{W}$ ) e do rio Solimões (água branca) ( $3^{\circ}13'50''\text{S}$  e  $59^{\circ}59'26''\text{W}$ ). Amostras de solo pertencentes às três planícies aluviais foram coletadas em dois locais de amostragem identificados como floresta primária e sistemas agrícolas tradicionais em períodos contrastantes da hidrografia (seca e inundação) (Figura 1). A amostragem compreendeu os períodos não inundado (outubro de 2017) e inundado (maio de 2018). Os locais de amostragem em cada local são afetados por um pulso de inundação de longa duração (mais de 5 meses). As áreas de estudo das planícies aluviais foram localizadas na planície de inundação de água negra do rio Negro ( $3^{\circ}00'41''\text{S}$  e  $60^{\circ}11'15''\text{W}$ ), na planície de inundação de água clara do rio Tocantins ( $2^{\circ}40'51''\text{S}$  e  $49^{\circ}39'05''\text{W}$ ) e na planície de inundação de água branca do rio Solimões ( $3^{\circ}13'50''\text{S}$  e  $59^{\circ}59'26''\text{W}$ ). O clima predominante nesta região é tropical úmido, sendo classificado como ‘Afi’ (classificação de Köppen) com temperaturas médias anuais superiores a  $26^{\circ}\text{C}$ , precipitação anual de aproximadamente 2000 mm, sol intenso, elevada umidade do ar e baixa velocidade do vento [15].



**Figura 1.** Localização dos locais de amostragem na Amazônia brasileira, uso da terra e linha de inundação nas três áreas de estudo sazonalmente inundadas com água negra (A), água clara (B) e água branca (C)

## **5.2.2 Amostragem de solo**

A amostragem de campo foi realizada em cada um dos locais de amostragem de florestas e sistemas agrícolas tradicionais, localizados em cada uma das planícies aluviais. Em cada local, foram recolhidas três amostras de solo equidistantes 14 m. As amostras de solo foram coletadas em um núcleo cilíndrico asséptico (camada de solo de 0-15 cm e 15-30 cm de diâmetro e 10 cm de diâmetro). No regime de inundação das planícies aluviais, foram recolhidos núcleos de solo sub-aquáticos (camada de solo de 0-15 cm e 10 cm de diâmetro) utilizando um amostrador manual universal de sedimentos com núcleo ajustável de 0-15 cm (Aquatic Research Instruments, ID, EUA).

## **5.2.3 Fluxos de CH<sub>4</sub> a partir do solo e da lâmina da água das planícies aluviais**

Amostras de gases foram coletadas a fim de determinar os fluxos de CH<sub>4</sub> na interface solo-atmosfera durante o período não inundado (outubro de 2017) e na interface água-atmosfera durante o período inundado (maio de 2018) nas áreas de estudo. A concentração de CH<sub>4</sub> dissolvido na água e presente em bolhas que emergiram na superfície da água partindo do sedimento de fundo também foi determinada. Concomitantemente à coleta das amostras de gases foram determinadas a temperatura do solo e do ar utilizando um termômetro digital e a pressão atmosférica com o auxílio de um barômetro. Todas as amostras foram coletadas no período matutino.

### **5.2.3.1 Fluxos de CH<sub>4</sub> na interface solo-atmosfera**

A coleta de amostras de gases no período não inundado foi realizada a partir da disposição de cinco câmaras estáticas em cada sítio florestal e agrícola nas três áreas de estudo. As câmaras foram fixadas na superfície do solo em linha reta distantes 7 m entre si em cada um dos seis sítios de amostragem por meio de movimentos rotacionais, de forma a minimizar alterações na camada de material orgânico presente na superfície do solo e, ao mesmo tempo, assegurar boa vedação. A profundidade de penetração da câmara no solo foi de aproximadamente 1-2 cm. Um orifício sobre a tampa da câmara foi confeccionado para manter a pressão interna igual à pressão atmosférica. Com o auxílio de uma seringa plástica

de polietileno (60 mL) equipado com uma válvula de três vias foram coletadas amostras de gases do interior das câmaras e transferidas para frascos de vidro (20 mL) previamente tratados à vácuo. Para cada câmara, amostras de gases foram coletadas após 1, 10, 20 e 30 minutos do fechamento da câmara.

A amostragem de gases foi feita durante cinco dias consecutivos em cada sítio de amostragem, totalizando 600 amostras. As amostras de gases foram analisadas em até 3 semanas após a coleta utilizando um cromatógrafo a gás SHIMADZU GC-2014 (Shimadzu Co., Columbia, MD, EUA) com coluna empacotada e detector de ionização de chama (FID) para a quantificação de  $\text{CH}_4$ , com limite de detecção de 3  $\text{pgC/s}$ . As concentrações dos gases foram calculadas pela comparação das áreas de pico de amostras obtidos pelo equipamento em relação aos picos obtidos mediante a injeção de amostras com concentrações conhecidas e certificadas de  $\text{CH}_4$ : 0.96, 1.84, 3.58, 11.0, 24.0, 102.0, e 1030.0 ppm. Os fluxos de  $\text{CH}_4$  foram calculados para cada amostragem usando uma regressão linear gerada a partir dos valores medidos do gás ao longo dos intervalos de 30 min de acordo com [16], normalizado em função do volume e área da câmara. Para o cálculo do volume exato da câmara, medidas da altura da base da câmara até a superfície do solo foram tomadas a partir de três pontos diferentes em cada uma das cinco câmaras todos os dias de coleta de amostras de gases. Os fluxos foram considerados difusos se a correlação linear no tempo decorrido tinha  $R^2$  superior a 0,90 [17].

### **5.2.3.2 Fluxos de $\text{CH}_4$ na interface água-atmosfera**

Para determinar a concentração de  $\text{CH}_4$  na interface água-atmosfera, adotou-se a metodologia da câmara flutuante. As câmaras foram construídas com polipropileno e recobertas com manta térmica reflexiva aluminizada para evitar o aquecimento interno. A câmara possui área de 0,094  $\text{m}^2$ , equipada na parte superior com uma válvula e na borda lateral externa em uma boia flutuante. Quando disposta sobre a superfície da água, a câmara ficava submersa cerca de 5 cm, permitindo a concentração de gases em seu interior. As câmaras foram colocadas nos locais de amostragem com auxílio de um barco.

Foram utilizadas cinco câmaras por sítio de amostragem ao longo do mesmo transecto definido para amostragem no regime de seca separadas a 7 m umas das outras e adotado quatro tempos de coleta em cada uma das câmaras (1, 10, 20 e 30 min), totalizando 600 amostras. As amostras de gases foram coletadas por meio de seringas plásticas, com



capacidade de 60 mL, acoplando-as à válvula. Posteriormente, foram transferidas para frascos de vidro com capacidade de 20 mL, previamente higienizados, identificados, vedados e evacuados com septos de borracha estilo rolha (Bellco Glass, Vineland, NJ, EUA), de acordo com procedimento descrito por [18]. Em seguida, as amostras foram encaminhadas para análise em laboratório. Os fluxos de CH<sub>4</sub> na interface água-atmosfera foram calculados conforme descrito por [19].

### 5.2.3.3 Concentração de CH<sub>4</sub> dissolvido na água

O cálculo das concentrações de CH<sub>4</sub> na água é de fundamental importância uma vez que a quantidade de gás que migra da água para a atmosfera depende, dentre outros fatores, destas concentrações. A concentração de CH<sub>4</sub> dissolvido na água ( $p\text{CH}_4$ ) foi determinada por meio de amostras obtidas a partir do equilíbrio de fases água-atmosfera utilizando um equilibrador. Esta metodologia se baseia em um tubo, em plexiglass, preenchido cerca de 80% de seu volume com bolinhas de vidro, a fim de melhorar a interface de transferência dos gases conectado à uma bomba submersível posicionada à 60% de profundidade na coluna d'água e a um analisador de CO<sub>2</sub> por infra-vermelho (IRGA – Infrared Gas Analyser), modelo Li-Cor 820 (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, EUA), e este, por sua vez, ligado à um computador portátil. Este sistema promove a circulação de água, entre o rio e o equilibrador, e de gases, entre o equilibrador e o analisador. Por se tratar de um analisador de CO<sub>2</sub>, as leituras de concentração realizadas foram apenas utilizadas como indicador de estabilização, determinando o momento adequado para a amostragem de gases destinados à determinação da concentração de CH<sub>4</sub>. A coleta foi realizada por meio de seringas plásticas, com capacidade de 60 mL, conectadas a uma válvula presente no caminho do fluxo do ar. As amostras foram obtidas em triplicatas (totalizando 450 amostras), em cada um dos cinco pontos de amostragem das planícies aluviais dos rios Negro, Tocantins e Solimões nos sítios florestais e sistema agrícola tradicionais, e transferidas aos frascos de vidro, com capacidade de 20 mL, previamente evacuados. A amostragem foi feita durante cinco dias consecutivos em cada sítio de amostragem, sendo as amostras, em seguida, encaminhadas para análise em laboratório.

### 5.2.4 Fatores físicos e químicos do solo

A determinação de fatores físicos e químicos foi realizada a partir de cada uma das 36 amostras de solo. O pH do solo foi medido em suspensão de solo/0,01 M CaCl<sub>2</sub> (1:5). A umidade do solo foi determinada pelo método gravimétrico, como descrito em EMBRAPA [20]. Os teores totais de carbono (C) e nitrogênio (N) foram determinados por combustão seca utilizando o analisador elementar CHNS/O (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA) a partir das amostras de solo. A determinação foi realizada utilizando 5-7 mg de solo seco peneirado em malha de 0,15 mm. O NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N e NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N do solo foram extraídos por cloreto de potássio 2 M (KCl) e quantificados usando espectrofotometria conforme descrito por [21] e [22], respectivamente. Foi realizada a extração e determinação de sulfato em amostras de solo de acordo com [23]. O carbono orgânico dissolvido (orgânicos dissolvidos) foi analisado através do analisador Shimadzu TOC-5000A (Shimadzu, Columbia, MD, EUA) com infra-vermelho não dispersivo, após purga com HCl 2N.

### **5.2.5 Extração do RNA Genômico do Solo e Síntese de cDNA**

A extração de RNA total das 36 amostras de solo coletadas nas campanhas de campo realizadas nos períodos não inundado e inundado (18 amostras de solo em cada período: 3 áreas x 2 sítios x 3 pontos amostrais) nas três diferentes áreas amostrais foi feita com o RNeasy PowerSoil Total RNA Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante. Foram realizadas duplicatas de extrações de RNA a partir de cada amostra de solo, as quais compuseram um pool para cada amostra após a análise da qualidade e quantidade do RNA utilizando espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Nanodrop ND-1000, NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) com densidade ótica de 230, 260, 280 e 320 nm. As amostras de RNA foram preservadas a -80 °C até o uso. Síntese de cDNA foi feita a partir do mRNA de cada amostra utilizando o QuantiNova Reverse Transcription Kit (Quiagen, Hilden, Alemanha), com remoção integrada da contaminação do DNA genômico.

### **5.2.6 Sequenciamento de transcritos de amplicons 16S rRNA**

A biblioteca de amplicons foi preparada de acordo com *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* usando o cDNA como molde para as reações de amplificação de primers

específicos para o gene *16S* ribossomal *rRNA* de *Archaea* e *Bacteria* total. Abundâncias relativas dos grupos metanogênicos e metanotróficos ativos foram baseadas no número total de sequências classificadas como metanogênicas e metanotróficas por amostra, respectivamente. As métricas ecológicas foram calculadas a partir da biblioteca de sequências normalizadas. Estimadores de riqueza (Chao1), índice de diversidade (Shannon e Brillouin) e equitatividade (Pielou) da comunidade metanogênica e metanotrófica foram calculados para comparar a comunidade ao nível de riqueza, diversidade e equitatividade. Todas essas informações estão descritas detalhadamente em [24].

### 5.2.7 Análise estatística

A fim de verificar a normalidade de todos os dados obtidos, um teste de Shapiro-Wilk foi realizado. Identificada a não-normalidade, as variáveis foram previamente analisadas de acordo com testes estatísticos de Kruskal-Wallis e de correlação de Spearman ( $r$ ). Esses testes foram aplicados a fim de verificar a influência de fatores temporais (e.g., estações secas e chuvosas) e espaciais (e.g., diferentes planícies aluviais, sítios e pontos de amostragem), e as suas correlações, respectivamente. Foi realizada a normalização das variáveis de interesse, logaritmizando-as [i.e.,  $\ln(\text{variável}+1)$ ] previamente à elaboração dos modelos de regressão linear múltipla, e os resultados obtidos analisados com nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). A fim de verificar a colinearidade entre variáveis nos modelos desenvolvidos o coeficiente Variance Inflation Factor (VIF) foi verificado, excluindo variáveis do modelo caso  $VIF > 5$ . Gráficos comparativos entre os fluxos de  $\text{CH}_4$  preditos pelos modelos e observados foram elaborados. As análises estatísticas e a elaboração dos modelos foram realizadas por meio do software Statistica 13<sup>®</sup> (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

## 5.3 Resultados

O teste de Kruskal-Wallis (Tabela 1) indicou que houve variação temporal significativa em apenas 8 variáveis. Por outro lado, a maior variação espacial foi das diferentes planícies aluviais, em que houve variação espacial significativa em 20 variáveis. Os diferentes sítios de amostragem indicaram variação espacial significativa em 9 variáveis, e os diferentes pontos amostrais não apresentaram variação espacial significativa. A maior diferença significativa entre as planícies aluviais no teste de Kruskal-Wallis corroborou para

a aplicação do teste de correlação de Spearman, que foi realizado individualmente para cada planície. As correlações de Spearman ( $r$ ) apresentaram, em geral, valores positivos e negativos entre as variáveis (Tabelas 2, 3 e 4). Nas planícies de águas negras, as variáveis que se correlacionaram com o fluxo de  $\text{CH}_4$  foram umidade relativa do solo ( $r = 0,97$ ), amônio ( $r = 0,76$ ), Chao1 (metanogênicas) ( $r = 0,60$ ), Brillouin (metanotróficas) ( $r = 0,59$ ), sequências gene 16S rRNA (metanotróficas) ( $r = -0,61$ ), e nitrato ( $r = -0,66$ ). E para as águas clara, as correlações significativamente positivas com o fluxo de  $\text{CH}_4$  foram NDWI ( $r = 0,85$ ), sequências gene 16S rRNA (metanogênicas) ( $r = 0,71$ ), umidade relativa do solo ( $r = 0,69$ ), e as correlações negativas foram temperatura do solo ( $r = -0,85$ ) e nitrato ( $r = -0,77$ ). Nas planícies de águas brancas, as variáveis que se correlacionaram com o fluxo de  $\text{CH}_4$  foram amônio ( $r = 0,83$ ), pH ( $r = 0,76$ ), NDWI ( $r = 0,71$ ), e umidade relativa do solo ( $r = 0,69$ ), e as correlações negativas foram com carbono total ( $r = -0,78$ ), razão carbono:nitrogênio ( $r = -0,76$ ), nitrogênio total ( $r = -0,69$ ), Shannon (metanogênicas) ( $r = -0,67$ ), Brillouin (metanogênicas) ( $r = -0,67$ ), Evenness (metanogênicas) ( $r = -0,66$ ), Simpson (metanogênicas) ( $r = -0,65$ ), orgânicos dissolvidos ( $r = -0,61$ ), e equitatividade (metanogênicas) ( $r = -0,58$ ).

**Tabela 1.** Teste de Kruskal-Wallis realizado para as variáveis de interesse considerando os fatores espacial e temporal. Os casos em que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) foram destacados em vermelho

Variáveis	Períodos de amostragem	Planícies aluviais	Sítios de amostragem	Ponto amostral
NDVI	p = 0,78	p = 0,00	p = 0,30	p = 0,71
NDWI	p = 0,00	p = 0,46	p = 0,01	p = 0,82
Altimetria	p = 1,00	p = 0,13	p = 0,00	p = 0,85
Declividade	p = 0,76	p = 0,00	p = 0,02	p = 0,52
Temperatura do ar	p = 0,13	p = 0,00	p = 0,00	p = 0,65
Temperatura do solo	p = 0,89	p = 0,00	p = 0,04	p = 0,95
Distância do talvegue	p = 1,00	p = 0,80	p = 0,05	p = 0,40
Sequências gene 16S rRNA (Metanogênicas)	p = 0,02	p = 0,00	p = 0,04	p = 0,88
Simpson (Metanogênicas)	p = 0,05	p = 0,01	p = 0,82	p = 0,51
Shannon (Metanogênicas)	p = 0,08	p = 0,00	p = 0,70	p = 0,37
Brillouin (Metanogênicas)	p = 0,07	p = 0,01	p = 0,77	p = 0,40
Evenness (Metanogênicas)	p = 0,02	p = 0,01	p = 0,06	p = 0,83
Equitatividade (Metanogênicas)	p = 0,01	p = 0,01	p = 0,34	p = 0,78
Chao1 (Metanogênicas)	p = 0,21	p = 0,60	p = 0,00	p = 0,44
Sequências gene 16S rRNA (Metanotróficas)	p = 0,35	p = 0,00	p = 0,56	p = 0,83
Simpson (Metanotróficas)	p = 0,89	p = 0,02	p = 0,46	p = 0,44
Shannon (Metanotróficas)	p = 0,68	p = 0,05	p = 0,34	p = 0,27
Brillouin (Metanotróficas)	p = 0,94	p = 0,01	p = 0,22	p = 0,84
Evenness (Metanotróficas)	p = 0,75	p = 0,05	p = 0,35	p = 0,45
Equitatividade (Metanotróficas)	p = 0,26	p = 0,01	p = 0,69	p = 0,64
Chao1 (Metanotróficas)	p = 0,25	p = 0,02	p = 0,08	p = 0,34
Umidade	p = 0,00	p = 0,50	p = 0,39	p = 0,90
pH	p = 0,09	p = 0,00	p = 0,03	p = 0,83
Carbono total	p = 0,10	p = 0,03	p = 0,25	p = 0,60
Nitrogênio total	p = 0,05	p = 0,61	p = 0,25	p = 0,86
Razão Carbono:Nitrogênio	p = 0,77	p = 0,00	p = 0,41	p = 0,60
Orgânicos dissolvidos	p = 0,19	p = 0,00	p = 0,09	p = 0,96
Sulfato	p = 0,09	p = 0,00	p = 0,31	p = 0,98
Nitrato	p = 0,00	p = 0,55	p = 0,01	p = 0,30
Amônio	p = 0,00	p = 0,07	p = 0,26	p = 0,63
Fluxo de CH <sub>4</sub>	p = 0,00	p = 0,59	p = 0,37	p = 0,94

**Tabela 2.** Correlações de Spearman entre as variáveis de interesse da planície aluvial de águas negras. Os coeficientes estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) foram destacados em vermelho

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	BB	CC	DD	EE	
A	1,00																															
B	-0,93	1,00																														
C	-0,35	0,48	1,00																													
D	-0,93	0,71	0,75	1,00																												
E	0,85	-0,75	-0,14	-0,71	1,00																											
F	0,88	-0,79	-0,54	-0,71	0,85	1,00																										
G	0,36	-0,47	-0,75	-0,77	0,31	0,48	1,00																									
H	-0,06	0,02	-0,20	0,31	-0,20	0,01	-0,03	1,00																								
I	0,35	-0,04	0,39	-0,37	0,44	0,35	-0,20	-0,45	1,00																							
J	0,34	-0,04	0,47	-0,37	0,41	0,29	-0,23	-0,43	0,99	1,00																						
K	0,35	-0,04	0,39	-0,37	0,44	0,35	-0,20	-0,45	1,00	0,99	1,00																					
L	0,58	-0,50	0,07	-0,77	0,65	0,48	-0,10	-0,49	0,45	0,45	0,45	1,00																				
M	0,39	-0,18	0,52	-0,26	0,53	0,31	-0,35	-0,48	0,85	0,87	0,85	0,75	1,00																			
N	-0,16	0,29	0,29	0,51	-0,36	-0,30	-0,09	0,03	0,31	0,38	0,31	-0,47	-0,03	1,00																		
O	0,20	-0,31	-0,56	-0,43	0,27	0,40	0,51	-0,44	-0,01	-0,08	-0,01	0,45	0,08	-0,46	1,00																	
P	0,37	-0,09	0,12	-0,26	0,43	0,38	-0,08	-0,41	0,76	0,71	0,76	0,45	0,52	0,25	0,13	1,00																
Q	0,48	-0,20	0,09	-0,54	0,52	0,48	-0,01	-0,42	0,79	0,74	0,79	0,46	0,55	0,25	0,11	0,99	1,00															
R	-0,07	0,09	0,46	0,54	-0,19	-0,29	-0,37	0,53	-0,06	0,01	-0,06	-0,46	-0,12	0,49	-0,82	-0,16	-0,14	1,00														
S	0,53	-0,25	0,09	-0,54	0,55	0,50	-0,01	-0,43	0,78	0,73	0,78	0,45	0,55	0,25	0,06	0,97	0,99	-0,10	1,00													
T	0,22	-0,05	0,57	0,03	0,10	-0,06	-0,34	0,08	0,45	0,53	0,45	0,00	0,38	0,61	-0,60	0,32	0,35	0,77	0,38	1,00												
U	0,34	-0,15	-0,09	-0,68	0,51	0,45	0,13	-0,66	0,60	0,53	0,60	0,65	0,51	-0,16	0,52	0,81	0,80	-0,68	0,77	-0,19	1,00											
V	-0,20	0,30	0,37	0,54	-0,31	-0,27	-0,27	0,17	0,14	0,21	0,14	-0,48	-0,01	0,64	-0,62	-0,19	-0,16	0,59	-0,11	0,59	-0,50	1,00										
W	0,23	-0,42	-0,90	-0,77	-0,02	0,36	0,74	0,18	-0,46	-0,48	-0,46	-0,10	-0,48	-0,22	0,58	-0,38	-0,36	-0,43	-0,36	-0,55	-0,13	-0,22	1,00									
X	0,09	0,10	0,19	-0,37	-0,14	-0,04	-0,42	-0,34	0,46	0,45	0,46	0,14	0,29	0,36	-0,28	0,41	0,43	-0,06	0,46	0,16	0,32	0,24	-0,27	1,00								
Y	-0,18	0,35	0,42	0,37	-0,29	-0,29	-0,57	-0,44	0,49	0,50	0,49	0,08	0,36	0,46	-0,24	0,38	0,36	-0,07	0,36	0,15	0,29	0,29	-0,41	0,91	1,00							
Z	0,61	-0,57	-0,44	-0,83	0,36	0,50	0,23	-0,27	0,12	0,10	0,12	0,43	0,08	-0,03	0,22	0,34	0,39	-0,42	0,43	-0,18	0,48	-0,22	0,31	0,55	0,34	1,00						
AA	0,07	0,13	0,57	0,09	-0,05	-0,13	-0,74	0,20	0,37	0,42	0,37	0,08	0,38	0,30	-0,78	0,17	0,19	0,51	0,23	0,57	-0,14	0,48	-0,61	0,64	0,57	0,13	1,00					
BB	-0,25	0,41	0,69	0,37	-0,10	-0,31	-0,64	-0,26	0,43	0,45	0,43	0,15	0,45	0,31	-0,20	0,43	0,36	0,32	0,34	0,61	0,13	0,37	-0,69	0,13	0,32	-0,37	0,33	1,00				
CC	0,21	-0,31	-0,59	-0,37	0,20	0,29	0,51	0,33	-0,44	-0,49	-0,44	0,06	-0,39	-0,60	0,21	-0,22	-0,20	-0,30	-0,21	-0,52	0,04	-0,64	0,45	-0,34	-0,59	0,14	-0,34	-0,73	1,00			
DD	-0,27	0,38	0,73	0,77	-0,24	-0,45	-0,62	0,14	0,12	0,22	0,12	-0,23	0,15	0,48	-0,81	-0,10	-0,10	0,59	-0,07	0,56	-0,37	0,73	-0,64	0,30	0,43	-0,13	0,74	0,43	-0,56	1,00		
EE	-0,19	0,26	0,40	0,77	-0,26	-0,24	-0,28	0,23	0,12	0,20	0,12	-0,48	0,03	0,60	-0,61	-0,27	-0,24	0,59	-0,20	0,52	-0,55	0,97	-0,22	0,15	0,25	-0,24	0,47	0,30	-0,66	0,76	1,00	

A=NDVI, B=NDWI, C=altimetria, D=declividade, E=temperatura do ar, F=temperatura do solo, G=distância do talvegue, H=Sequências gene 16S rRNA (metanogênicas), I=Simpson (metanogênicas), J=Shannon (metanogênicas), K=Brillouin (metanogênicas), L=Evenness (metanogênicas), M=equitatividade, N=Chao1 (metanogênicas), O=Sequências gene 16S rRNA (metanotróficas), P=Simpson (metanotróficas), Q=Shannon (metanotróficas), R=Brillouin (metanotróficas), S=Evenness (metanotróficas), T=equitatividade (metanotróficas), U=Chao1 (metanotróficas), V=Umidade, W=pH, X=Carbono total, Y=Nitrogênio total, Z=Razão Carbono:Nitrogênio, AA=Orgânicos dissolvidos, BB=Sulfato, CC=Nitrato, DD=Amônio, EE=Fluxo de CH<sub>4</sub>.

**Tabela 3.** Correlações de Spearman entre as variáveis de interesse da planície aluvial de águas claras. Os coeficientes estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) foram destacados em vermelho

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	BB	CC	DD	EE			
A	1,00																																	
B	-0,50	1,00																																
C	-0,63	0,09	1,00																															
D	-0,15	0,04	0,18	1,00																														
E	0,64	-0,35	-0,79	-0,40	1,00																													
F	0,23	-0,83	0,01	0,03	0,40	1,00																												
G	-0,48	0,12	0,88	0,20	-0,78	-0,06	1,00																											
H	-0,61	0,63	0,52	0,45	-0,77	-0,51	0,54	1,00																										
I	-0,09	-0,32	-0,31	-0,25	0,28	0,31	-0,34	-0,59	1,00																									
J	-0,09	-0,30	-0,28	-0,34	0,27	0,29	-0,30	-0,58	0,99	1,00																								
K	-0,12	-0,24	-0,24	-0,37	0,25	0,22	-0,21	-0,59	0,96	0,97	1,00																							
L	0,24	-0,19	-0,61	-0,34	0,58	0,06	-0,58	-0,66	0,73	0,69	0,74	1,00																						
M	0,05	-0,40	-0,31	-0,17	0,37	0,37	-0,30	-0,71	0,94	0,90	0,92	0,78	1,00																					
N	-0,83	0,13	0,68	-0,07	-0,49	0,18	0,56	0,36	0,21	0,26	0,24	-0,30	0,07	1,00																				
O	0,00	0,15	-0,15	0,42	-0,20	-0,34	-0,06	0,29	-0,26	-0,28	-0,20	-0,03	-0,28	-0,38	1,00																			
P	-0,48	0,25	0,15	-0,20	-0,08	0,11	0,14	0,22	0,29	0,34	0,23	-0,11	0,12	0,71	-0,65	1,00																		
Q	-0,50	0,24	0,22	-0,14	-0,19	0,10	0,23	0,27	0,27	0,32	0,22	-0,20	0,10	0,74	-0,63	0,99	1,00																	
R	0,40	0,17	-0,63	-0,08	0,26	-0,30	-0,51	-0,18	0,23	0,28	0,17	0,20	0,15	-0,36	-0,07	0,17	0,17	1,00																
S	-0,51	0,30	0,20	-0,07	-0,22	0,02	0,23	0,28	0,27	0,32	0,22	-0,20	0,13	0,71	-0,58	0,96	0,98	0,26	1,00															
T	-0,50	0,44	0,09	-0,10	-0,14	-0,13	0,06	0,36	0,16	0,19	0,08	-0,17	-0,01	0,59	-0,56	0,94	0,93	0,29	0,94	1,00														
U	-0,91	0,60	0,40	-0,06	-0,41	-0,29	0,29	0,52	0,14	0,13	0,17	-0,05	-0,01	0,71	-0,13	0,59	0,58	-0,34	0,55	0,61	1,00													
V	-0,33	0,89	-0,17	-0,14	-0,12	-0,76	-0,20	0,33	-0,01	0,01	0,02	0,10	-0,11	0,00	-0,01	0,29	0,27	0,39	0,30	0,46	0,52	1,00												
W	0,38	0,32	-0,79	-0,38	0,58	-0,37	-0,79	-0,28	0,19	0,19	0,13	0,53	0,13	-0,50	-0,12	0,09	0,00	0,68	0,01	0,22	-0,09	0,61	1,00											
X	-0,11	-0,24	0,11	-0,04	0,07	0,26	0,01	-0,47	0,54	0,45	0,53	0,43	0,69	0,07	-0,27	-0,11	-0,08	-0,34	-0,10	-0,18	0,17	-0,03	-0,16	1,00										
Y	0,07	-0,42	-0,02	-0,33	0,28	0,42	-0,11	-0,71	0,73	0,69	0,71	0,55	0,83	0,12	-0,55	0,09	0,10	-0,08	0,06	-0,06	0,00	-0,12	0,01	0,87	1,00									
Z	-0,61	0,46	0,59	0,49	-0,65	-0,32	0,55	0,62	-0,40	-0,46	-0,36	-0,45	-0,34	0,26	0,31	-0,14	-0,06	-0,57	-0,03	-0,02	0,52	0,21	-0,52	0,27	-0,18	1,00								
AA	-0,23	-0,16	0,79	0,01	-0,38	0,24	0,62	0,01	-0,22	-0,20	-0,13	-0,41	-0,10	0,38	-0,22	-0,15	-0,11	-0,58	-0,13	-0,28	0,00	-0,31	-0,67	0,33	0,28	0,36	1,00							
BB	-0,01	-0,50	0,59	0,28	-0,43	0,44	0,75	0,06	-0,06	-0,04	0,01	-0,31	0,04	0,28	-0,01	-0,10	-0,02	-0,43	-0,05	-0,31	-0,21	-0,69	-0,84	0,15	0,14	0,17	0,56	1,00						
CC	0,36	-0,84	0,00	0,20	0,34	0,95	0,01	-0,48	0,23	0,20	0,13	0,02	0,36	0,03	-0,31	0,02	0,03	-0,22	-0,03	-0,20	-0,42	-0,78	-0,40	0,29	0,41	-0,27	0,22	0,57	1,00					
DD	-0,25	0,78	-0,13	-0,06	0,11	-0,57	-0,25	0,28	-0,27	-0,31	-0,27	0,10	-0,25	-0,11	-0,04	0,10	0,02	0,02	0,04	0,29	0,45	0,77	0,55	-0,03	-0,19	0,29	-0,16	-0,73	-0,62	1,00				
EE	-0,45	0,85	0,24	0,11	-0,55	-0,85	0,37	0,71	-0,34	-0,33	-0,27	-0,18	-0,38	0,13	0,10	0,22	0,23	0,11	0,29	0,41	0,52	0,69	0,17	-0,26	-0,42	0,43	-0,16	-0,21	-0,77	0,57	1,00			

A=NDVI, B=NDWI, C=altimetria, D=declividade, E=temperatura do ar, F=temperatura do solo, G=distância do talvegue, H=Sequências gene 16S rRNA (metanogênicas), I=Simpson (metanogênicas), J=Shannon (metanogênicas), K=Brillouin (metanogênicas), L=Evenness (metanogênicas), M=equitatividade, N=Chao1 (metanogênicas), O=Sequências gene 16S rRNA (metanotróficas), P=Simpson (metanotróficas), Q=Shannon (metanotróficas), R=Brillouin (metanotróficas), S=Evenness (metanotróficas), T=equitatividade (metanotróficas), U=Chao1 (metanotróficas), V=Umidade, W=pH, X=Carbono total, Y=Nitrogênio total, Z=Razão Carbono:Nitrogênio, AA=Orgânicos dissolvidos, BB=Sulfato, CC=Nitrato, DD=Amônio, EE=Fluxo de CH<sub>4</sub>.

**Tabela 4.** Correlações de Spearman entre as variáveis de interesse da planície aluvial de águas brancas. Os coeficientes estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) foram destacados em vermelho

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	BB	CC	DD	EE		
A	1,00																																
B	0,43	1,00																															
C	0,92	0,24	1,00																														
D	0,21	0,18	0,17	1,00																													
E	-0,70	-0,19	-0,76	-0,43	1,00																												
F	-0,01	0,21	-0,08	-0,23	0,52	1,00																											
G	0,73	0,29	0,81	0,37	-0,77	-0,37	1,00																										
H	0,74	0,54	0,55	0,45	-0,38	0,26	0,38	1,00																									
I	0,02	-0,62	0,24	-0,03	-0,18	-0,52	0,20	-0,26	1,00																								
J	0,05	-0,62	0,29	0,04	-0,20	-0,48	0,23	-0,22	0,99	1,00																							
K	0,05	-0,62	0,29	0,04	-0,20	-0,48	0,23	-0,22	0,99	1,00	1,00																						
L	-0,49	-0,79	-0,25	0,01	0,21	-0,43	-0,17	-0,60	0,80	0,81	0,81	1,00																					
M	-0,28	-0,77	-0,04	0,07	0,13	-0,34	0,01	-0,43	0,84	0,86	0,86	0,95	1,00																				
N	0,85	0,36	0,84	0,22	-0,87	-0,41	0,81	0,50	0,23	0,21	0,21	-0,33	-0,21	1,00																			
O	0,59	0,01	0,60	0,68	-0,61	-0,30	0,61	0,56	0,41	0,43	0,43	0,11	0,30	0,60	1,00																		
P	0,04	-0,03	0,04	0,30	-0,05	-0,10	0,01	0,36	0,37	0,31	0,31	0,22	0,27	0,14	0,57	1,00																	
Q	0,09	0,01	0,07	0,37	-0,07	-0,03	0,06	0,44	0,28	0,23	0,23	0,13	0,20	0,16	0,60	0,99	1,00																
R	-0,50	-0,49	-0,19	-0,21	0,22	0,30	-0,27	-0,49	0,10	0,14	0,14	0,34	0,26	-0,46	-0,39	-0,21	-0,21	1,00															
S	0,03	0,02	0,02	0,36	-0,06	-0,08	0,03	0,38	0,30	0,24	0,24	0,16	0,21	0,14	0,56	0,99	0,99	-0,20	1,00														
T	-0,36	-0,33	-0,03	0,13	0,08	0,20	-0,09	-0,10	0,37	0,40	0,40	0,42	0,50	-0,21	0,27	0,97	0,97	0,92	0,98	1,00													
U	0,67	0,43	0,44	0,44	-0,45	-0,14	0,52	0,72	-0,06	-0,10	-0,10	-0,40	-0,22	0,63	0,73	0,50	0,56	-0,78	0,52	-0,21	1,00												
V	0,55	0,86	0,38	0,33	-0,36	0,26	0,40	0,71	-0,71	-0,66	-0,66	-0,84	-0,76	0,36	0,13	-0,06	0,02	-0,37	0,00	-0,27	0,47	1,00											
W	0,35	0,69	0,02	0,10	-0,12	0,23	-0,03	0,58	-0,79	-0,80	-0,80	-0,85	-0,83	0,17	-0,04	-0,07	-0,01	-0,59	-0,04	-0,67	0,50	0,78	1,00										
X	0,08	-0,53	0,34	-0,03	-0,44	-0,30	0,20	-0,20	0,59	0,62	0,62	0,41	0,39	0,27	0,23	-0,07	-0,11	0,50	-0,10	0,40	-0,32	-0,43	-0,60	1,00									
Y	0,28	-0,35	0,52	0,23	-0,54	-0,30	0,47	0,05	0,57	0,62	0,62	0,34	0,38	0,40	0,43	-0,04	-0,04	0,37	-0,05	0,35	-0,13	-0,22	-0,56	0,92	1,00								
Z	-0,21	-0,64	-0,01	-0,17	-0,21	-0,21	-0,20	-0,36	0,41	0,40	0,40	0,38	0,27	-0,01	-0,01	-0,08	-0,12	0,56	-0,11	0,42	-0,44	-0,55	-0,46	0,88	0,64	1,00							
AA	-0,29	-0,94	-0,11	-0,33	0,18	-0,26	-0,21	-0,54	0,74	0,73	0,73	0,80	0,81	-0,23	0,01	0,08	0,01	0,32	0,00	0,18	-0,33	-0,88	-0,69	0,43	0,25	0,50	1,00						
BB	-0,56	-0,56	-0,44	-0,16	0,56	-0,06	-0,31	-0,69	0,48	0,48	0,48	0,75	0,71	-0,51	-0,19	-0,13	-0,18	0,27	-0,16	0,10	-0,45	-0,80	-0,72	0,08	0,01	0,09	0,60	1,00					
CC	-0,67	-0,64	-0,54	-0,49	0,52	-0,14	-0,54	-0,78	0,42	0,36	0,36	0,70	0,59	-0,56	-0,31	0,00	-0,12	0,34	-0,06	0,28	-0,53	-0,80	-0,54	0,25	-0,01	0,43	0,65	0,67	1,00				
DD	0,15	0,58	-0,05	0,30	0,15	0,33	0,08	0,41	-0,64	-0,61	-0,61	-0,45	-0,35	-0,15	0,11	0,10	0,14	-0,42	0,13	-0,13	0,44	0,68	0,64	-0,77	-0,59	-0,78	-0,58	-0,30	-0,31	1,00			
EE	0,25	0,71	0,00	-0,16	0,23	0,42	-0,01	0,44	-0,65	-0,67	-0,67	-0,66	-0,58	-0,02	-0,13	0,06	0,08	-0,51	0,07	-0,33	0,42	0,69	0,76	-0,78	-0,69	-0,76	-0,61	-0,43	-0,29	0,83	1,00		

A=NDVI, B=NDWI, C=altimetria, D=declividade, E=temperatura do ar, F=temperatura do solo, G=distância do talvegue, H=Sequências gene 16S rRNA (metanogênicas), I=Simpson (metanogênicas), J=Shannon (metanogênicas), K=Brillouin (metanogênicas), L=Evenness (metanogênicas), M=equitatividade, N=Chao1 (metanogênicas), O=Sequências gene 16S rRNA (metanotróficas), P=Simpson (metanotróficas), Q=Shannon (metanotróficas), R=Brillouin (metanotróficas), S=Evenness (metanotróficas), T=equitatividade (metanotróficas), U=Chao1 (metanotróficas), V=Umidade, W=pH, X=Carbono total, Y=Nitrogênio total, Z=Razão Carbono:Nitrogênio, AA=Orgânicos dissolvidos, BB=Sulfato, CC=Nitrato, DD=Amônio, EE=Fluxo de CH<sub>4</sub>.



Apenas as variáveis de interesse das comunidades metanogênicas e metanotróficas, físico-químicas do solo e fluxo de CH<sub>4</sub> foram consideradas para a elaboração de quatro modelos de predição do fluxo de CH<sub>4</sub>, sendo um modelo para cada planície aluvial e um modelo global obtido com os dados das três planícies (Tabela 5).

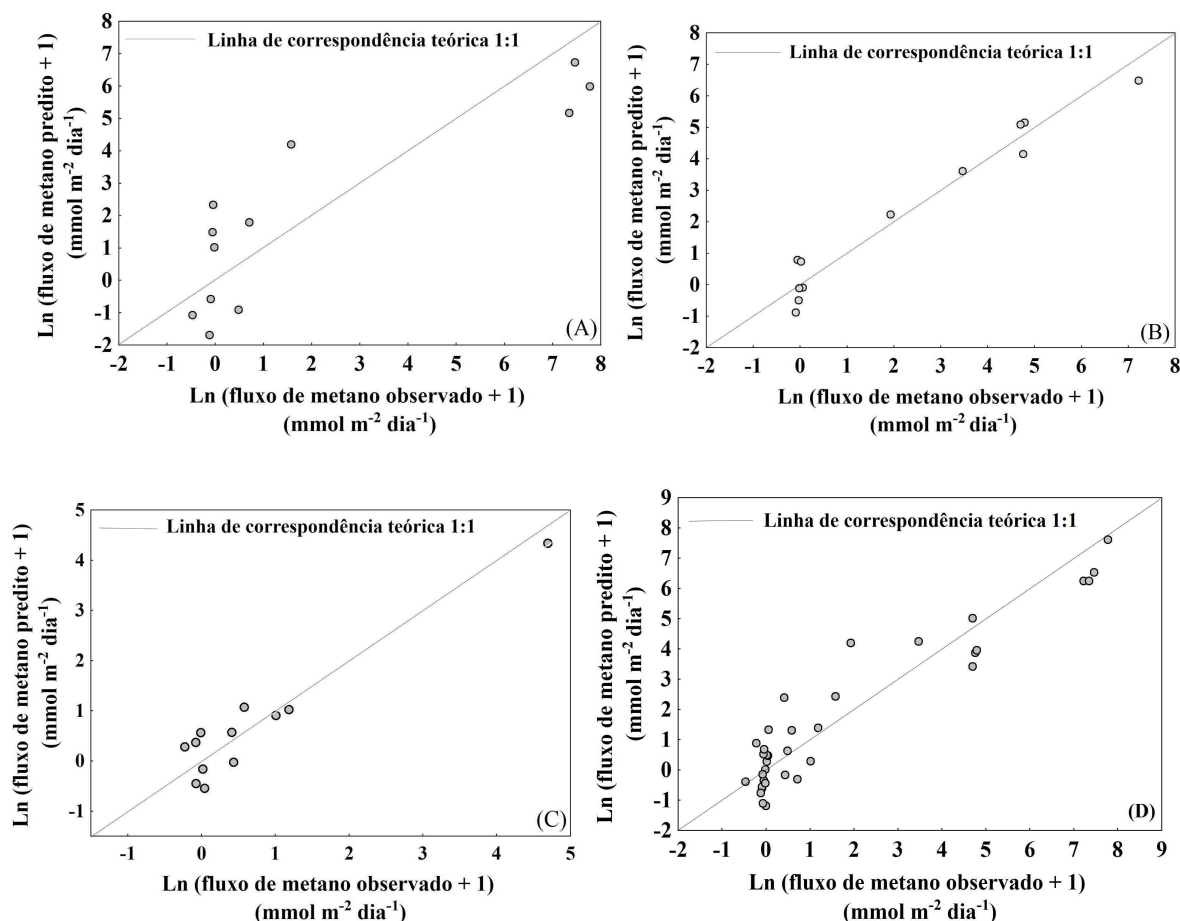
**Tabela 5.** Modelos de regressão linear múltipla para a predição do fluxo de CH<sub>4</sub> nas diferentes planícies aluviais, desenvolvidos com dados logaritimizados e baseados nas variáveis de interesse observadas, sobretudo, as variáveis correspondentes à comunidade metanogênicas e metanotróficas. *p*-valor é a probabilidade de significância, VIF é o coeficiente Variance Inflation Factor e R<sup>2</sup> é o coeficiente de determinação

Descrição do modelo	Variáveis que compõem o modelo	Coefficiente angular	Erro padrão	<i>p</i> -valor	VIF	R <sup>2</sup> ajustado
Planície aluvial de águas negras	Intercepto	12,11	2,09	2,6 10 <sup>-4</sup>	-	0,69
	Sequências gene 16S rRNA (metanotróficas)	-1,74	0,42	2,6 10 <sup>-3</sup>	1,00	
	Nitrato	-3,56	1,17	1,3 10 <sup>-2</sup>	1,00	
Planície aluvial de águas claras	Intercepto	233,96	28,01	3,2 10 <sup>-5</sup>	-	0,94
	Sequências gene 16S rRNA (metanogênicas)	1,21	0,27	1,9 10 <sup>-3</sup>	1,64	
	Shannon (metanogênicas)	4,19	1,51	2,1 10 <sup>-2</sup>	1,48	
	Temperatura do solo	-72,19	8,26	2,3 10 <sup>-5</sup>	1,49	
Planície aluvial de águas brancas	Intercepto	54,69	13,92	5,6 10 <sup>-3</sup>	-	0,84
	Simpson (metanogênicas)	6,17	2,14	2,3 10 <sup>-2</sup>	3,54	
	Evenness (metanogênicas)	-10,71	2,16	1,6 10 <sup>-3</sup>	3,42	
	pH	-36,56	8,39	3,3 10 <sup>-3</sup>	4,33	
	Amônio	4,82	0,67	1,8 10 <sup>-4</sup>	2,86	
Global	Intercepto	-29,02	14,96	6,0 10 <sup>-2</sup>	-	0,86
	Temperatura do ar	14,01	4,70	6,0 10 <sup>-3</sup>	2,22	
	Sequências gene 16S rRNA (metanogênicas)	1,47	0,27	1,1 10 <sup>-5</sup>	2,31	
	Equitatividade (metanogênicas)	6,25	1,60	5,6 10 <sup>-4</sup>	2,47	
	Umidade relativa do solo	1,71	0,28	2,0 10 <sup>-6</sup>	2,72	
	pH	-22,59	3,67	1,0 10 <sup>-6</sup>	1,58	
	Sulfato	8,21	3,22	1,6 10 <sup>-2</sup>	1,58	
	Nitrato	-1,01	0,35	8,4 10 <sup>-3</sup>	2,02	
	Amônio	1,29	0,35	1,1 10 <sup>-3</sup>	1,89	

O modelo obtido para a planície aluvial de água clara foi o mais adequado (R<sup>2</sup> = 0,94), esse modelo compõe duas variáveis relacionadas às comunidades metanogênicas, sendo elas, sequências gene 16S rRNA e Shannon, ambas as variáveis exercem influência positiva sobre o fluxo de CH<sub>4</sub>, e apenas a temperatura do solo exerceu uma influência negativa sobre o fluxo de CH<sub>4</sub> nesta planície. O modelo da planície aluvial de água negra foi o menos adequado (R<sup>2</sup> = 0,69) em comparação aos outros, entretanto foi o único que compõe uma variável das

comunidades metanotróficas (sequências gene 16S rRNA) em sua estrutura, e tal variável apresentou uma relação negativa com o fluxo de CH<sub>4</sub> na planície. O modelo de água branca compõe a maior quantidade de variáveis, entre elas, as das comunidades metanogênicas, Simpson e Evenness, apresentaram influência positiva e negativa sobre o fluxo de CH<sub>4</sub>, respectivamente. O modelo global de todas as planícies obtido ( $R^2 = 0,86$ ) é composto por uma maior quantidade de variáveis em sua estrutura quando comparado aos outros. A maioria dessas variáveis são físico-químicas, e apenas duas variáveis correspondem às comunidades metanogênicas (sequências gene 16S rRNA e equitatividade), e ambas exercem influência positiva sobre o fluxo de metano nas três planícies.

A comparação entre resultados preditos pelos modelos versus observados (Figura 2) demonstrou a qualidade do ajuste dos resultados à linha de correspondência teórica 1:1. Tal linha objetivou verificar se os modelos forneceram valores de fluxo de CH<sub>4</sub> semelhantes, ou iguais aos observados. Se os resultados estiverem posicionados acima da linha o modelo indica que o modelo superestima o fluxo de CH<sub>4</sub>, e se posicionados abaixo, indica que o modelo subestima os fluxos de CH<sub>4</sub>. Os modelos de água negra e branca não apresentaram uma distribuição uniforme dos dados sobre a linha em relação aos modelos de água clara e o global de todas as planícies.



**Figura 2.** Gráficos comparativos entre os fluxos de CH<sub>4</sub> modelados e observados. (A) Fluxo de CH<sub>4</sub> na planície aluvial de águas negra (B) Fluxo de CH<sub>4</sub> na planície aluvial de águas clara. (C) Fluxo de CH<sub>4</sub> na planície aluvial de águas branca e (D) Fluxo de CH<sub>4</sub> em todas as planícies

## 5.4 Discussão

A emissão de CH<sub>4</sub> em planícies aluviais amazônicas está entre as estimativas mais incertas dentre as fontes naturais. A redução das incertezas pode ser alcançada por meio do acoplamento de estimativas de modelos em escala de campo a bancos de dados regionais. Objetivando fornecer subsídios e estimativas para a diminuição das incertezas, utilizamos uma abordagem que difere significativamente das abordagens convencionais. Em nossa abordagem as métricas de diversidade das comunidades metanogênicas e metanotróficas, variáveis físico-químicas do solo e fluxo de CH<sub>4</sub> obtidas em condições de campo foram consideradas para elaboração de quatro modelos de previsão do fluxo de CH<sub>4</sub>, sendo um modelo para cada planície aluvial e um modelo global obtido com os dados das três planícies.

### *Modelo de previsão da planície aluvial de água negra*

O modelo da planície aluvial de águas negras foi o menos adequado ( $R^2 = 0,69$ ) em comparação aos outros, entretanto foi o único que compõe uma variável das comunidades metanotróficas (sequências gene 16S rRNA) em sua estrutura, e tal variável apresentou uma relação negativa com o fluxo de  $\text{CH}_4$  na planície. O parâmetro nitrato seguiu o mesmo princípio. Xu *et al.* [25] destaca o fato de nenhum modelo simular explicitamente a oxidação anaeróbia de  $\text{CH}_4$  no solo embora a literatura recente tenha revelado em uma proporção cada vez maior a importância do processo em solos. Vinculando a estrutura da comunidade microbiana metanotrófica ao nível de sequências do gene 16S rRNA, conforme investigação anterior [24], revelaram elevadas abundâncias relativas de NC10. A oxidação anaeróbia do  $\text{CH}_4$  (AOM) associada à redução de nitrito é mediada por *Candidatus "Methyloirabilis oxyfera"* pertencente ao filo bacteriano NC10 [26]. As amostras também apresentaram abundâncias relativas de *arqueas* metanotróficas anaeróbias (ANME- 2d) denominada *Candidatus "Methanoperedens nitroreducens"* conhecidas por realizarem AOM usando nitrato como o aceptor terminal de elétrons. O nitrito é reduzido a nitrogênio gasoso decorrente da interação sintrófica com bactéria ANAMMOX (na presença de amônio) ou com *Candidatus "Methyloirabilis oxyfera"* (NC10) [27]. O nitrato, como um produto do processo ANAMMOX, pode ser reaproveitado por membros da ANME-2d. Portanto, a termodinâmica do processo supracitado pode fornecer subsídios para um melhor entendimento sobre este modelo.

### *Modelo de previsão da planície aluvial de água clara*

Nossas observações refletem que o modelo obtido para planície aluvial de águas claras foi o mais adequado ( $R^2 = 0,94$ ), esse modelo compõe duas variáveis relacionadas às comunidades metanogênicas, sendo elas, sequências gene 16S rRNA e Shannon, ambas variáveis exercem influência positiva sobre o fluxo de  $\text{CH}_4$ , e apenas a temperatura do solo exerceu uma influência negativa sobre o fluxo de  $\text{CH}_4$  nesta planície. As associações empíricas entre a metanogênese e condições ambientais é um dos quatro tipos de estruturas de

modelagem descritas por [25] para relacionar a metanogênese aos requisitos de substrato. Uma vez que, observações de longo prazo sublinham o potencial de aquecimento do clima para amplificar continuamente as emissões de CH<sub>4</sub> em ecossistemas de água doce [28, 29]. No entanto, tal observação pode ser apoiada por uma resposta mais complexa, revelando que o CH<sub>4</sub> pode não responder ao aquecimento por meio de uma simples resposta ao processo fisiológico, mas sim responder a mudanças na estrutura e/ou atividade da comunidade microbiana relacionada ao CH<sub>4</sub> [29].

#### *Modelo de previsão da planície aluvial de água branca*

O modelo de previsão da planície aluvial de água branca é a representação composta pela maior quantidade de variáveis, entre elas, os índices de diversidade Simpson e Evenness, apresentaram influência positiva e negativa sobre o fluxo de CH<sub>4</sub>, respectivamente. Em relação às variáveis físico-químicas, o pH apresentou influência negativa e o amônio, influência positiva. O índice de Simpson forneceu uma forte influência positiva sobre o fluxo de CH<sub>4</sub>. Tal índice pode fazer com que os membros dominantes da comunidade aumentem a influência ao elevar o pi ao quadrado e diminuir o impacto de membros raros [30]. Tal métrica pode fornecer alguma indicação de que os fluxos de CH<sub>4</sub> podem ser impulsionados por grupos metanogênicos dominantes, embora tal informação necessite ser testada explicitamente para ser confirmada ou refutada.

#### *Modelo de previsão global para planícies aluviais amazônicas*

Encontramos uma relação estatisticamente significativa entre o fluxo de CH<sub>4</sub>, os parâmetros físico-químicos: temperatura do ar, umidade relativa do solo, pH, sulfato, nitrato e amônio e as variáveis das comunidades metanogênicas (sequências gene 16S rRNA e equitatividade). Vincular a estrutura microbiana ao nível de processos ecossistêmicos é um grande desafio teórico. Portanto, medir abundância de gene 16 rRNA, índices de diversidade e físico-química do solo é essencial para determinar como a estrutura da comunidade microbiana influencia em processos como o fluxo de CH<sub>4</sub> em planícies aluviais amazônicas. Ampliando assim, a nossa compreensão da ecologia microbiana do solo e ciclagem de CH<sub>4</sub> nesses ecossistemas. Esta necessidade é particularmente acentuada no cenário atual, e em escala de tempo de longo prazo. Zhu *et al.* [29] em estudo recente observaram um aumento desproporcional nas emissões de CH<sub>4</sub> induzidas por aquecimento. Os autores destacam as

mudanças impulsionadas pelo acréscimo de temperatura, sobre a comunidade metanogênica enquanto a comunidade metanotrófica mantém-se conservada. Corroborando assim com os dados aqui apresentados para o modelo global em que temperatura do ar e métricas biológicas ligadas à comunidade metanogênica exercem influência positiva sobre os fluxos de  $\text{CH}_4$ .

## 5.5 Conclusão

A modelagem dos fluxos de  $\text{CH}_4$  é um processo dinâmico. Conforme a ciência avança na identificação e entendimento dos mecanismos responsáveis pelo processo, a modelagem deve garantir que tais mecanismos possam ser matematicamente descritos e modelados, como ocorreu nas últimas décadas. Diante do conjunto de dados apresentados, este estudo revela relações entre padrões de diversidade microbiana, estrutura microbiana, parâmetros em solos de planícies aluviais amazônicas e oferece suporte inicial para inclusão de tal abordagem metodológica. Os modelos propostos evidenciaram que o fluxo de  $\text{CH}_4$  pode ser modelado a partir do conjunto de variáveis das comunidades metanogênicas, metanotróficas e fatores físico-químicos do solo. Tal suporte revela que inferências tomadas isoladamente podem ser insuficientes para descrever adequadamente as relações entre o biológico e os processos comunitários e ecossistêmicos. Este conhecimento será importante para uma melhor compreensão da influência de cada grupo de variável sobre o fluxo de  $\text{CH}_4$ , e avaliar qual modelo se adequa à predição do fluxo de  $\text{CH}_4$  nas planícies aluviais de rios de águas negra, clara e branca da Amazônia.

## Referências

- [1] SINGH, B. K.; BARDGETT, R. D.; SMITH, P.; REAY, D. S. Microorganisms and climate change: Terrestrial feedbacks and mitigation options. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 779–790, 2010.
- [2] NISBET, E. G.; DLUGOKENCKY, E. J.; BOUSQUET, P. Methane on the rise - Again. **Science**, v. 343, n. 6170, p. 493–495, 2014.
- [3] ZHANG, Z.; ZIMMERMANN, N. E.; STENKE, A.; *et al.* Emerging role of wetland methane emissions in driving 21st century climate change. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 36, p. 9647–9652, 2017.
- [4] KIRSCHKE, S.; BOUSQUET, P.; CIAIS, P.; *et al.* Three decades of global methane sources and sinks. **Nature Geoscience**, v. 6, n. 10, p. 813–823, 2013.
- [5] PANGALA, S. R.; ENRICH-PRAST, A.; BASSO, L. S.; *et al.* Large emissions from floodplain trees close the Amazon methane budget. **Nature**, v. 552, n. 7684, p. 230–234, 2017. Nature Publishing Group.
- [6] BEAULIEU, J. J.; DOWNING, J. A. Eutrophication will increase methane emissions from lakes and impoundments during the 21st century. **Nature Communications**, p. 3–7, 2019.
- [7] HEIMANN, I.; GRIFFITHS, P. T.; WARWICK, N. J.; *et al.* Methane Emissions in a Chemistry-Climate Model: Feedbacks and Climate Response. **Journal of Advances in Modeling Earth Systems**, v. 12, n. 10, 2020.
- [8] CRILL, P. M.; BARTLETT, K. B.; WILSON, J. O.; *et al.* Tropospheric methane from an Amazonian floodplain lake. **Journal of Geophysical Research**, v. 93, n. D2, p. 1564–1570, 1988.
- [9] BARTLETT, K. B.; CRILL, P. M.; SEBACHER, D. I.; *et al.* Methane flux from the central Amazonian floodplain. **Journal of Geophysical Research**, v. 93, n. D2, p. 1571–1582, 1988.
- [10] POTTER, C.; MELACK, J. M.; ENGLE, D. Modeling methane emissions from amazon floodplain ecosystems. **Wetlands**, v. 34, n. 3, p. 501–511, 2014.
- [11] SAWAKUCHI, H. O.; BASTVIKEN, D.; SAWAKUCHI, A. O.; *et al.* Methane emissions from Amazonian Rivers and their contribution to the global methane budget. **Global Change Biology**, v. 20, n. 9, p. 2829–2840, 2014.
- [12] MELACK, J. M.; HESS, L. L.; GASTIL, M.; *et al.* Regionalization of methane emissions in the Amazon Basin with microwave remote sensing. **Global Change Biology**, v. 10, n. 5, p. 530–544, 2004.

- [13] RINGEVAL, B.; HOUWELING, S.; VAN BODEGOM, P. M.; *et al.* Methane emissions from floodplains in the Amazon Basin: Challenges in developing a process-based model for global applications. **Biogeosciences**, v. 11, n. 6, p. 1519–1558, 2014.
- [14] CAO, M.; MARSHALL, S.; GREGSON, K. Global carbon exchange and methane emissions from natural wetlands: Application of a process-based model. **Journal of Geophysical Research Atmospheres**, v. 101, n. D9, p. 14399–14414, 1996.
- [15] ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; DE MORAES GONÇALVES, J. L.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711–728, 2013.
- [16] JANTALIA, C. P.; DOS SANTOS, H. P.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R. Fluxes of nitrous oxide from soil under different crop rotations and tillage systems in the South of Brazil. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 82, n. 2, p. 161–173, 2008.
- [17] SASS, R. L.; FISHER, F. M.; WANG, Y. B.; TURNER, F. T.; JUND, M. F. Methane emission from rice fields: The effect of floodwater management. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 6, n. 3, p. 249–262, 1992.
- [18] DRESCHER, M. S.; ROVEDDER, A. P. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; ELTZ, F. L. F.; DRESCHER, G. L. Divisão 2-Processos E Propriedades Do Solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 5, p. 1499–1508, 2011.
- [19] SAWAKUCHI, H. O.; BASTVIKEN, D.; SAWAKUCHI, A. O.; *et al.* Methane emissions from Amazonian Rivers and their contribution to the global methane budget. **Global Change Biology**, v. 20, n. 9, p. 2829–2840, 2014.
- [20] EMBRAPA (2009). Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes. EMBRAPA Informações Tecnológicas, 2 Edn. rev. ampl. Brasília: **EMBRAPA** Informação Tecnológica.
- [21] NORMAN, R. J.; EDBERG, J. C.; STUCKI, J. W. Determination of Nitrate in Soil Extracts by Dual-wavelength Ultraviolet Spectrophotometry. **Soil Science Society of America Journal**, v. 49, n. 5, p. 1182–1185, 1985.
- [22] KRORN, M. D. Spectrophotometric Determination of Ammonia : A Study of a Modified Berthelot Reaction Using Salicylate and Dichloroisocyanurate. **The Analyst**, v. 105, n. 1249, p. 305–316, 1980.
- [23] CANTARELLA, H. & PROCHNOW, L.I. Determinação de sulfato em solos. In: RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H. & QUAGGIO, J.A., eds. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas, Instituto Agrônomo de Campinas, 2001. p.225-230.
- [24] BENTO, M. S; BARROS D. J.; ARAÚJO, M. G. S.; RÓZ, R. CARVALHO; CARMO, J.B., *et al.* Active methane processing microbes and the disproportionate role of NC10 phylum in methane mitigation in Amazonian floodplains. **Biogeochemistry**, v. 155, n. 3, p. 1-25, 2021.



- [25] XU, X.; YUAN, F.; HANSON, P. J.; *et al.* Reviews and syntheses: Four decades of modeling methane cycling in terrestrial ecosystems. **Biogeosciences**, v. 13, n. 12, p. 3735–3755, 2016.
- [26] ETTWIG, K. F.; BUTLER, M. K.; LE PASLIER, D.; *et al.* Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 543–548, 2010.
- [27] LU, Y. Z.; FU, L.; LI, N.; *et al.* The content of trace element iron is a key factor for competition between anaerobic ammonium oxidation and methane-dependent denitrification processes. **Chemosphere**, v. 198, p. 370–376, 2018.
- [28] ZHANG, Z.; ZIMMERMANN, N. E.; STENKE, A.; *et al.* Emerging role of wetland methane emissions in driving 21st century climate change. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 36, p. 9647–9652, 2017.
- [29] ZHU, Y.; PURDY, K. J.; EYICE, Ö.; *et al.* Disproportionate increase in freshwater methane emissions induced by experimental warming. **Nature Climate Change**, v. 10, n. 7, p. 685–690, 2020.
- [30] NAGENDRA, H. Opposite trends in response for the Shannon and Simpson indices of landscape diversity. **Applied Geography**, v. 22, n. 2, p. 175–186, 2002.

## 6 CONCLUSÕES

Todos os elementos desta tese atendem a premissa de conteúdos integrados que podem ser apreciados e consultados em um único documento. Assim, as sub-hipóteses de trabalho são retomadas nesta seção para avaliação.

O *Capítulo 2* apresenta a primeira comparação de solos de planícies aluviais amazônicas sob a influência dos três tipos de água utilizando a metodologia de BIOLOG<sup>TM</sup> EcoPlate. A hipótese secundária na qual consideramos que a diversidade funcional metabólica das comunidades microbianas do solo é responsiva aos pulsos de inundação em planícies aluviais amazônicas foi parcialmente aceita, uma vez que a atividade metabólica média não apresentou diferença significativa entre os períodos amostrais em solos da planície aluvial de água clara. No caso da riqueza de utilização de substratos, somente os solos de planície aluvial de água branca apresentaram diferença significativa. Respondendo a hipótese secundária em que consideramos que os perfis metabólicos das comunidades microbianas do solo em planícies aluviais variam em função dos tipos de água amazônicas, a riqueza de utilização de substratos revela que os solos de planícies aluviais amazônicas possuem comportamento estatisticamente diferente, de modo que a mesma foi aceita.

No *Capítulo 3*, experimentos de incubação foram conduzidos em reatores biológicos para avaliar o potencial de produção de CH<sub>4</sub>. Analisando o potencial de produção de CH<sub>4</sub> entre os precursores das vias acetoclástica, hidrogenotrófica e metilotrófica, os enriquecimentos em biorreatores contendo acetato de sódio e metanol apresentaram maior potencial quando comparados aos enriquecimentos com formiato de sódio. Ao avaliar os solos de enriquecimento dos biorreatores com as mais elevadas produções de CH<sub>4</sub>, rejeitamos a hipótese corolária, que diz que tais condições estão associadas a elevada atividade metabólica microbiana associada à degradação de C, fixação de C e metanogênese detectadas através do microarranjo de genes funcionais (Geochip).

Por fim, no *Capítulo 4* o conjunto de metadados composto por variáveis das comunidades metanogênicas, metanotróficas, fatores físicos e químicos do solo e métricas da paisagem, reforçam a hipótese que versa sobre a capacidade da modelagem matemática baseada em dados obtidos em campo em simular emissões de CH<sub>4</sub>.